

WELLIGTON LUCIANO BRAGUINI



**EFEITOS DA DELTAMETRINA E DO GLIFOSATO, SOBRE
PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL,
SOBRE MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS
E EXPERIMENTOS *in vivo***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha.

CURITIBA

2005

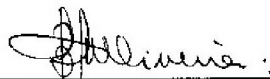
TERMO DE APROVAÇÃO

WELLIGTON LUCIANO BRAGUINI

**EFEITOS DA DELTAMETRINA E DO GLIFOSATO, SOBRE PARÂMETROS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO MITOCONDRIAL, SOBRE MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS E
EXPERIMENTOS *in vivo***

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador (a):



Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Suter Correia Cadena
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof.^a Dr.^a Ana Maria Kelmer Bracht
Departamento de Bioquímica, UEM



Prof. Dr. Roberto Andreatini
Departamento de Farmacologia, UFPR



Prof.^a Dr.^a Silvia Berlanga de Moraes Barros
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, USP

Curitiba, 31 de março de 2005.

Dedico

*Aos meus Pais, Domingos Osório Braguini
e Maria de Lourdes Braguini, com amor e gratidão,
pelo muito que me ensinaram*

*E a minha esposa
Luciane Ferreira Braguini
pelo incentivo constante, por me fazer
acreditar que era possível e por ter trilhado
comigo de mãos dadas.*

Agradecimentos

- À Professora Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira, por orientar-me em mais este trabalho, pela significativa contribuição acadêmica, pela amizade, confiança e conhecimentos dispensados, que muito acrescentaram à minha formação profissional e pessoal.
- À Professora Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha, pela amizade, co-orientação, carinho e esmero com que me ajudou a conduzir os experimentos, e pelas valiosas sugestões e correções que contribuíram para a realização deste trabalho.
- À Professora Dr.^a Eva Gunilla Skare Carnieri pelas sugestões durante a realização deste trabalho e pela amizade.
- À Professora Dr.^a Sílvia Maria Suter Correia Cadena pelos incentivos, participação, correções e sugestões.
- Ao Professor Dr. Aginaldo José do Nascimento pelo auxílio na análise estatística.
- À Professora Dr.^a Glaci T. Zancan, pela leitura do projeto, dos relatórios e pelas valiosas sugestões, além do incentivo à discussão científica nas sessões de referatas .
- Ao Professor Dr. Phillip Gorin pela amizade e gentileza de corrigir os resumos dos congressos e o trabalho.
- À Professora Dr.^a Gláucia Regina Martinez, pela amizade e pelas sugestões.
- Aos Professores Dr. Roberto Andreatini, Dr. Paulo Dalsenter e Dr.^a Maria A. Vital pela orientação nos experimentos in vivo e pela convivência agradável no Departamento de Farmacologia.
- Às Professoras Dr.^a Ana Maria Kelmer-Bracht e Dr.^a Emi Luiza Ishii-Iwamoto da Universidade Estadual de Maringá, pela amizade e ensinamentos durante a iniciação científica.
- Aos colegas de laboratório, Priscila Iansen, Silvana, Andréia Senff, Mariana R. Piemonte, Ana Paula Newton, Guilhermina Noletto, Gerusa, Tatiana, Lívia Bracht, Sílvia Romão, Sílvia Prado e André Bellin Mariano pela amizade e apoio, e em especial à colega Rosilene Rebeca, pela ajuda prestada na realização dos testes in vivo e no sacrifício dos animais.
- Ao biotério do Setor de Ciências Biológicas (UFPR), especificamente ao Cândido, a Izele, ao Luiz, ao Júlio e demais técnicos pela assistência dispensada.
- Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas (UFPR) por sua colaboração.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professores e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelo apoio e estímulo, em especial aos professores Dr.^a Leda Satie Chubatsu, Dr. Emanuel M. Souza, pelo proveitoso convívio científico nas sessões de referatas e seminários de tese.
- À Sr.^a Marilza Lamour, secretária do curso de Pós-Graduação, e à Srt.^a Nanci P. C. de Albuquerque (secretária do Depto), pelas gentilezas e dedicação prestadas.
- Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do futebol das quartas-feiras no Stark, pela amizade e momentos agradáveis.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.
- A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seus nomes não tenham sido aqui declinados, meus mais sinceros agradecimentos.

*“As diferenças entre os homens e as ações,
e o perpétuo movimento irregular das coisas
não permitem qualquer regra universal ou simples.
E nenhuma arte jamais poderá ditar uma regra
que dure para sempre.”*

Platão

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 AGROTÓXICOS	4
2.1.1 Definição.....	4
2.1.2 Considerações gerais sobre o consumo de praguicidas	5
2.2 A EXPOSIÇÃO AOS AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	6
2.3 A EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ	7
2.4 INSETICIDAS PIRETRÓIDES.....	11
2.4.1 Características Gerais.....	11
2.4.2 Biotransformação e Toxicidade dos Piretróides	12
2.4.3 Alterações Bioquímicas causadas por Piretróides	15
2.5 DELTAMETRINA	16
2.5.1 Propriedades Físico-Químicas	16
2.5.2 Biotransformação da Deltametrina	17
2.5.3 Toxicidade da Deltametrina.....	18
2.6 HERBICIDAS FOSFONADOS.....	21
2.6.1 Características Gerais.....	21
2.7 GLIFOSATO	22
2.7.1 Propriedades Físico-Químicas	22
2.7.2 Biotransformação do Glifosato	23
2.7.3 Toxicidade do Glifosato.....	24
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVO	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 AVALIAÇÃO ÉTICA	32
5.2 REAGENTES.....	32
5.3 ANIMAIS.....	32
5.4 PRAGUICIDAS	33
5.5 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS.....	33
5.5.1 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato.....	33
5.5.2 Obtenção de Mitocôndrias de Fígado de Rato Rompidas para Avaliação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais.....	34

5.5.3	Isolamento de Mitocôndrias para a Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Partículas Submitocondriais	34
5.5.3.1	Obtenção de Partículas Submitocondriais (PSMs).....	34
5.5.4	Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Inchamento Mitocondrial	35
5.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	36
5.6.1	Determinação do Consumo de O_2 , Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório e Relação ADP:O.....	36
5.6.2	Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna ($\Delta\psi$)	37
5.6.2.1	Curva de Calibração para o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna ($\Delta\psi$)	37
5.6.3	Determinação da Concentração de Proteínas	39
5.6.4	Determinação da Atividade das Enzimas Ligadas à Cadeia Respiratória.....	39
5.6.4.1	NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Oxidorredutase)	39
5.6.4.2	NADH Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: Ferricianeto Oxidorredutase)	40
5.6.4.3	NADH Citocromo <i>c</i> Redutase (EC 1.6.99.3 – NADH: Citocromo <i>c</i> Óxidorredutase)	40
5.6.4.4	Succinato Oxidase (NADH: Oxigênio Óxidorredutase).....	40
5.6.4.5	Succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1 - Succinato: Fenazina Metasulfato Óxidorredutase) ...	41
5.6.4.6	Succinato Citocromo <i>c</i> Redutase (EC 1.3.99.1 - Succinato: Ferrocitocromo <i>c</i> Óxidorredutase)	41
5.6.4.7	Obtenção do Ferrocitocromo <i>c</i> para determinação da Citocromo <i>c</i> Oxidase	42
5.6.4.7.1	Citocromo <i>c</i> Oxidase (EC 1.9.3.1 - Ferrocitocromo <i>c</i> : Oxigênio Óxidorredutase).....	42
5.6.5	Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Intactas, Rompidas e Desacopladas com FCCP e em Partículas Submitocondriais (PSM).....	43
5.6.5.1	Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Intactas	43
5.6.5.2	Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Rompidas.....	43
5.6.5.3	Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Tratadas com Carbonil Cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP)	44
5.6.5.4	Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Partículas Submitocondriais	44
5.6.6	Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre o Inchamento Mitocondrial	45
5.6.6.1	Determinação do Inchamento Mitocondrial na Presença de Acetato de Sódio	45
5.6.7	Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K^+	45
5.6.8	Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre a Transição de Permeabilidade Mitocondrial em mitocôndrias energizadas e desenergizadas	46
5.6.9	Efeitos da Deltametrina sobre a Fluidez de Membranas Artificiais e Naturais por Polarização de Fluorescência	46
5.6.9.1	Preparo das Membranas Artificiais (liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina - DMPC).....	46
5.6.9.2	Preparo das Membranas Naturais (liposomas de membranas mitocondriais)	47
5.6.9.3	Incorporação das Sondas as Membranas Artificiais e Naturais	47
5.6.9.4	Medições Fluorimétricas	48
5.6.9.5	Determinação da Temperatura Média de Transição de Fase (T_m).....	51

5.6.10	Efeito da Deltametrina e do Glifosato na Mobilização de Ferro da Ferritina.....	51
5.6.10.1	Preparo da solução de ferritina.....	51
5.6.10.2	Liberção de Ferro da Ferritina	52
5.6.11	Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre a Lipoperoxidação de Membranas Ferro-induzida	52
5.6.12	Avaliação dos Efeitos da Deltametrina em Modelos Animais de Comportamento.....	53
5.6.12.1	Manipulação dos Animais	53
5.6.12.2	Doses e Tratamento.....	53
5.6.12.3	Teste de Consumo de Solução de Sacarose	54
5.6.12.4	Teste de Natação Forçada.....	55
5.6.12.5	Teste do Campo Aberto	56
5.6.12.6	Teste no Labirinto em Cruz Elevado.....	57
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5.7.1	Análise Estatística dos Experimentos <i>in vitro</i>	57
5.7.2	Análise Estatística dos Experimentos <i>in vivo</i>	57
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	59
6.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	65
6.3	ANÁLISE DOS EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	70
6.4	ANÁLISE DOS EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	72
6.5	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A ATIVIDADE DA F ₁ F ₀ -ATPASE	74
6.6	EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A ATIVIDADE DA F ₁ F ₀ -ATPASE.....	76
6.7	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO.....	76
6.8	EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO.....	81
6.9	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL DESENERGIZADO.....	81
6.10	EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL DESENERGIZADO.....	84
6.11	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi$).....	87
6.12	EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi$).....	88
6.13	EFEITO DA DELTAMETRINA E DO GLIFOSATO SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DAS SONDAS 1,6-DIFENIL-1,3,5-HEXATRIENO (DPH) E 1,6-	

	DIFENIL-1,3,5-HEXATRIENO-ÁCIDO PROPIÔNICO (DPH-PA) INCORPORADAS EM MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS (MITOCÔNDRIAS).....	91
6.13.1	Efeitos da Deltametrina sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH em Membrana Artificial	92
6.13.2	Efeitos da Deltametrina sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH-PA em Membrana Artificial	98
6.13.3	Efeitos da Deltametrina sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH em Membrana Natural	101
6.13.4	Efeitos da Deltametrina sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH-PA em Membrana Natural	106
6.13.5	Efeitos do Glifosato sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH em Membrana Artificial	106
6.13.6	Efeitos do Glifosato sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH-PA em Membrana Artificial	109
6.13.7	Efeitos do Glifosato sobre a Polarização de Fluorescência da Sonda de DPH e DPH-PA em Membrana Natural.....	109
6.14	DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO-INDUZIDA PELA DELTAMETRINA E GLIFOSATO	115
6.15	DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA PELA DELTAMETRINA E GLIFOSATO	119
6.16	EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL	125
6.17	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DELTAMETRINA <i>in vivo</i>	138
6.17.1	Efeito do Tratamento Prolongado com Deltametrina sobre o Comportamento de Ratos	138
6.17.2	Efeito da Deltametrina no Ganho de Peso Corporal	138
6.17.3	Avaliação da Preferência pela Sacarose	140
6.17.4	Avaliação do Comportamento de Ratos no Labirinto em Cruz Elevado.....	142
6.17.5	Teste de Natação Forçada.....	142
6.17.6	Avaliação do Comportamento no Campo Aberto	145
7	DISCUSSÃO FINAL	147
8	CONCLUSÕES.....	155
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
	ANEXO I.....	173
	ANEXO II.....	174
	ANEXO III.....	174
	ANEXO IV	174

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS SEIS PIRETRINAS NATURAIS.....	13
FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PIRETRÓIDE DO TIPO I E DO TIPO II	13
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA.....	17
FIGURA 4 - VIA METABÓLICA PARCIAL DA DELTAMETRINA EM MAMÍFEROS.....	19
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO	22
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO SAL DO ÁCIDO DESPROTONADO DO GLIFOSATO E SEU CÁTION (ISOPROPIL-AMINA)	23
FIGURA 7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA UTILIZANDO SAFRANINA O.....	38
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	50
FIGURA 9 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 3 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	60
FIGURA 10 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 4 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	62
FIGURA 11 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.....	63
FIGURA 12 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	64
FIGURA 13 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 3 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	66
FIGURA 14: EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 4 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	67
FIGURA 15 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O CCR DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	68
FIGURA 16 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO	69
FIGURA 17 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETADO DE SÓDIO	79
FIGURA 18 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM SUCCINATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO	80
FIGURA 19 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETADO DE SÓDIO	82

FIGURA 20 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM SUCCINATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO	83
FIGURA 21 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO INDUZIDO POR VALINOMICINA E POTÁSSIO	85
FIGURA 22 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO INDUZIDO POR VALINOMICINA E POTÁSSIO	86
FIGURA 23 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO, ENERGIZADAS COM SUCCINATO DE SÓDIO	89
FIGURA 24 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO, ENERGIZADAS COM SUCCINATO DE SÓDIO	90
FIGURA 25 - EFEITO DO DMSO (0,25% V/V), SOBRE TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH	93
FIGURA 26 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH	95
FIGURA 27 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH	96
FIGURA 28 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH	97
FIGURA 29 - EFEITO DO DMSO (0,25% V/V), SOBRE TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA	99
FIGURA 30 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA	100
FIGURA 31 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA	102
FIGURA 32 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA	103

FIGURA 33 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH	105
FIGURA 34 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA.....	107
FIGURA 35 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH.....	108
FIGURA 36 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH.....	110
FIGURA 37 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA.....	111
FIGURA 38 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA.....	112
FIGURA 39 - EFEITOS DA GLIFOSATO ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH.....	113
FIGURA 40 - EFEITOS DA GLIFOSATO ($800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA.....	114
FIGURA 41 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO INDUZIDA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.....	116
FIGURA 42 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO INDUZIDA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.....	118
FIGURA 43 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA.....	120
FIGURA 44 - EFEITO DA GLIFOSATO SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA.....	124
FIGURA 45 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{2+}	127
FIGURA 46 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	129
FIGURA 47 - INTERFERÊNCIA DA DIAMIDA NO EFEITO DA DELTAMETRINA, SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO.....	130
FIGURA 48 - INTERFERÊNCIA DO MERSALIL NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO.....	132

FIGURA 49 - INTERFERÊNCIA DO FeCl_3 NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO	134
FIGURA 50 - INTERFERÊNCIA DA CATALASE E FERRO NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO	135
FIGURA 51 - INTERFERÊNCIA DO H_2O_2 E CATALASE NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS.....	137
FIGURA 52 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA (1, 2, 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DE RATOS ADULTOS.	139
FIGURA 53 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA 1, 2 E 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	144
FIGURA 54 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA 1, 2 E 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE (A), FREQUÊNCIA DE LEVANTAR (B) E FREQUÊNCIA DE LOCOMOÇÃO (C) DOS ANIMAIS NO TESTE DO CAMPO ABERTO	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CASOS REGISTRADOS DE INTOXICAÇÃO HUMANA POR AGENTE TÓXICO E ZONA DE OCORRÊNCIA. BRASIL: 2001	8
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ - 2001	9
TABELA 3 - NÚMERO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES, NO TRABALHO RURAL, NO PARANÁ - 2001	9
TABELA 4 - AS PRINCIPAIS CAUSAS DE INTOXICAÇÕES POR AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ - 2004	10
TABELA 5 - DADOS DE TOXICIDADE AGUDA DO GLIFOSATO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS - 1992	25
TABELA 6 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA.....	71
TABELA 7 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	73
TABELA 8 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO E DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAS.....	75
TABELA 9 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO E DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAS.....	77
TABELA 10 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA NA PRESENÇA DE SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE.....	122
TABELA 11 - EFEITOS DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA SOBRE O TESTE DE PREFERÊNCIA PELA SACAROSE	141
TABELA 12 - EFEITOS DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS DO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔF	- variação da intensidade de fluorescência
$\Delta\psi$	- Potencial elétrico de membrana mitocondrial interna
A	- absorvância
ADN	- ácido desoxiribonucleico
ADP	- adenosina 5'-difosfato
ADP/O	- quociente entre nmol de ADP e nanoátomos de oxigênio
ALT	- alanina aminotransferase
AST	- aspartato aminotransferase
ATP	- adenosina 5'-trifosfato
ATPase	- adenosinatrifosfatase
BHT	- butilhidróxi-butilato
BSA	- albumina de soro bovino
CCR	- coeficiente de controle respiratório
DMPC	- dimiristoilfosfatidil-colina
DMSO	- dimetilsulfóxido
DCPIP	- 2,6-diclorofenolindofenol
DPH	- difenil hexatrieno
DPH-PA	- difenil hexatrieno - ácido propanóico
EC50	- concentração da droga que causa 50% do efeito máximo
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- ácido etilenoglicol bis (éter 2-amino-etil) N,N',N',N' tetracético
ERO	- espécies reativas de oxigênio
EROD	- 7-etoxiresorufina-O-dealquilase
FCCP	- carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
GABA _A	- complexo receptor do ácido gama-aminobutírico
HEPES	- N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 2-etano sulfônico)
K _{ow}	- coeficiente de partição óleo – água
MPTP	- poro de transição de permeabilidade mitocondrial
MPT	- transição de permeabilidade mitocondrial
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
PEP	- fosfoenolpiruvato
Pi	- fosfato inorgânico
PMS	- fenazina metassulfato
PROD	- 7-pentoxiresorufina-O-dealquilase
PSM	- partícula submitocondrial
PMSF	- fluoreto de fenil-metil-sulfonila
TBA	- ácido tiobarbitúrico
TCA	- ácido tricloroacético
Tris	- tris (hidroximetil) amino metano

RESUMO

A deltametrina, um piretróide sintético, e o glifosato, um herbicida fosfonado, são utilizados na agricultura mundial com diversas finalidades. Apresentam também ampla aplicação na agricultura brasileira. Os efeitos da deltametrina e do glifosato sobre parâmetros da respiração mitocondrial e sobre a organização de membranas artificiais e naturais são descritos neste trabalho. Em mitocôndrias de fígado de rato a deltametrina diminuiu o consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4, como também interferiu no potencial elétrico da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$). Análises dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial sugeriram que o sítio de inibição da deltametrina está localizado nos complexos II e III. O inchamento mitocondrial, energizado ou dirigido pelo potencial de difusão do K^+ na presença do ionóforo valinomicina, foi parcialmente inibido pela deltametrina. A polarização de fluorescência do DPH e do DPH-PA, sondas para as regiões interna e externa de membranas, respectivamente, de liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC) e membranas naturais (mitocondrial), indicaram que a deltametrina muda a temperatura da transição de fase para valores mais baixos, além de estender a região de transição de fase. A deltametrina diminuiu a ordem lipídica da bicamada de DMPC, em temperaturas inferiores à temperatura de transição do lipídio, e também causou um efeito de desordem sobre membranas naturais. Entretanto, em temperaturas superiores a temperatura de transição, o piretróide aumentou a rigidez da membrana. Ferro foi liberado da ferritina de baço de cavalo pela deltametrina. A superóxido dismutase e a catalase diminuíram parcialmente este processo. A deltametrina estimulou a lipoperoxidação ferro-dependente. A abertura do MPTP induzida por Ca^{2+} e Pi foi protegida pela deltametrina e, agentes indutores da MPT como diamida e mersalil diminuíram o efeito protetor da deltametrina, sugerindo que o piretróide não previne a oxidação extensiva de grupos tióis. Os dados sugerem que a deltametrina causa perturbações nas interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, interfere nos mecanismos de transporte localizados na membrana, e causam alterações da permeabilidade e na atividade de enzimas mitocondriais. Os efeitos da exposição de ratos machos a 1, 2, e 4 $mg.kg^{-1}$ de deltametrina por 63 dias sobre parâmetros comportamentais foram avaliados. O peso corporal dos ratos, os testes de preferência por solução de sacarose, natação forçada, labirinto em cruz elevado, e comportamento no campo aberto não foram afetados pela exposição ao piretróide. O outro praguicida estudado, o glifosato, nas doses testadas não modificou os parâmetros mitocôndrias acima descritos para a deltametrina. As exceções foram o inchamento dirigido pelo potencial de difusão de K^+ usando valinomicina, e a lipoperoxidação, os quais foram parcialmente inibidos pelo herbicida. Estes efeitos podem ser atribuídos a habilidade do glifosato coordenar-se fortemente no pH do meio, com os íons disponíveis nos experimentos de inchamento induzido pela valinomicina (K^+) e de lipoperoxidação (Fe^{3+}). Os dados deste estudo podem ser importantes para o julgamento da segurança de ambos os praguicidas.

ABSTRACT

Deltamethrin, a synthetic pyrethroid and glyphosate, a phosphonate herbicide are used worldwide in agriculture. They also have widespread applications in Brazilian agriculture. The effects of deltamethrin and glyphosate on mitochondrial respiratory parameters and on the organization of artificial and native membranes are described. Deltamethrin decreased the oxygen consumption of both state 3 and 4, as well as the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in rat liver mitochondria. Analysis of segments of the respiratory chain suggested that inhibition site of deltamethrin is located in complex II and III. Mitochondrial swelling, energized or driven by the K^+ diffusion potential in the presence of valinomycin was partially inhibited by deltamethrin. Fluorescence polarization of DPH and DPH-PA, probing the core and outer regions respectively of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and native membranes (mitochondrial), indicated that deltamethrin shifts the phase transition temperature to lower values, besides broadening the phase transition. Deltamethrin decreased the lipid order of DMPC bilayers, at temperatures lower than the lipid transition temperature, and also caused a disordering effect on native membranes. However, at temperatures above the transition temperature, the pesticide increased the rigidity of the membrane. Iron was released from horse spleen ferritin by deltamethrin. Superoxide dismutase and catalase slowed this process. Deltamethrin increased iron-dependent lipid peroxidation. The opening of MPTP induced by Ca^{2+} and Pi was protected by deltamethrin, and inductor agents of MPT (diamide and mersalyl) are shown to decrease the protection by deltamethrin, showing that the pyrethroid does not prevent the extensive oxidation of thiol groups. The data suggest that deltamethrin causes perturbations in lipid-lipid and lipid-protein interactions, interferes in transport mechanisms operating at the membrane level, and causes alterations of membrane permeability and mitochondrial enzyme activities. The effects of exposure of male rats to 1, 2 and 4 $mg \cdot kg^{-1}$ deltamethrin for 63 days on behavioral parameters were evaluated. The body weight of rats, sucrose preference, forced swimming, elevated plus-maze, and open-field behaviors were unaffected by exposure to the pyrethroid. The other pesticide evaluated, glyphosate, at the tested doses did not modify the above mitochondrial parameters ascribed to deltamethrin. The exceptions were the swelling driven by the K^+ diffusion potential using valinomycin, and lipid peroxidation, which was partially inhibited by the herbicide. However, these effects can be attributed to the ability of glyphosate to strongly coordinate with the ions available in valinomycin induced swelling (K^+) and lipid peroxidation (Fe^{3+}) experiments. Data gathered in this study may be important for assessment of the safety of both pesticides.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e a demanda por alimentos têm exigido um sistema complexo de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001). Em decorrência deste aumento, o amplo uso de praguicidas, sem os cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental e o aumento das intoxicações ocupacionais, incluindo casos de envenenamento humano agudo e crônico.

No sul do Brasil, os agricultores utilizam uma combinação de organofosforados, herbicidas, fungicidas e inseticidas nas plantações, principalmente nas de tabaco (SALVI et al., 2003). A falta de proteção durante a aplicação, devido a razões culturais e econômicas, e a subvalorização da toxicidade dos praguicidas, pode resultar em intoxicações agudas e crônicas, além de alterações de comportamento, tais como depressão e ansiedade, como seqüelas do envenenamento por praguicidas na população exposta a estes agentes (STALLONES & BESELER, 2002).

O Estado do Paraná encontra-se entre aqueles de maior produção agrícola do país. Para a manutenção das lavouras, substâncias químicas são utilizadas no combate de pragas que atacam plantações de soja, milho, trigo, feijão, batata entre outros, assim como no combate de pragas que atacam culturas de produtos hortifrutigranjeiros, que juntamente com outros produtos de origem vegetal e animal, compõem a cesta básica da população paranaense e brasileira.

Entre os fatores que contribuíram para a realização deste estudo destaca-se o grande volume de aplicação de glifosato nas áreas agrícolas, principalmente de soja transgênica, bem como devido a presença de piretróides como a deltametrina em produtos para uso em doméstico (“sprays”) para proteção contra insetos, e aos casos de intoxicações causadas por estes praguicidas.

As células animais utilizam mais de 90% da energia proveniente da fosforilação oxidativa associada com a membrana mitocondrial interna (MITCHELL, 1961). Assim, as mitocôndrias estão diretamente ligadas a regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como o metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PEDERSEN, 1999). Portanto, compostos que interagem com membranas mitocondriais perturbando a eficiência do

transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa promovem grandes déficits de energia levando a perda de várias funções vitais para a sobrevivência das células e organismos.

No presente estudo, outro aspecto de abordagem refere-se a suspeita toxicológica atual quanto à possibilidade da exposição de longo prazo determinar alterações comportamentais. Esta hipótese tem sido investigada para outras classes de praguicidas como os organofosforados, mas até o momento os estudos não são conclusivos (ROSENSTOK et al., 1991; FARIA et al., 1999).

Desta forma este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da deltametrina e do glifosato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, membranas naturais e artificiais. Como a ocorrência de intoxicações por praguicidas de uso agrícola está fortemente associada com transtornos comportamentais, como a depressão e a ansiedade, uma avaliação comportamental de ratos machos expostos a deltametrina também foi realizada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A utilização sistemática dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de vinte, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial foram utilizados como arma química, e posteriormente seu uso foi expandido, chegando a produção mundial a atingir dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano (OPAS, 1997).

No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de sessenta. Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos, condicionava o agricultor a comprar o veneno com recursos do crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido (OPAS, 1997). Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou um enorme incremento e disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil, que é atualmente um dos maiores consumidores mundiais. Em consequência deste consumo excessivo o país apresenta inúmeros problemas, tanto de saúde da população como do meio ambiente (GARCIA, 1997; OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

A industrialização da agricultura e da pecuária no Brasil, ocorrida nas décadas de sessenta e setenta, provocou também profundas transformações nos processos e nas relações de trabalho existentes, assim como no modo de vida das populações. A introdução em larga escala das máquinas e dos agrotóxicos no campo intensificou a produtividade, assim como o aumento no ritmo e na jornada de trabalho e a destruição de pequenas unidades produtivas (TRAPÉ, 1993).

Estudos realizados em distintos estados do Brasil têm detectado a presença de agrotóxicos no leite materno, assim como têm apontado a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao uso de agrotóxicos (TRAPÉ, 1993). YÁÑEZ et al. (2002) verificaram em uma cidade do México, que o consumo de peixe e leite materno estavam entre os fatores que contribuíram para o aumento de intoxicações devido a exposição da população durante pulverizações do piretróide deltametrina, utilizado para o combate do mosquito transmissor da malária. Observa-se portanto que o problema não se restringe aos agricultores durante a

aplicação, mas atinge também de uma forma direta a população em geral (TRAPÉ, 1993).

Entre os agricultores é importante ressaltar os grupos de risco, ou seja aqueles que diluem ou preparam as "caldas", mistura de vários agrotóxicos, os que aplicam os agrotóxicos e os que entram nas lavouras após a aplicação dos produtos.

Além da exposição ocupacional, a contaminação ambiental coloca em risco de intoxicação outros grupos populacionais. Merecem destaque as famílias dos agricultores e a população em geral, que fazem uso de praguicidas facilmente encontrados em supermercados e lojas de produtos veterinários, sendo portanto, expostos a praguicidas de uso doméstico, raticidas, entre outros. Finalmente, pode-se dizer que os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde não dizem respeito apenas aos trabalhadores rurais diretamente envolvidos na aplicação, mas à população em geral.

2.1 AGROTÓXICOS

2.1.1 Definição

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) os praguicidas são produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas à prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer outra forma na produção, elaboração, armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, para os homens ou os animais, de produtos agrícolas, de madeira e seus produtos, ou que podem ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos. Esse termo inclui também as substâncias destinadas a serem reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes para reduzir a densidade ou evitar a queda prematura dos frutos, e as substâncias aplicadas nas culturas, antes ou após a colheita, para proteger o produto durante o depósito ou o transporte (ECOBICHON, 1996).

Definição semelhante a da FAO é usada na legislação brasileira, para

agrotóxico. O termo agrotóxico foi introduzido para substituir a designação “defensivo agrícola”, para denominar os venenos agrícolas, colocando em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana. Essa definição exclui os fertilizantes e os produtos químicos administrados aos animais para estimular o crescimento ou modificar o comportamento reprodutivo (ECOBICHON, 1996).

O uso do termo “agrotóxico” ao invés de “defensivo agrícola” no Brasil se deu após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana (OGA, 2003).

2.1.2 Considerações Gerais sobre o Consumo de Praguicidas

No âmbito da América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de praguicidas, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região (GARCIA, 1997). A extensão deste problema pode ser observada através dos valores envolvidos na comercialização desses produtos, cujo consumo aumentou de U\$ 988 milhões gastos em 1981 para U\$ 2,2 bilhões em 1997 (GARCIA, 1997; MEYER et al., 1999).

Segundo dados fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG) e Agência Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF), em 2001 o Brasil consumiu 328.413 toneladas de produtos formulados, correspondendo a 151.523 toneladas de ingredientes ativos. Desta forma, considerando-se o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos, o Brasil aparece em 7º lugar, e o emprego de agrotóxicos nos Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais representa atualmente 50% do total utilizado no País (GAZETA MERCANTIL, 2004). A maior utilização dessas substâncias é na agricultura, mas também em saúde pública, para a eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. São utilizados também no tratamento da madeira para construção, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária, entre outras aplicações (GAZETA MERCANTIL, 2004).

A utilização dos praguicidas no meio rural brasileiro tem trazido uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Essas são, em geral, relacionadas ao uso inadequado, a toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível sócio-econômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

2.2 A EXPOSIÇÃO AOS AGROTÓXICOS NO BRASIL

O controle de vetores de diversas doenças através do uso de diferentes praguicidas, é amplamente realizado pelos agricultores. Embora sejam geralmente eficientes para um rendimento maior na produção agrícola, tais substâncias também são agentes poluidores e podem resultar em problemas de saúde para o homem e prejuízo ao meio ambiente (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001). Um estudo comparativo realizado na década de noventa, relacionado ao uso e ao padrão de exposição a praguicidas no Brasil e outros países da América Latina, Ásia e África, mostrou que faltam cuidados técnicos e segurança no manuseio dos praguicidas (WORLD RESOURCES INSTITUTE - WRI, 1996).

A maior parte dos agrotóxicos utilizados na agricultura acaba atingindo o solo e as águas, principalmente durante a sua aplicação no controle de ervas daninhas, lavagem das folhas tratadas, lixiviação, erosão, aplicação direta em águas para controles de vetores de doenças, resíduos de embalagens vazias, lavagens de equipamentos de aplicação e efluentes de indústrias de agrotóxicos (WRI, 1996).

A população em geral pode estar exposta a praguicidas através da ingestão de resíduos em alimentos (incluindo carne, peixe, laticínios, frutas e vegetais), por exposição dérmica após aplicações domésticas ou pulverizações em cultura ou ambientes públicos (praças, auditórios) ou ainda inadvertidamente por inalação de aerossóis durante a aplicação em suas residências. Assim, a exposição é pode ser de natureza aguda ou crônica, ocorrendo às vezes em períodos de anos (RITTER, 1997). Em termos populacionais, os efeitos crônicos são mais prejudiciais que os agudos e existem evidências de que compreendem desde conseqüências

deletérias na reprodução até seqüelas neurológicas e câncer (SHARP, 1986).

Dados coletados pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2001) e analisados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) (Tabela 1) revelam a distribuição dos casos de intoxicações por agente tóxico e zona de ocorrência registrados em todo o país. Em 2001, os agrotóxicos foram os responsáveis por 5.384 casos (7,15%) no Brasil, sendo que os agrotóxicos de uso doméstico, produtos veterinários e raticidas contabilizaram 2.517 (3,34%), 973 (1,29%) e 5.110 (6,79%) casos de intoxicações humanas, respectivamente. A intoxicação por estes agentes no Brasil corresponderam a aproximadamente 19% do total de casos de intoxicação registrados no país em 2001. Além disso, a Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization) considera que em países como o Brasil, nos quais existem graves problemas estruturais na rede pública de saúde, ocorre um sub-registro de casos de intoxicações por agentes químicos em geral, inclusive daqueles causados por agrotóxicos. Para estes, as agências estimam que os casos registrados de intoxicações representem somente 2% do total de casos que ocorrem anualmente (WRI, 1996).

2.3 A EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ

As tabelas 2 e 3 apresentam dados referentes à população rural paranaense que é composta por aproximadamente 53% de homens e 47% por mulheres (IBGE, 2001) (Tabela 2). O maior número de trabalhadores no trabalho rural se concentra na faixa etária de 20 a 59 anos, demonstrando assim, que 78% da população rural está em idade produtiva (Tabela 3).

Aproximadamente 66% da população rural esta direcionada à atividade agrícola (1.135.772) e portanto exposta aos agrotóxicos (Tabela 2). É importante ressaltar também o trabalho infantil e de adolescentes no campo, retratados nos significativos dados da tabela 2. Trabalham nesta atividade 14.267 crianças de 5 a 9 anos, 88.169 crianças de 10 a 14 anos e 145.554 adolescentes de 15 a 19 anos, que representa 22% da população rural nesta faixa etária (Tabela 3) (IBGE, 2001).

Segundo os dados do Ministério Público do Estado do Paraná (MPEP, 2004), no período de 1993 a 2002, ocorreram 6.869 intoxicações por agrotóxicos

TABELA 1 - CASOS REGISTRADOS DE INTOXICAÇÃO HUMANA POR AGENTE TÓXICO E ZONA DE OCORRÊNCIA. BRASIL: 2001

Agente	Rural	Urbana	Ignorado	Total	
	nº	nº	nº	nº	%
Medicamentos	842	19324	368	20534	27,27
Agrotóxicos / uso agrícola	2319	2921	144	5384	7,15
Agrotóxicos / uso doméstico	224	2215	78	2517	3,34
Produtos veterinários	373	577	23	973	1,29
Raticidas	520	4458	132	5110	6,79
Domissanitários	296	6379	102	6777	9,00
Cosméticos	24	729	13	766	1,02
Produtos químicos industriais	225	4259	105	4589	6,09
Metais	41	647	14	702	0,93
Drogas de abuso	32	1385	75	1492	1,98
Plantas	184	1444	44	1672	2,22
Alimentos	19	778	15	812	1,08
Animais Peç./serpentess	3039	1500	192	4731	6,28
Animais Peç./aranha	600	2539	91	3230	4,29
Animais peç./escorpiões	679	5079	137	5895	7,83
Outros animais peç. Venenosos	591	2828	158	3577	4,75
Animais não peçonhentos	812	3278	214	4304	5,72
Desconhecido	199	1029	170	1398	1,86
Outro	50	747	33	830	1,10
Total	11069	62116	2108	75293	100
%	14,70	82,50	2,80	100	

FONTE: FIOCRUZ

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ - 2001

	População na área rural	População na atividade agrícola
Total	1.725.369 (100%)	1.135.772 (100%)
Homens	913.714 (53%)	711.682 (63%)
Mulheres	811.655 (47%)	424.090 (37%)

FONTE: IBGE

TABELA 3 - NÚMERO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES, NO TRABALHO RURAL, NO PARANÁ - 2001

FAIXA ETÁRIA	Nº TRABALHADORES
5 a 9 anos	14.267 (1%)
10 a 14 anos	88.169 (8%)
15 a 19 anos	145.554 (13%)
20 a 59 anos	887.782 (78%)

FONTE: IBGE

**TABELA 4 - AS PRINCIPAIS CAUSAS DE INTOXICAÇÕES POR AGROTÓXICOS
NO ESTADO DO PARANÁ - 2004**

	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	Soma	%
Profissional	558	597	423	285	347	286	216	283	248	229	3472	50,5
Suicídio	275	203	202	178	177	184	198	174	289	191	2071	30,1
Acidental	194	104	107	109	106	85	99	61	72	52	989	14,4
Outros/ignorado/ indeterminado	13	09	16	24	15	07	15	30	53	47	229	3,3
Poluição ambiental	06	04	03	03	02	01	-	04	05	-	28	0,4
Alimento com agrotóxico	-	-	05	08	04	03	14	13	07	09	63	0,9
Criminosa	-	01	-	-	04	03	03	01	03	01	16	0,2
Tentativa de aborto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1	0,0
Soma	1046	918	756	607	655	569	545	566	677	530	6869	100
%	15,2	13,4	11,0	8,8	9,5	8,3	7,9	8,2	9,9	7,7	100	

FONTE Ministério Público do Estado do Paraná

com 795 óbitos (Tabela 4). Nota-se que as notificações destes agravos vêm diminuindo gradativamente: em 1993 foram notificadas 1.046 intoxicações e em 2002 o total foi de 530 notificações (Tabela 4). Os casos de intoxicação acidental que em 1993 foi de 194 casos, em 2002 foi de 52, mostrando uma provável tendência da população em se proteger destes agentes. A principal causa das intoxicações por agrotóxicos são as provocadas pelo trabalho (profissional) sendo esta, responsável por cerca de 50% dos eventos. Em seguida, as tentativas de suicídio com cerca de 30% das causas. As de caráter acidental, outros e ignorados representam cerca de 18% (Tabela 4) (MPEP, 2004). No Paraná, no primeiro semestre de 2004 morreram 19 pessoas em decorrência de intoxicação por agrotóxicos. Também no Estado do Paraná, um dado alarmante é o que aponta a influência dos princípios ativos de alguns defensivos agrícolas como causadores de depressão (MPEP, 2004).

Do ponto de vista toxicológico, os praguicidas que são mais utilizados no combate de pragas (ervas daninhas e insetos) requerem maior atenção e maiores estudos quanto aos seus efeitos adversos sobre a saúde pública, ocupacional e ambiental. Dentre os praguicidas em corrente uso no Estado do Paraná, devido as suas características e volume de aplicação destacam-se, o herbicida derivado da glicina, Glifosato (Roundup®, Biocarb®, Glycel®, Glyfonox®, Rodeo®) e o piretróide do tipo II, deltametrina (Decis®; Scabin®, K-Othrine®). A deltametrina é bastante utilizada tanto na lavoura como em residências no controle e eliminação de pragas e insetos. O glifosato, componente principal de herbicidas utilizados para o controle de plantas daninhas, é utilizado nos jardins residenciais e principalmente no cultivo de soja transgênica.

2.4 INSETICIDAS PIRETRÓIDES

2.4.1 Características Gerais

Inicialmente, os piretróides eram extraídos de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. O extrato obtido desta flor contém ésteres crisantêmicos (piretrina I) e ácido pirétrico (piretrina II) em quantidades

aproximadamente iguais (Figura 1) (DAVIES, 1985).

Os constituintes ativos do extrato pirétrico, as piretrinas, são ésteres, formados pela combinação de dois ácidos, o ácido crisantêmico e o ácido pirétrico, e três álcoois, piretrolona, cinerolona, e jasmolona. Os ésteres do ácido crisantêmico são chamados de piretrina I, cinerina I e jasmolina I, respectivamente, e juntos constituem as piretrinas da fração I. Os ésteres do ácido pirétrico são chamados de piretrina II, cinerina II, e jasmolina II, e estes são os representantes das piretrinas da fração II (CASIDA, 1973). Suas estruturas estão mostradas na figura 1.

Os piretróides, ou seja, os análogos sintéticos da piretrina são produzidos desde 1940 (ELLIOT et al., 1973; ELLIOT, 1980), e dividem-se em 2 categorias distintas: piretróides do Tipo I e piretróides do Tipo II. Esta classificação é baseada nos sintomas produzidos em animais experimentais que receberam doses agudas tóxicas dos piretróides (VERSCHOYLE & ALDRIDGE, 1980), e também na presença ou ausência do grupo alfa-ciano na molécula destes praguicidas. Os piretróides do Tipo I, como a permetrina e a aletrina, não apresentam um grupo alfa ciano (Figura 2). Em geral os piretróides do Tipo II como a cipermetrina e o fenvalerato são inseticidas mais potentes devido a presença do grupo alfa ciano em suas estruturas (VIJVERBERG et al., 1982, GLICKMAN & CASIDA, 1982; HOLLOWAY et al., 1989; TABAREAN & NARAHASHI, 1998).

2.4.2 Biotransformação e Toxicidade dos Piretróides

O caráter lipofílico dos piretróides favorece um rápido acesso destes compostos aos tecidos, incluindo o sistema nervoso central. A administração intraperitoneal de 5-8 mg.kg⁻¹ de deltametrina, piretróide do tipo II, resultou em concentrações de 0,12 - 0,45 nmol.g⁻¹ de tecido no cérebro de rato, causando o aparecimento dos primeiros sintomas neurotóxicos na exposição aguda (ALDRIDGE, 1990).

Alguns estudos relatam casos de envenenamento sistêmico de humanos com piretróides, e que a farmacoterapia para estes casos é difícil, e a duração do envenenamento pode ser longa (MIYAMOTO, 1993). Em relação ao envenenamento sistêmico, os anticonvulsivantes têm sido utilizados, mas sua eficácia é baixa

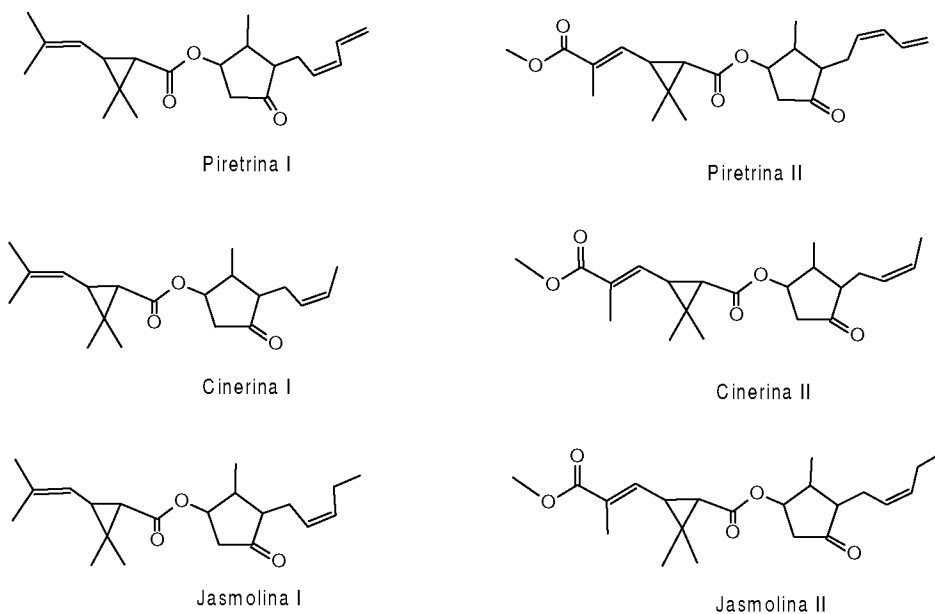


FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DAS SEIS PIRETRINAS NATURAIS

FONTE: CASIDA, J. E. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: Pyrethrum: The natural insecticide. Casida, J. E., Academic Press: New York. 329 p., 1973.

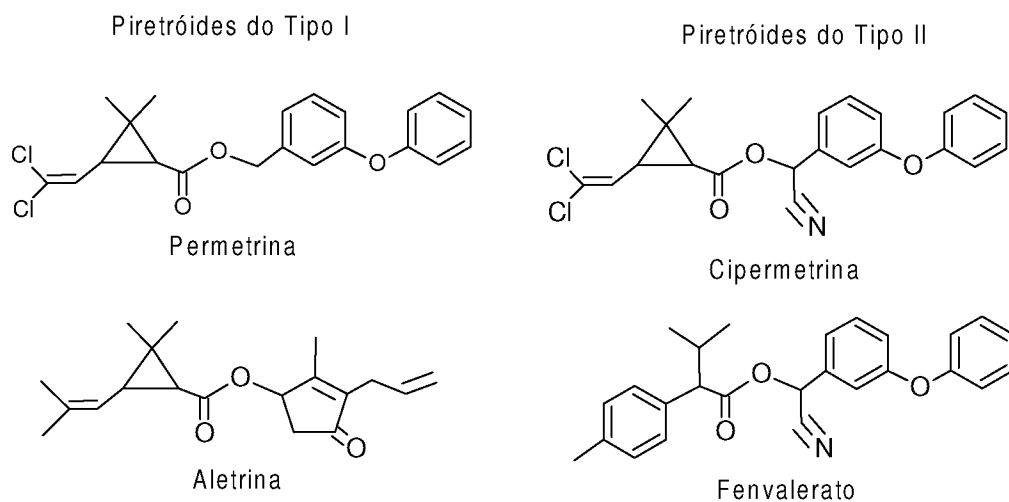


FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE PIRETRÓIDE DO TIPO I E DO TIPO II

FONTE: CASIDA, J. E. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: Pyrethrum: The natural insecticide. Casida, J. E., Academic Press: New York, 329 p., 1973.

(MIYAMOTO, 1993).

Os piretróides sintéticos são metabolizados muito rapidamente no fígado de mamíferos. A reação inicial de detoxificação em mamíferos é a clivagem da ligação éster, provavelmente por esterases, seguidas por reações de hidroxilação através do sistema citocromo P-450 e por várias reações de conjugação (KANEKO et al., 1981; HIEDER et al., 2001). A metabolização de um piretróide resulta no aumento significativo de sua solubilidade em água, facilitando assim sua rápida excreção na urina.

Além do fígado, as principais reações metabólicas têm sido detectadas também nos nódulos linfáticos mesentéricos de ratos e camundongos. Entretanto, a atividade metabólica em neonatos e animais jovens não é tão efetiva como em adultos (MIYAMOTO et al., 1995; KALE et al., 1999).

Alguns dados clínicos importantes são citados a seguir. Em seres humanos expostos a piretróides, existem poucas evidências de reações alérgicas. A parestesia cutânea tem sido relatada como forma de toxicidade de piretróides sintéticos contendo um grupo alfa ciano, observada em aplicadores de piretróides na forma de aerosol (HE et al., 1989). Entre os sintomas relatados estão a perda de sensibilidade dérmica facial e discinesia, combinados com queimação e prurido da área da pele exposta. Os sinais e sintomas desapareceram após 24 horas da exposição. A parestesia se desenvolve várias horas depois da exposição aguda e continua por 12-18 horas (TUCKER et al., 1984).

Existem evidências de seqüelas crônicas e irreversíveis em pacientes que sofreram intoxicação aguda por piretróides. As complicações freqüentemente observadas após dois anos da exposição foram: desordens de personalidade, redução da performance intelectual, perturbações visuais, polineuropatia sensomotora na parte inferior das pernas, taquicardia, aumento na sensibilidade ao calor. Muitos destes pacientes desenvolvem infecções oportunistas e doenças autoimunes como a hemólise autoimune (MÜLLER-MOHNSEN, 1999).

Os sintomas associados à intoxicação por permetrina, um piretróide sintético do tipo I, são bastante conhecidos e incluem a perda de memória, fadiga, dores musculares e articulares, ataxia, erupções na pele, dificuldades respiratórias e distúrbios gastrointestinais (MURPHY et al., 1999). Tais sintomas ficaram

conhecidos como a Síndrome do Golfo Pérsico (KLAUSTERMEYER et al., 1998; PROCTOR et al., 1998; UNWIN et al., 1999), pela sua manifestação em militares expostos ao praguicida.

2.4.3 Alterações Bioquímicas Causadas por Piretróides

Os piretróides são moléculas hidrofóbicas, e esta característica indica que estes praguicidas podem interferir principalmente com membranas biológicas (MICHELANGELI et al., 1990). De fato, o canal de sódio voltagem-dependente nas membranas neuronais é considerado o principal sítio de ação dos piretróides (NARAHASHI, 1985; SODERLUND & BLOOMQUIST, 1989; VIJVERBERG & van den BERCKEN, 1990). A inibição do receptor GABA_A representa um mecanismo adicional, proposto para os piretróides do tipo II (NARAHASHI, 1991).

GASSNER et al. (1997) verificaram que os piretróides permetrina e a cihalotrina, em concentrações até 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, são potentes inibidores do complexo I da cadeia respiratória, o complexo sensível a rotenona, em mitocôndrias de fígado de rato. Por outro lado, a atividade ATPásica não foi afetada por estes piretróides.

A aletrina, outro piretróide sintético, diminuiu a amplitude do inchamento de mitocôndrias de fígado de camundongo e estimulou o consumo de oxigênio mitocondrial (SETTLEMIRE et al., 1974). O fenvalerato, diminui o consumo de oxigênio por peixes vivos e de seus tecidos (músculo, fígado, e cérebro) (REDDY & PHILIP, 1992) e a cipermetrina (PHILIP et al., 1995) inibiu enzimas de preparações mitocondriais isoladas de fígado de peixe.

Vários praguicidas, incluindo aqueles organoclorados, o endossulfano (HINCAL et al., 1995), e organofosforados exercem efeitos tóxicos envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO) (YANG et al., 1996). A indução do 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).

KALE et al. (1999) mostraram em eritrócitos de ratos expostos a piretróides, um aumento na peroxidação lipídica e uma correlação entre o estresse oxidativo e o estímulo na atividade das enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como na concentração de

glutathiona reduzida (GSH).

O mecanismo envolvendo ERO no sistema nervoso central (SNC), propicia elevação da liberação de Ca^{2+} intracelular, acompanhada do aumento da liberação de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, além de causar a lipoperoxidação e a diminuição dos níveis de GSH neuronal (BONDY & LEBEL, 1993).

MAITI et al. (1995) mostraram que ratos tratados com fenvalerato apresentaram uma disfunção na tireóide e um aumento na lipoperoxidação no rim e fígado. Estes efeitos foram relacionados com a geração de radicais livres. A clivagem de piretróides, contendo o grupo alfa-ciano, e seus ésteres metabólicos, geram cianohidrinás, as quais são instáveis sob condições fisiológicas e se decompõem em cianeto e aldeído (WHO, 1990; SHAN & HAMMOCK, 2001). Os aldeídos e outros conjugados lipofílicos também podem levar ao estresse oxidativo durante a intoxicação por piretróide (KALE et al., 1999).

As ERO, tais como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumentam o processo oxidativo e promovem peroxidação de lipídios de membrana. Os efeitos das ERO são amplos, e três mecanismos relevantes envolvidos na injúria celular por estresse oxidativo são: (1) a modificação oxidativa de proteínas; (2) lesões no ADN; (3) peroxidação de lipídios de membranas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A lipoperoxidação tem sido uma hipótese atrativa para explicar a toxicidade induzida por piretróides (KALE et al., 1999; GIRAY et al., 2001; GABBIANELLI et al., 2002; NASUTI et al., 2003; SAYEED et al., 2003; DATTA & KAVIRAJ, 2003).

2.5 DELTAMETRINA

2.5.1 Propriedades Físico-Químicas

A deltametrina, praguicida utilizado no presente estudo (Figura 3), é um inseticida do grupo químico dos piretróides, conhecido quimicamente como (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil-(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato,

e comercialmente como Decis[®], K-Othrine[®], Ambush[®], Fuminset[®], Decametrina[®], K-obiol[®], Scabin[®], entre outros.

Apresenta fórmula química $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$, e pertence a classe de inseticidas do grupo químico éster do ácido crisântemico ou piretróide do Tipo II. Sua classificação toxicológica segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) é: "Produto Técnico Classe III ou medianamente tóxico". Existem quatro categorias estabelecidas pela ANVISA para classificar os praguicidas: Classe I ou altamente tóxico; Classe II ou tóxico; Classe III ou medianamente tóxico e Classe IV ou pouco tóxico.

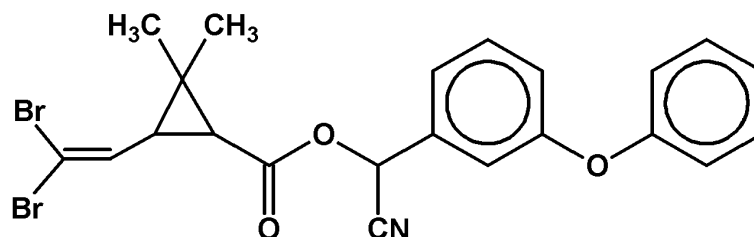


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA

FONTE: CASIDA, J. E. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: Pyrethrum: The natural insecticide. Casida, J. E., Academic Press: New York. 329 p., 1973.

2.5.2 Biotransformação da Deltametrina

A exemplo de todos os piretróides sintéticos, a deltametrina também parece ser degradada por hidrólise da ligação éster central, e reações de conjugação para produzir metabólitos primários e secundários solúveis em água que serão excretados através do sistema urinário e biliar (CASIDA et al., 1983; LENG et al., 1999).

A deltametrina é rapidamente absorvida quando administrada por via oral, e menos absorvida quando por via dérmica, sendo que a velocidade de absorção é dependente do solvente utilizado na formulação. Administrada a ratos machos por via oral ($0,64 - 1,6 \text{ mg.kg}^{-1}$), a porção ácida e a porção álcool da molécula foram quase completamente eliminadas do organismo dentro de dois a quatro dias (RUZO et al., 1978). Por outro lado, o grupo ciano foi eliminado mais lentamente, sendo detectado ainda oito dias após a administração de deltametrina. As principais

reações metabólicas da deltametrina foram: a oxidação, que ocorre no grupo trans-metil, relativo ao grupo carbonila da porção ácida, e nas posições 2'-, 4'-, e 5'- da porção álcool, a clivagem da ligação éster, e a conversão da porção ciano em tiocianato e ácido 2-iminotiazolidina-4-carboxílico (ITCA) (Figura 4) (MCGREGOR, 2000). Os derivados fenólicos e o ácido carboxílico podem ser conjugados com grupos sulfato, glicina, e ácido glucurônico (MCGREGOR, 2000).

2.5.3 Toxicidade da Deltametrina

A deltametrina foi sintetizada por ELLIOT et al. (1974), como o primeiro piretróide contendo a porção alfa-ciano-3-fenoxibenzil. Desde então vem sendo descrita como um composto que apresenta toxicidade aguda em ratos (BARNES & VERSCHOYLE, 1974). Estes autores descreveram os sinais de intoxicação por deltametrina que são observados após ingestão ou administração intravenosa. Entre estes destacam-se: a salivação excessiva seguida por movimentos abruptos das patas e movimentos convulsivos progressivos (coreoatetose) (BARNES & VERSCHOYLE, 1974).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o modo de ação neurotóxica da deltametrina, incluindo efeitos sobre canais de sódio na 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 glucose no cerebelo (CREMER et al., 1983), e nos níveis de poliaminas (HUSAIN et al., 1994).

A DL50 para ratos machos é de 95 mg.kg⁻¹ e para fêmeas é de 87 mg.kg⁻¹ em óleo de milho (VARSHO et al., 1996). A administração intravenosa de baixas doses de deltametrina em ratos (0,05, 0,15, e 0,45 mg.kg⁻¹) promoveu vigorosas respostas autonômicas e neuroendócrinas, com aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina, adrenalina e corticosterona, indicando alto nível de estresse (BOER et al., 1988).

CLARK & BROOKS (1989) mostraram em preparações de sinaptossomas, que baixas concentrações de deltametrina (10⁻¹¹ mol.L⁻¹) estimulam a liberação de

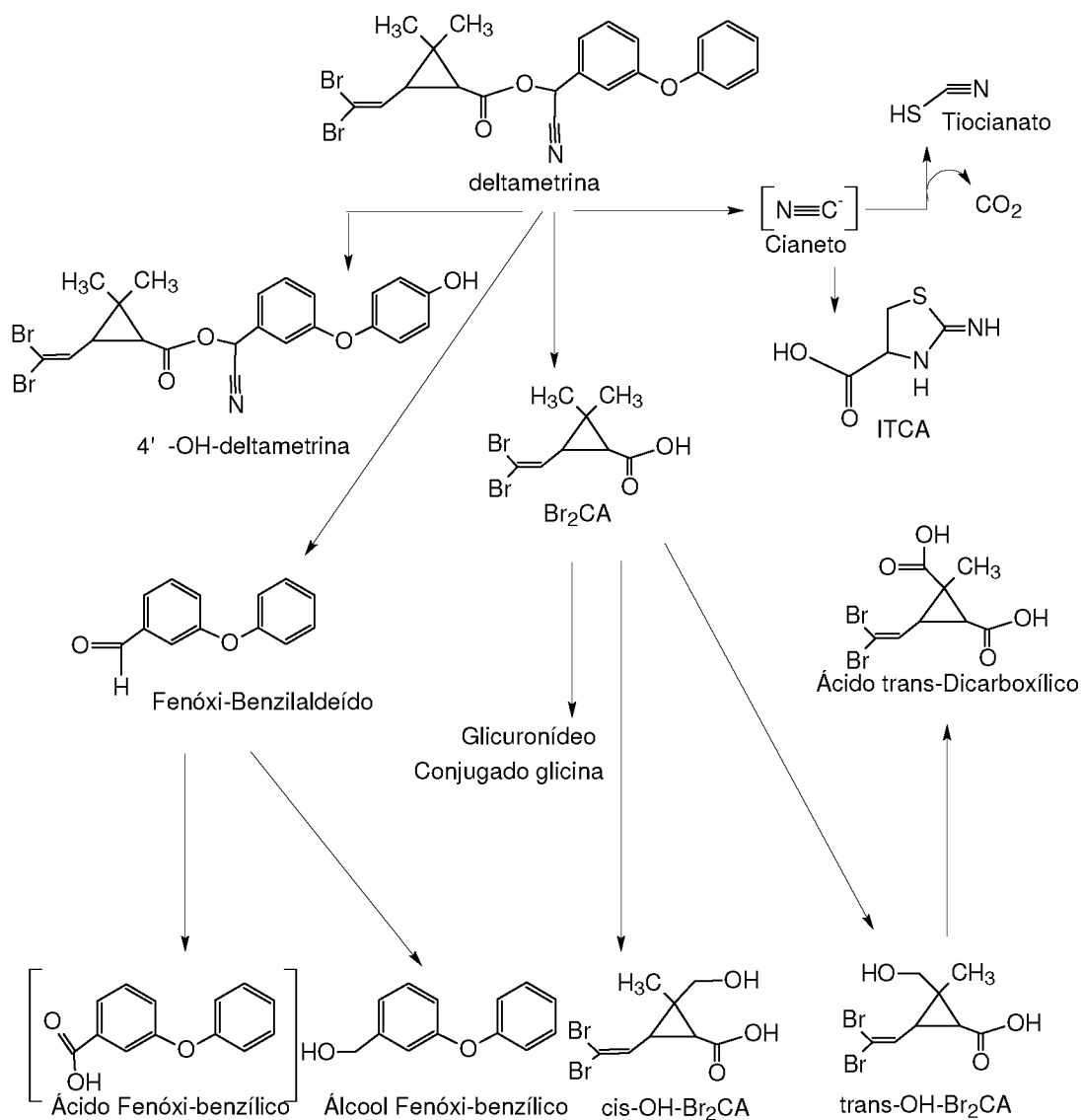


FIGURA 4 - VIA METABÓLICA PARCIAL DA DELTAMETRINA EM MAMÍFEROS

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

NOTA: *Cis/trans*-OH-Br₂CA refere-se a Ácido *cis/trans* 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanóico e ITCA refere-se a ácido 2-iminotiazolidina-4-carboxílico. Compostos mostrados entre colchetes, embora não sejam detectados são intermediários prováveis do metabolismo identificado.

neurotransmissores. A neurotoxicidade deste piretróide parece ser devido a presença do substituinte alfa-ciano na porção 3-fenoxibenzil álcool de sua estrutura química (SODERLUND et al., 2002). Segundo LAWRENCE & CASIDA (1982) a deltametrina apresenta uma DL50 de 0,5 a 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido cerebral de camundongo, um valor inferior em relação a outro piretróide sintético e bastante utilizado, a permetrina (DL50 de 11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (LAWRENCE & CASIDA, 1982).

LAZARINI et al. (2001) mostraram que a administração de 0,08 mg/kg de deltametrina a ratas entre o 6º e o 15º dia da gravidez não alterou o ganho de peso e o desenvolvimento físico das mães e dos filhotes. Entre os parâmetros comportamentais analisados, estes autores verificaram aumento na frequência de levantar nas patas traseiras no teste de campo aberto, e uma diminuição no tempo parado, no teste de natação forçada. Análises bioquímicas mostraram um aumento aproximado de 45% nos machos e de 27% nas fêmeas nos níveis de ácido 3,4-dihidróxi-fenil-acético (DOPAC) estriatal sem modificação dos níveis de dopamina, durante o período organogênico. Estes dados indicaram que houve um aumento na atividade do sistema dopaminérgico destes animais. Foi verificado também um aumento significativo de aproximadamente 150% nos níveis de noradrenalina dos animais machos do grupo experimental em relação aos machos do grupo controle. Entretanto a deltametrina utilizada nesta investigação era o produto formulado não sendo revelado a concentração exata de deltametrina pura na formulação.

YÁÑEZ e colaboradores (2002) analisaram amostras de urina coletadas de crianças que haviam sido expostas a aplicação de deltametrina com pulverizadores, durante o combate a malária em Oaxaca no México. Os autores verificaram que 50% do grupo de crianças expostas tinham níveis urinários de um metabólito da deltametrina, o ácido 3-fenoxibenzóico acima do limite de detecção do método empregado, e 6% tinham níveis acima de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, isto é, cinco vezes o limite de detecção (YÁÑEZ et al., 2002). Segundo estes autores, o consumo de peixes, e de leite materno estariam entre os fatores que contribuiriam para este nível de exposição.

DAYAL et al. (1999) verificaram que a administração de deltametrina (5, 10 e 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por 7 dias ou 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por 15 e 21 dias) em ratos produziu um aumento significativo na atividade da EROD (7-etoxiresorufina-O-dealquilase) e da

PROD (7-pentoxiresorufina-O-dealquilase) no fígado e no cérebro dos animais. Análises de *western blot* revelaram também um aumento dose e tempo-dependente na expressão das isoenzimas 2B1/2B2 e 1A1 da citocromo P-450, sendo significativo para as doses de 10 e 15 mg·kg⁻¹.

EL-AZIZ et al. (1994) mostraram que o tratamento de ratos machos adultos com 1 e 2 mg·kg⁻¹ durante 65 dias consecutivos foi capaz de reduzir o peso dos testículos, da próstata, e da vesícula seminal, além de diminuir a contagem de espermatozoides e os níveis de testosterona.

ANDRADE et al. (2002) investigaram os possíveis efeitos da exposição a deltametrina de ratas grávidas e durante a lactação. Os resultados mostraram que a exposição a baixas doses de deltametrina (1, 2, e 4 mg·kg⁻¹) induziu súbitas alterações no comportamento reprodutivo e na fisiologia dos filhotes machos, enquanto que as mães não foram afetadas. Entre os parâmetros avaliados verificaram que o ganho de peso das mães não foi alterado. Nenhum sinal clínico de intoxicação pelo piretróide foi observado durante o período de tratamento, indicando ausência de toxicidade materna com as doses testadas. Variáveis como a descida dos testículos e a separação prepucial dos filhotes machos também não foram afetadas. Estas variáveis são padrões externos de desenvolvimento sexual em ratos machos e são eventos andrógeno-dependentes (DALSENTER et al., 1999). O peso testicular e do epidídimo foi significativamente reduzido nos filhotes machos expostos à dose de 4 mg·kg⁻¹.

2.6 HERBICIDAS FOSFONADOS

2.6.1 Características Gerais

Os herbicidas fosfonados ou derivados da glicina são compostos que contém em sua estrutura um ou mais grupos R-PO(OH)₂. Devido a sua boa estabilidade química e solubilidade em água, os compostos desta classe podem ser utilizados na produção de óleo, na formulação de detergentes, e na inibição da corrosão (BARJA et al., 2001). Os herbicidas fosfonados têm habilidade para formar fortes complexos com metais, o que influencia a ocorrência e a velocidade de

transporte destes compostos no meio ambiente. Todos os processos de adsorção, fotodegradação e biodegradação dos herbicidas fosfonados são modificados pela presença de metais devido à formação de complexos que podem ser solúveis ou insolúveis (BARJA et al., 2001).

Um dos mais importantes herbicidas fosfonados, amplamente utilizado como herbicida é o *N*-(fosfonometil)-glicina (glifosato) (Figura 5).

2.7 GLIFOSATO

2.7.1 Propriedades Físico-Químicas

O glifosato foi sintetizado pela primeira vez em 1950. Somente vinte anos mais tarde, em 1970, J. E. Franz (Monsanto Agricultural) descobriu a propriedade de herbicida desta molécula. Este herbicida vem sendo utilizado com ampla aceitação entre governos de vários países, inclusive com exportação dos Estados Unidos para os países latino-americanos.

O glifosato (Figura 5), fórmula empírica $C_3H_8NO_5P$, é o princípio ativo de um herbicida pós-emergente de amplo espectro (Roundup®) conhecido pela ação herbicida altamente efetiva sobre plantas anuais e perianuais (FRANZ et al., 1997). O composto é um ácido orgânico fraco, e apresenta um aminoácido glicina e uma porção fosfonometil. Este herbicida é usualmente formulado como sal do glifosato e um cátion (isopropil-amina ou trimetilsulfônio) (Figura 6).

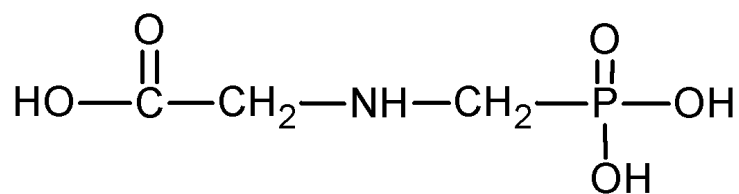


FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO

FONTE: KAMRIN, M. A. Glyphosate. In: Pesticide Profiles: Toxicity, environmental impact, and fate. Kamrin, M. A. (Ed.). CRC Lewis Publishers: Boca Raton. 676 p., 1997.

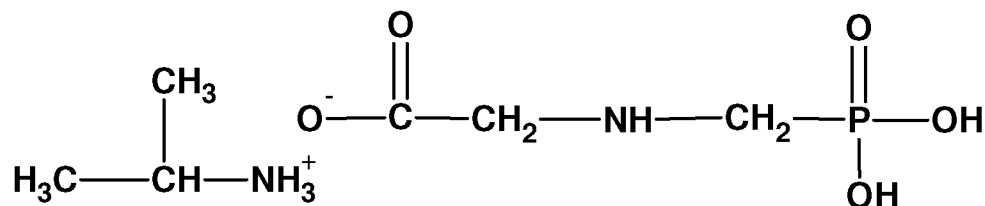


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO SAL DO ÁCIDO DESPROTONADO DO GLIFOSATO E SEU CÁTION (ISOPROPIL-AMINA)

FONTE: WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. Reg. Toxicol. Pharmacol., Orlando, v. 31, p. 117-165, 2000.

Como já mencionado para os herbicidas fosfonados, o destino do glifosato através do solo é fortemente dependente de suas propriedades físico-químicas em meio aquoso, da solubilidade em água, capacidade de complexação com metais (MADSEN et al., 1978; MOTEKAITIS & MARTELL, 1985) e adsorção a constituintes do solo (McCONNEL & HOSSNER, 1989; PICCOLO & CELANO, 1993).

O glifosato é um composto anfotérico e pode ser ânion monovalente e divalente em pH fisiológico, por apresentar valores de pK_a de 2,2 a 2,6 (pK_{a1}), 5,5 a 5,9 (pK_{a2}), e 10,1 a 10,9 (pK_{a3}) (MERVOSH & BALKE, 1991). Devido a alta polaridade desta molécula, o glifosato é praticamente insolúvel em solventes orgânicos (WILLIAMS et al., 2000).

Este herbicida apresenta três grupos funcionais (grupo amina, carboxílico, e fosfato), os quais, em pH neutro, poderiam coordenar fortemente com íons metálicos (PEARSON, 1963), onde o grupo carboxílico e o fosfato estariam desprotonados.

2.7.2 Biotransformação do Glifosato

A velocidade de degradação do glifosato em diferentes solos e na água varia de acordo com o grau de atividade microbiana do solo e a presença de certos íons metálicos (BARJA et al., 2001), tais como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} e

Cu²⁺ (SMITH & RAYMOND, 1988; HEINEKE et al., 1994; CLARKE et al., 1989).

O glifosato, administrado oralmente, sofre pouca biotransformação em animais. Administrado a ratos, uma única dose oral de 6,7 mg.kg⁻¹, verificou-se que somente 15% da dose foi absorvida em machos e 15-35% em fêmeas. A excreção da quantidade absorvida foi quase inteiramente através da urina. A excreção biliar e pela circulação entero-hepática ocorreu em menor extensão, e menos de 1% da dose foi expirada como CO₂. Em 48 horas, os animais machos eliminaram aproximadamente 94-98% do glifosato, enquanto que as fêmeas eliminaram 82-84% (WILLIAMS et al., 2000).

O ácido aminometilfosfônico (AMPA), o único metabólito do glifosato encontrado em quantidades significativas em sistemas biológicos, é moderadamente (~20%) absorvido pelo trato digestivo, e a excreção ocorre quase totalmente pela urina (SMITH & OEHME, 1992).

2.7.3 Toxicidade do Glifosato

O glifosato técnico é de relativamente baixa toxicidade aguda oral e dérmica. Nos Estados Unidos é classificado na categoria de toxicidade III (a escala vai de I - mais tóxico - a IV - menos tóxico) e, no Brasil, sua classificação segundo a ANVISA é toxicidade classe IV (ANVISA, 2003).

A tabela 5 mostra os valores de DL50 conforme a modalidade de administração e a espécie animal utilizados. A DL50 oral média do glifosato para ratos é de 4.873 mg.kg⁻¹, e a DL50 intraperitoneal é de 235 mg.kg⁻¹ (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – USA/NTP, 1992). Entretanto, o produto comercial Roundup® é mais tóxico do que o glifosato (COX, 1998). A quantidade de Roundup® (contendo glifosato e o surfactante POEA - polioxietileno) necessária para causar a morte de ratos é aproximadamente 1/3 da quantidade de glifosato sozinho (MARTINEZ & BROWN, 1991).

YOUSEF et al. (1995) investigaram o efeito do glifosato técnico sobre as características do sêmen de coelhos tratados com o herbicida verificando o declínio: no peso corporal dos animais, libido, volume de ejaculação, concentração de espermatozoides, osmolaridade e concentração de frutose no sêmen.

TABELA 5 - DADOS DE TOXICIDADE AGUDA DO GLIFOSATO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS - 1992

Espécie utilizada	Administração	DL50 (mg.kg ⁻¹ de peso corpóreo)
Rato	Oral	4.873
Rato	Intraperitoneal	235
Camundongo	Oral	1.568
Camundongo	Intraperitoneal	130
Coelho	Oral	3.800

FONTE: NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (USA/NTP)

A administração de Roundup (36% de glifosato e 18% de polioxietileno) a ratas em doses de 500, 750 e 1.000 mg.kg⁻¹ do 6º ao 15º dia da gravidez, um período definido como crítico para o desenvolvimento estrutural do estágio embriogênico de ratos (OMS, 2001), induziu um retardo no desenvolvimento ósseo, principalmente do crânio e ossos das patas (DALLEGRAVE et al., 2003). Entretanto, a toxicidade materna observada neste estudo mostra que a formulação comercial vendida no Brasil é mais tóxica do que o glifosato técnico, como demonstrado por ADAM et al. (1997) e DALLEGRAVE et al. (2002).

Utilizando doses de 4,87, 48,7 e 487 mg.kg⁻¹ de Glifosato-Biocarb®, administradas a cada dois dias, durante 75 dias a ratos machos adultos, BENEDETTI et al. (2004) observaram estímulo significativo das enzimas aspartato-aminotransferase (AST) somente na dose de 487 mg.kg⁻¹, e alanina aminotransferase (ALT) a partir da dose de 4,87 mg.kg⁻¹. Uma grande deposição de colágeno e mudanças no número e na espessura das fibras de reticulina na dose de 487 mg.kg⁻¹ também foram observadas.

Um estudo comparativo entre o glifosato puro e formulado (Roundup Ultra 360 SL), PIENIAZEK e colaboradores (2004) verificaram após uma hora de incubação com o produto formulado um aumento nos níveis de metahemoglobina, na lipoperoxidação e lise de eritrócitos humanos, bem como aumento da atividade da enzima catalase, quando eritrócitos foram tratados com doses de 100-1500 ppm de glifosato comercial. Entretanto não foram observadas mudanças nos níveis de glutathiona reduzida. Estes autores concluíram que o Roundup Ultra 360 SL provoca mudanças mais acentuadas na função dos eritrócitos do que sua substância ativa, o glifosato, as quais resultam provavelmente das propriedades de aditivos presentes

na formulação.

Embora o glifosato seja considerado um herbicida relativamente seguro e de baixa toxicidade, vários casos de intoxicação com o uso deste herbicida já foram relatados. Dentre eles destacam-se alguns intencionais, 80 casos, onde os efeitos observados foram hemorragia e erosão do trato gastrointestinal (66%) além de alterações em outros órgãos como: pulmão (23%), fígado (19%), sistema cardiovascular (18%), sistema renal (14%) e sistema nervoso central (12%) (TALBOT et al., 1991). Segundo TALBOT et al. (1991) a quantidade estimada de Roundup® (41%) ingerida pelas pessoas que não sobreviveram foi de 184 ± 70 mL. A maioria das mortes ocorreu dentro de algumas horas após a ingestão do herbicida.

LIOTI et al., (1998) verificaram atividade citotóxica e estímulo da atividade da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase em cultura de linfócitos bovinos sugerindo que o praguicida testado induz estresse oxidativo ou efeito mutagênico nesta espécie. Reforçam ainda a hipótese de indução de estresse oxidativo os resultados obtidos por PELUSO et al., (1998) onde os autores verificaram a indução da formação de adutos de ADN no rim e fígado de camundongos e aumento da atividade da catalase hepática em ratos tratados com glifosato comercial. Foram observadas também diminuição da atividade da citocromo P-450 e atividade monooxigenase hepática (HIETANEN et al., 1983) em ratos tratados com glifosato (Roundup®).

VAINIO et al., (1983) observaram que a administração oral de glifosato, $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ cinco dias por semana durante 60 dias, não provocou a proliferação de peroxissomos dos hepatócitos ou hipolipidemia nos animais tratados. Em outro estudo do mesmo grupo, onde os ratos foram tratados com roundup $1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante 14 dias, também não foram observadas alterações nos níveis da beta-oxidação nos peroxissomos hepáticos, no conteúdo de glutathione reduzida, além da ausência de efeitos sobre o ganho de peso corporal, sobre o peso do fígado, e sobre a quantidade de proteína peroxisomal (HIETANEN et al., 1983).

OLORUNSOGO et al. (1979), utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de ratos tratados intraperitonealmente com glifosato técnico ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), sacrificados 5 horas após, observaram: (a) inibição do estado 3 (~42%); (b) estímulo do estado 4 (~10%); (c) inibição do coeficiente de controle respiratório (~45%), (d) estímulo da

atividade da ATPase (~480% com $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), (e) estímulo das enzimas isocitrato desidrogenase (~11%), beta-hidroxibutirato desidrogenase (~20%), glutamato desidrogenase (~40%) e succinato desidrogenase (~27%). As atividades das enzimas citocromo *c* oxidase, succinato citocromo *c* redutase e NADH citocromo *c* redutase não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas àquelas do controle. Baseado nestes resultados, estes autores sugeriram que estes efeitos tóxicos poderiam ser primariamente devido a um efeito desacoplador mitocondrial deste herbicida (OLORUNSOGO et al., 1979). O mesmo autor relata decréscimo de atividade da transidrogenase (OLORUNSOGO, 1982) e redução na razão NADH/NAD^+ mitocondrial (OLORUNSOGO, 1980).

Em outro estudo, OLORUNSOGO (1990) verificou um aumento na permeabilidade a prótons da membrana mitocondrial, e que a entrada de Ca^{2+} na organela energizada por succinato ou ATP, foi inibida por doses que variaram de $0,075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de glifosato. Porém, o autor se refere a este efeito como uma habilidade do glifosato em agir como quelante de íons.

Por outro lado, ARNAUD et al. (1993) realizaram experimentos com mitocôndrias intactas de batata, e verificaram que este herbicida em concentrações até $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ não afetou o consumo de oxigênio das preparações mitocondriais, sugerindo que o glifosato não é capaz de atravessar a membrana mitocondrial interna em concentração suficiente para afetar a respiração mitocondrial. Como conseqüência, este composto não poderia agir como desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial (ARNAUD et al., 1993). Usando $[\text{C}^{14}]$ -glifosato, ARNAUD et al. (1993) mostrou que o glifosato não foi capaz de atingir uma concentração suficiente na matriz mitocondrial, e por não ter mobilidade suficiente entre os espaços interno e externo, não seria capaz de transportar prótons na mesma velocidade em que são produzidos durante a transferência de elétrons do NADH endógeno ao O_2 .

Outros aspectos toxicológicos do glifosato foram analisados por WILLIAMS et al. (2000). Os autores abordaram aspectos relacionados a absorção oral e dérmica, bioacumulação nos tecidos, genotoxicidade, danos ao ADN, entre outros, e concluíram que dentro dos padrões estabelecidos, o herbicida não ofereceu risco à saúde humana.

3 JUSTIFICATIVA

A realização deste trabalho justifica-se porque o Estado do Paraná encontra-se entre aqueles de maior produção agrícola do país, utilizando-se de substâncias químicas como um recurso no combate de pragas que atacam diversas culturas, que formarão os alimentos que compõe a cesta básica da população paranaense e brasileira.

Como xenobióticos, os praguicidas podem tanto interagir com membranas biológicas, alterando suas propriedades físico-químicas e fisiológicas, quanto comprometer atividades metabólicas provocando danos celulares. Sendo assim, lipossomas construídos artificialmente constituem uma importante alternativa experimental para o entendimento dos danos de membrana causados por tais agentes (ANTUNES-MADEIRA et al., 1980); as mitocôndrias isoladas também representam um interessante modelo para estudos toxicológicos, pois, além de possibilitar uma análise das conseqüências de tais compostos no ambiente da membrana, permite também uma visão em termos da atividade metabólica.

A revisão bibliográfica mostra estudos que relatam a ação destes praguicidas sobre diversos modelos experimentais *in vitro*. Porém, não existem dados na literatura sobre os efeitos da deltametrina sobre mitocôndrias de fígado de rato, e apenas alguns trabalhos relatam efeitos do glifosato sobre este modelo experimental. Dentre estes, o realizado por OLORUNSOGO et al. (1979), refere-se ao glifosato (na forma de sal de isopropilamina) como um desacoplador da fosforilação oxidativa, devido aos efeitos observados em mitocôndrias de fígado de rato, 5 horas após uma injeção intraperitoneal de glifosato $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Por outro lado, ARNAUD et al. (1993) mostraram que em mitocôndrias de batata, o glifosato [N-(fosfometil)-glicina] até $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ não tem efeito desacoplador. Estas informações revelam uma discrepância de efeitos e, portanto, a avaliação dos efeitos do glifosato sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato é necessária para elucidar o modo de ação deste praguicida na organela.

No presente trabalho, a deltametrina e o glifosato, foram estudados quanto ao mecanismo de ação e a toxicidade. Para tanto, seus efeitos foram determinados em mitocôndrias extraídas de fígado de rato e, em animais submetidos a um tratamento subcrônico com baixas doses de deltametrina, foram realizados testes

comportamentais. Estes últimos foram motivados por dados da literatura que revelam uma associação entre transtornos psiquiátricos como a depressão e alto índice de suicídios entre agricultores que faziam uso de agrotóxicos no Estado do Paraná. Parâmetros relacionados ao comportamento, especialmente aqueles indicativos de comportamento depressivo foram avaliados, sendo estes experimentos realizados com a colaboração do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Desta maneira, o presente estudo pretende contribuir com uma avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* da deltametrina, sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais, e *in vitro* do glifosato, sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético mitocondrial.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da deltametrina e do glifosato sobre mitocôndrias de fígado de rato e parâmetros relacionados com as propriedades de membranas naturais e artificiais, visando contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação destes praguicidas.

Foram objetivos específicos deste trabalho para a deltametrina e para o glifosato avaliar:

1) a interação dos praguicidas sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias acopladas de fígado de rato;

2) os efeitos sobre enzimas da cadeia respiratória mitocondrial;

3) o efeito sobre a atividade da enzima F_1F_0 -ATPase mitocondrial;

4) o efeito sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas com glutamato ou succinato;

5) o efeito sobre o potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$);

6) o efeito sobre o inchamento mitocondrial na ausência de substrato oxidável, utilizando valinomicina e potássio;

7) o efeito sobre membranas artificiais e naturais a fim de conhecer seus efeitos sobre a permeabilidade e fluidez de membrana.

8) o efeito da deltametrina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial e a possibilidade deste fenômeno estar envolvido no mecanismo de toxicidade deste praguicida.

9) o efeito sobre a lipoperoxidação;

10) a capacidade destes praguicidas promoverem *in vitro* a liberação de ferro da ferritina, utilizando a ferritina de baço de cavalo como modelo.

Considerando as evidências de alteração de parâmetros comportamentais, em relação a deltametrina, foram incluídos testes *in vivo* visando avaliar alterações no comportamento de ratos submetidos a um tratamento subcrônico com este praguicida. Para tanto os objetivos específicos foram avaliar:

1) o efeito do tratamento repetido com deltametrina no comportamento de ratos submetidos a um modelo animal de ansiedade;

2) a atividade motora dos animais ao final do período de tratamento utilizando o teste de campo aberto;

3) o efeito ansiogênico da deltametrina através do teste do labirinto em cruz elevado;

4) o comportamento dos animais no teste de natação forçada;

5) a preferência dos animais por uma solução de sacarose, como índice de depressão, bem como o ganho de peso corporal dos animais durante o tratamento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AVALIAÇÃO ÉTICA

A Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná certificou que os procedimentos utilizando animais descritos na seção Materiais e Métodos, estão de acordo com os princípios éticos de pesquisa estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO I).

5.2 REAGENTES

Glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, EGTA, EDTA, rotenona, FCCP, manitol, Hepes, BSA, fosfoenolpiruvato, valinomicina, oligomicina, citocromo *c*, DCIP, ferritina e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA). Sacarose, hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, sulfato de ferro foram adquiridos da Merck do Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultrafiltrada através de sistema purificador Millipore MilliQ.

5.3 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos brancos da linhagem Wistar, machos, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Para o isolamento de mitocôndrias foram utilizados animais pesando 200 a 300 g. Os animais foram alimentados com ração Purina® e antes dos experimentos foram colocados em jejum por 12 horas com água *ad libitum*. Os animais foram mortos por decapitação, sem anestesia, e o fígado foi rapidamente retirado e colocado no meio de extração, sendo mantidos em banho de gelo durante todo o processamento.

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados animais pesando 300 a 350 g e aproximadamente 100 dias de idade (adultos).

5.4 PRAGUICIDAS

Deltametrina técnica [lote 99027 com 99,2% (m/m) de pureza], foi gentilmente cedida pelo Laboratório Farmacêutico Aventis CropScience Brasil Ltda, São Paulo - SP. Glifosato Técnico ou N-(fosfometil)-glicina [lote GLP-9607-7215-A 95,86% (m/m) de pureza], foi gentilmente cedido pela Monsanto do Brasil Ltda, São José dos Campos - SP.

O praguicida deltametrina, sólido branco, inodoro, em concentração adequada para cada experimento realizado foi dissolvido em DMSO; e levando-se em conta os dados de estudos preliminares e testes realizados, as doses selecionadas e utilizadas nos experimentos *in vitro* foram de: 10 a 200 nmol·mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

O herbicida fosfonado Glifosato, sólido branco úmido e inodoro, foi solubilizado no tampão de cada experimento e foi utilizado em doses que variaram de 0,4 a 12,8 µmol·mg⁻¹ de proteína mitocondrial, estabelecidas após ensaios preliminares.

5.5 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

5.5.1 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

O isolamento de mitocôndrias para experimentos de determinação do consumo de O₂ foi realizado segundo VOSS et al. (1961) utilizando como meio de extração: Sacarose 250 mmol·L⁻¹, Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol·L⁻¹ e soroalbumina bovina (BSA) 0,1g%.

Os animais foram sacrificados e os fígados foram removidos, lavados com o meio de extração e cortados em pequenos pedaços sendo mantidos à temperatura máxima de 4°C. O homogeneizado de fígado foi obtido utilizando-se o homogeneizador de Van Potter Elvehjen por três vezes com o pistilo frouxo e duas vezes com o apertado. O homogeneizado obtido foi então centrifugado por 5 minutos a 320 × g em centrífuga refrigerada a 4°C (Hitachi modelo CR21E). O sobrenadante desta centrifugação foi centrifugado novamente a 12.600 × g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de extração e novamente

centrifugado a $8.100 \times g$ por 10 minutos. Este procedimento foi executado mais uma vez. Por fim, obteve-se uma suspensão mitocondrial, com concentração protéica final variando de 20 a $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.5.2 Obtenção de Mitocôndrias de Fígado de Rato Rompidas para Avaliação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais

Mitocôndrias intactas isoladas de fígado de rato como descrito no item anterior foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização, quando então foram rompidas por choque térmico (congelamento e descongelamento por 3 vezes) e mantidas a 4°C . Os fragmentos de membrana obtidos foram utilizados para avaliação dos segmentos enzimáticos da cadeia respiratória.

5.5.3 Isolamento de Mitocôndrias para a Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Partículas Submitocondriais

Todas as etapas do isolamento das mitocôndrias e obtenção das partículas submitocondriais (PMS) foram realizadas a 4°C , e todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrafiltrada (Milli Q[®]). As mitocôndrias foram isoladas segundo método de MUSCARI et al. (1990). O fígado de quatro ratos foi removido e homogeneizado no meio A constituído de $\text{KCl } 180 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{EDTA } 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, e BSA 0,5%. O homogeneizado foi obtido como no procedimento já descrito no item 5.5.1, e centrifugado a $1.500 \times g$ por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 4°C . O sobrenadante foi então centrifugado duas vezes a $8.000 \times g$ por 10 minutos utilizando o meio B constituído de $\text{KCl } 180 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{EDTA } 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, BSA 0,5%. Na seqüência, o *pellet* foi resuspenso no meio C, sem EDTA, constituído de $\text{KCl } 180 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, BSA 0,5% e acondicionado em nitrogênio líquido.

5.5.3.1 Obtenção de Partículas Submitocondriais (PSMs)

As PSMs foram obtidas de acordo com PENIN et al. (1982). As

mitocôndrias obtidas como descrito no item anterior foram descongeladas e ressuspensas para uma concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meio constituído de KH_2PO_4 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4. A suspensão foi centrifugada a $105.000 \times g$ por 60 minutos e o precipitado foi ressuspenso em meio constituído de sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Tris-HCl $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, e submetido a centrifugação a $11.500 \times g$ por 15 minutos, para eliminar remanescentes de membrana externa. O *pellet* foi ressuspenso em meio constituído de sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris- H_2SO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ATP $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e MgSO_4 $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5. A suspensão, mantida a 4°C , foi sonicada por três minutos a 60 Watts e centrifugada a $22.500 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi centrifugado a $105.000 \times g$ por 75 minutos e o precipitado constituído de partículas submitocondriais ressuspenso em meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris- H_2SO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e MgSO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5. Esta última centrifugação foi repetida mais uma vez, e a preparação foi acondicionada em nitrogênio líquido.

Tanto para a realização desses procedimentos como para os estudos com partículas submitocondriais, a vidraria utilizada foi previamente lavada com ácido clorídrico 5% (v/v), e enxaguada exaustivamente com água Milli Q.

5.5.4 Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Inchamento Mitocondrial

Mitocôndrias de fígado de rato utilizadas para determinação do inchamento mitocondrial, foram isoladas segundo o método descrito por MUSTAFA et al. (1966), com pequenas modificações. Os animais foram sacrificados e os fígados processados como no item 5.5.1. O meio de extração foi constituído de: sacarose $330 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5 e EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que na última centrifugação o meio de extração não continha EDTA.

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.6.1 Determinação do Consumo de O₂, Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório e Razão ADP/O

O consumo de O₂ por mitocôndrias intactas, foi determinado utilizando eletrodo de oxigênio, tipo Clark, em oxígrafo Gilson, termostaticado a 28°C. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 175 mmol·L⁻¹, KCl 50 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 10 mmol·L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol·L⁻¹ e MgSO₄ 2 mmol·L⁻¹ (PETRESCU & TARBA, 1997).

O meio de reação foi suplementado com succinato de potássio 10 mmol·L⁻¹, rotenona 1 μmol·L⁻¹, ADP 0,1 mmol·L⁻¹, ou com glutamato de potássio 10 mmol·L⁻¹ e ADP 0,2 mmol·L⁻¹. A quantidade de mitocôndrias utilizada em cada experimento, expressa com relação a concentração de proteínas, foi de 1 mg·mL⁻¹ quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e de 2 mg·mL⁻¹ quando substrato foi o glutamato de sódio.

As velocidades respiratórias foram expressas em nmol de O₂ consumido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína, considerando-se a solubilidade do O₂ na água, a 28°C e a 1 atm, de 235 μmol·L⁻¹ (ESTABROOK, 1967). A razão ADP/O foi determinada como descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955). O coeficiente de controle respiratório (CCR), foi obtido da relação entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade respiratória após o consumo de ADP (estado 4).

As mitocôndrias foram pré-incubadas por dois minutos na presença do praguicida deltametrina ou do herbicida glifosato nas concentrações indicadas no item 5.4. A respiração foi iniciada pela adição do substrato (L-glutamato ou succinato), sendo que os valores de velocidade da respiração (% do controle) foram representados contra as concentrações de deltametrina e glifosato. Controles com DMSO (solvente da deltametrina) foram realizados em cada situação experimental, tendo sido observado que nas condições em que os experimentos foram desenvolvidos o DMSO não interferiu nas atividades avaliadas.

5.6.2 Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) foi determinado em espectrofluorímetro modelo RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) analisando-se a variação de fluorescência promovida pela captação de safranina O (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976). O comprimento de onda de excitação e de emissão utilizado foi 495 e 586 nm, respectivamente, e as aberturas das fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 3 nm (WEICKOWSKI & WOJTCZAK, 1998). A reação ocorreu a 28°C em volume final de 2mL. O meio foi constituído de: sacarose 250 mmol·L⁻¹, tampão MOPS 20 mmol·L⁻¹, pH 7,2, mitocôndrias (0,5 mg·mL⁻¹), safranina O 5 µmol·L⁻¹, succinato de sódio 3 mmol·L⁻¹, NaH₂PO₄ 2 mmol·L⁻¹, e rotenona 1 µmol·L⁻¹.

5.6.2.1 Curva de Calibração para o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna ($\Delta\psi$)

As curvas de calibração foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por ÅKERMAN & WIKSTRÖM (1976), onde mediu-se o potencial de membrana desenvolvido pela difusão de K⁺ na presença de valinomicina (0,2 µg·mL⁻¹). O potencial foi calculado utilizando a equação de Nernst (equação 1), como descrito por ROSSI & AZZONE (1969).

Equação 1: Equação de Nernst

$$\Delta\psi = 60 \cdot \log \left[\frac{K^+ (\text{in})}{K^+ (\text{out})} \right] \quad \text{onde } K^+ (\text{in}) = 120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

A adição de succinato de sódio ao meio de reação livre de K⁺, contendo mitocôndrias de fígado de rato e valinomicina, um ionóforo para o K⁺, induziu um aumento na diferença de fluorescência do corante no par de comprimentos de onda 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) (Figura 7). Esta variação na fluorescência indica a ligação das moléculas do corante na face interna da membrana mitocondrial interna (ZANOTTI & AZZONI, 1980) e corresponde ao estabelecimento de um

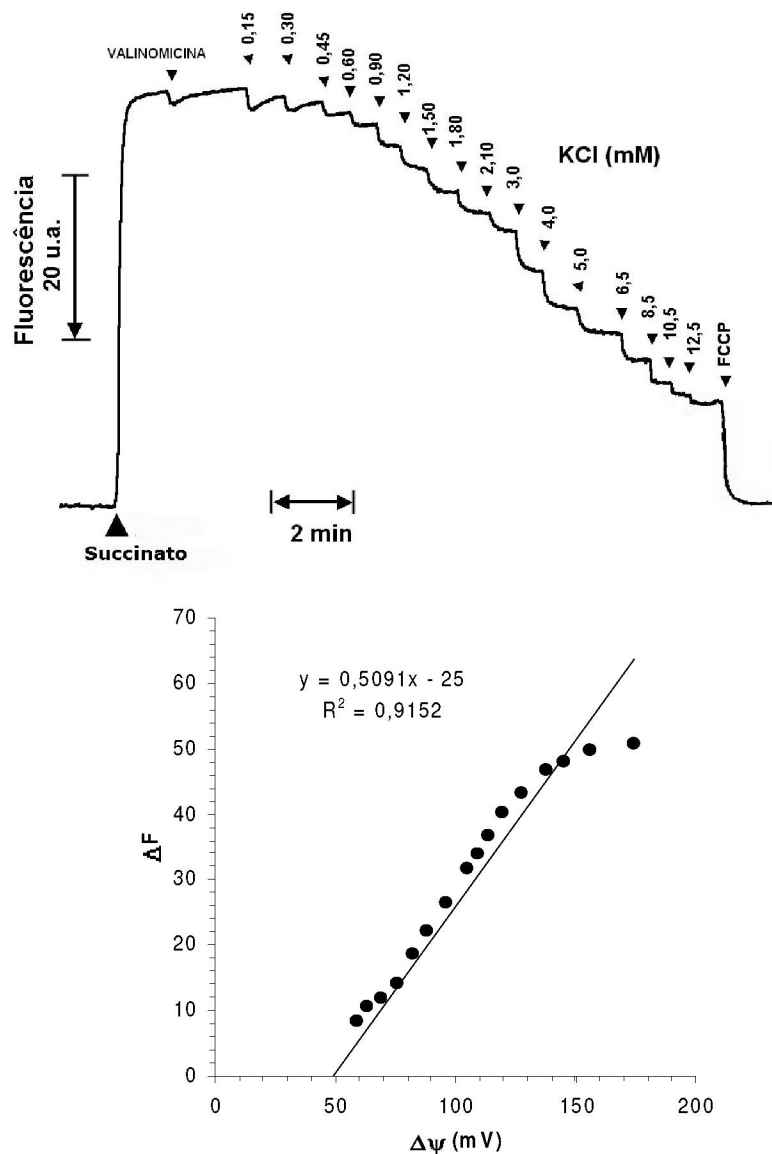


FIGURA 7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA UTILIZANDO SAFRANINA O

NOTA: (A) refere-se a alterações na intensidade de fluorescência da safranina induzidas pelo potencial de difusão de potássio e (B) refere-se a curva de calibração em função das variações de fluorescência da safranina O. O sistema de reação foi constituído de: sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão MOPS $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, mitocôndrias ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), safranina O $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaH_2PO_4 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e succinato de sódio $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As adições de valinomicina ($0,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de KCl e FCCP ($1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram feitas como indicado na figura.

potencial de membrana (ÅKERMAN & WIKSTRÖN, 1976). Adições sucessivas de íons K^+ , na presença de valinomicina, resultam na diminuição progressiva da fluorescência da safranina *O* (Figura 7 A), pois a entrada do cátion na matriz mitocondrial neutraliza cargas internas negativas e conseqüentemente promove uma diminuição no potencial elétrico da membrana. Desta forma, menos moléculas de safranina estarão ligadas à membrana. Uma relação linear foi obtida entre o grau de mudança induzido na faixa de 54 a 174 mV (Figura 7 B). Observa-se que a intersecção ocorre em um potencial de aproximadamente 50 mV, que é correspondente a um potencial de Donnan, e que está de acordo com os valores encontrados por ÅKERMAN & WIKSTRÖN (1976) em mitocôndrias de fígado de rato.

5.6.3 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração protéica das preparações mitocondriais foi determinada pelo método LOWRY et al. (1951), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas em 700 nm em espectrofotômetro Hitachi mod. U-2001 UV/Vis.

5.6.4 Determinação da Atividade das Enzimas Ligadas à Cadeia Respiratória

5.6.4.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Oxidorredutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada polarograficamente como recomendado por SINGER (1974). O sistema de reação a 28°C e em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol·L⁻¹ e 20 µg de proteína mitocondrial. A preparação de mitocôndrias rompidas foi incubada por 2 minutos com concentrações variáveis dos compostos em questão e a reação foi iniciada pela adição de NADH (0,17 mmol·L⁻¹). Os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O₂ em água e a 28°C, em 1 atm, de 235 µmol·L⁻¹ (ESTABROOK, 1967).

5.6.4.2 NADH Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: Ferricianeto Oxidorredutase)

A atividade da NADH desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico de SINGER (1974), utilizando-se o ferricianeto como aceitador de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL e a 28°C foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol·L⁻¹, ferricianeto de potássio 600 µmol·L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A enzima foi incubada por dois minutos em cada concentração da droga. A reação foi iniciada pela adição de NADH para a concentração final de 150 µmol·L⁻¹ e foi monitorada em 420 nm. A velocidade de redução do ferricianeto foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o ferricianeto $\epsilon_{420} = 1.040 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol de ferricianeto reduzido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína.

5.6.4.3 NADH Citocromo c Redutase (EC 1.6.99.3 – NADH: Citocromo c Óxidorredutase)

A atividade da NADH citocromo c redutase foi determinada pelo método descrito por SOMLO (1965). O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol·L⁻¹, NADH 50 µmol·L⁻¹, citocromo c (oxidado) 40 µmol·L⁻¹, NaCN 1 mmol·L⁻¹ e 20 µg de proteína mitocondrial. A preparação foi incubada por dois minutos com cada concentração do pesticida. A reação foi realizada a 28°C, e iniciada pela adição de citocromo c oxidado. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada em 550 nm, e para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19.000 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em nmol de citocromo c reduzido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

5.6.4.4 Succinato Oxidase (NADH: Oxigênio Óxidorredutase)

A determinação da atividade da succinato oxidase foi realizada polarograficamente através da determinação do consumo de oxigênio no oxígrafo. O

sistema de reação a 28°C e em volume final de 1,3mL foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol·L⁻¹, rotenona 1 µmol·L⁻¹ e 750 µg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram incubadas por dois minutos com cada concentração do praguicida. A reação foi iniciada pela adição de succinato de potássio 20 mmol·L⁻¹, e a velocidade de consumo de oxigênio foi registrada. Os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O₂ em água a 28°C e 1atm, de 235 µmol·L⁻¹ (ESTABROOK, 1967).

5.6.4.5 Succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1 - Succinato: Fenazina Metasulfato Óxidoreductase)

A atividade da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se o sistema diclorofenolindol (DCPIP) e fenazina-metasulfato (PMS) como aceitadores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato de sódio 50 mmol·L⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol·L⁻¹, NaCN 1 mmol·L⁻¹, rotenona 1 µmol·L⁻¹, EDTA 2 mmol·L⁻¹ e 20 µg proteína mitocondrial. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C para ativação da enzima, e, posteriormente por 2 minutos na presença do praguicida. A reação iniciada pela adição de DCPIP 60 µmol·L⁻¹ e PMS 1 mmol·L⁻¹. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada em 600 nm e os resultados foram expressos em µmol de DCPIP reduzido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100 (mol/L)⁻¹·cm⁻¹ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

5.6.4.6 Succinato Citocromo c Redutase (EC 1.3.99.1 - Succinato: Ferrocitocromo c Óxidoreductase)

A atividade da succinato citocromo c redutase foi determinada pelo método de SOMLO et al. (1965), medindo-se a redução do citocromo c, após o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN e rotenona.

O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, EDTA $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCN $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato de sódio $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g}$ de proteína mitocondrial. A preparação foi incubada com o praguicida por dois minutos a 28°C e a reação foi iniciada pela adição de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ do citocromo *c* e acompanhada espectrofotometricamente em 550 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de citocromo *c* reduzido $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19.000 (\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

5.6.4.7 Obtenção do Ferrocitocromo *c* para determinação da Citocromo *c* Oxidase

O citocromo *c* $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi reduzido pela adição de ditionito de sódio. A preparação foi então cromatografada em coluna de Sephadex G-25, separando-se o ferrocitocromo *c* do excesso de ditionito (YONETANI & RAY, 1965).

A concentração do citocromo *c* reduzido foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $27.700 (\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para a heme proteína reduzida (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo *c* preparado por este método contém menos de 5% da proteína oxidada.

5.6.4.7.1 Citocromo *c* Oxidase (EC 1.9.3.1 - Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxidoreductase)

A atividade da citocromo *c* oxidase foi determinada segundo o método espectrofotométrico de MASON et al. (1973). O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, EDTA $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ferrocitocromo *c* $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g}$ proteína mitocondrial. A enzima foi incubada por dois minutos com cada concentração do praguicida. A reação foi acompanhada em 550 nm utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19.000 (\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* oxidado $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

5.6.5 Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Intactas, Rompidas e Desacopladas com FCCP e em Partículas Submitocondriais (PSM)

Para determinação da atividade de hidrólise de ATP pela F_1F_0 -ATPase foram utilizadas tanto mitocôndrias como partículas submitocondriais (PSM) obtidas como descrito nos itens 5.5.1 e 5.5.3, respectivamente.

5.6.5.1 Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Intactas

A atividade da F_1F_0 -ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada através do método de PULLMAN et al. (1960). O sistema de reação foi constituído de: sacarose $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão Tris-HCl $12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, KCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 2 mg proteína mitocondrial. O volume da reação foi de 1 mL e a temperatura mantida em 28°C . A reação foi iniciada com a adição de ATP $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos adicionou-se solução de TCA em concentração final de 5% e em seguida, o material foi centrifugado a $7.800 \times g$, durante um minuto e o fosfato inorgânico liberado foi dosado segundo o método de SUMNER (1944). Os resultados foram expressos em $\text{nmol de fosfato liberado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

5.6.5.2 Determinação da Atividade da F_1F_0 -ATPase em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da F_1F_0 -ATPase em preparações mitocondriais rompidas por choque térmico, foi determinada na presença de um sistema regenerador de ATP segundo o método descrito por PULLMAN et al. (1960).

O sistema de reação e volume final de 1 mL foi constituído de: tampão Tris-HCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 8,4, MgSO_4 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, PEP $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, piruvato quinase (PK) 3 unidades (1 unidade de PK converte $1 \mu\text{mol}$ de PEP a piruvato em 1 minuto a 37°C em pH 7,6) e 2 mg proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, a 30°C e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a $7.800 \times g$, por um minuto em temperatura

ambiente e o fosfato inorgânico liberado dosado pelo método de SUMNER (1944).

Os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína.

5.6.5.3 Determinação da Atividade da F₁F₀-ATPase em Mitocôndrias Tratadas com Carbonil Cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP)

A atividade da F₁F₀-ATPase em mitocôndrias desacopladas foi determinada através do método de PULLMAN et al. (1960). O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmol·L⁻¹, tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 7,4, KCl 50 mmol·L⁻¹, 2 mg de proteína mitocondrial e suplementado com FCCP 1 µmol·L⁻¹. O volume da reação foi de 1 mL e a temperatura mantida em 30°C.

A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol·L⁻¹ e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos, TCA foi adicionado em concentração final de 5%. Em seguida, o material foi centrifugado a 7.800 × g, durante um minuto e o fosfato inorgânico liberado foi dosado segundo o método de SUMNER (1944). Os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína.

5.6.5.4 Determinação da Atividade da F₁F₀-ATPase em Partículas Submitocondriais

A atividade da F₁F₀-ATPase foi determinada em partículas submitocondriais através da dosagem do fosfato inorgânico liberado. O meio de reação foi constituído de sacarose 100 mmol·L⁻¹, KCl 80 mmol·L⁻¹ e HEPES-KOH 50 mmol·L⁻¹ em volume final de 1 mL. As partículas submitocondriais (10 µg de proteína) foram incubadas no meio, e a reação enzimática foi iniciada pela adição de ATP 4 mmol·L⁻¹. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de TCA 30% ao sistema. A quantidade de Pi liberado foi medida de acordo com SUMNER (1944) e os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado·min⁻¹·mg⁻¹.

5.6.6 Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre o Inchamento Mitocondrial

5.6.6.1 Determinação do Inchamento Mitocondrial na Presença de Acetato de Sódio

Suspensões mitocondriais de fígado de rato, isoladas como já descrito no item 5.5.4, foram utilizadas para avaliar os efeitos da deltametrina e do glifosato sobre o inchamento mitocondrial. A determinação do inchamento mitocondrial, foi realizada pelo método espectrofotométrico de SEPPALA et al. (1973), sendo a variação na absorvância acompanhada em 546 nm. O meio de reação em volume final de 3 mL foi constituído de: sacarose $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão Tris-HCl $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1 ou 2 mg de proteína mitocondrial. O succinato de sódio ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou glutamato de sódio ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), foram utilizados como substratos e adicionados depois de dois minutos de incubação das mitocôndrias com deltametrina ($10\text{-}200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial) ou glifosato ($0,4\text{-}12,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial). Após a observação do inchamento, adicionou-se NaCN ($1,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou rotenona ($4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), verificando-se então a contração da organela, quando succinato ou L-glutamato foram os substratos, respectivamente.

5.6.7 Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K^+

O inchamento mitocondrial devido a entrada de K^+ na matriz, mediada pela valinomicina, foi acompanhado espectrofotometricamente como recomendado por MORENO & MADEIRA (1990). O meio de reação em volume final de 3 mL foi constituído de: KNO_3 $135 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão Hepes $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, EDTA $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, antimicina A $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1 mg de proteína mitocondrial. A mitocôndria foi incubada por dois minutos com cada concentração do agrotóxico em questão antes da adição de valinomicina. A reação foi iniciada pela adição da valinomicina em concentração final de $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e as variações na absorvância foram acompanhadas em 546 nm.

5.6.8 Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre a Transição de Permeabilidade Mitochondrial em mitocôndrias energizadas e desenergizadas

Os experimentos de transição de permeabilidade mitocondrial foram realizados a 28°C acompanhando-se a variação da absorbância em 540 nm (BERNARDI et al., 1992) em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. A suspensão mitocondrial (0,3 mg·mL⁻¹) foi incubada a 28°C em meio contendo: sacarose 250mmol·L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol·L⁻¹, pH 7,2, suplementado com KH₂PO₄ 0,3 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 10, 25 e 50 μmol·L⁻¹; rotenona 5 μmol·L⁻¹ e succinato de potássio 3 mmol·L⁻¹ quando o inchamento foi energizado, ou suplementado com FCCP 1 μmol·L⁻¹, antimicina A 150 μg·mg⁻¹ de proteína e rotenona 5 μmol·L⁻¹ quando o inchamento foi desenergizado.

A transição de permeabilidade mitocondrial foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 540 nm (GUNTER & PFEIFFER, 1990), resultante do inchamento da organela. O efeito da deltametrina (50, 100 e 200 nmol·mg⁻¹ de proteína) foi determinado após a pré-incubação por dois minutos com a suspensão mitocondrial. Em situações específicas o efeito da deltametrina (200 nmol·mg⁻¹ de proteína) foi avaliado na presença de indutores: diamida 0,3 mmol·L⁻¹, mersalil 20 μmol·L⁻¹, FeCl₃ 100 μmol·L⁻¹, e H₂O₂ 10 mmol·L⁻¹, e na presença de inibidores: Catalase 1, 4 e 8 μmol·L⁻¹, ditioneitol (DTT) 1 mmol·L⁻¹. A ciclosporina A (CsA) na concentração final de 1 μmol·L⁻¹ foi utilizada como controle do efeito inibidor.

5.6.9 Efeitos da Deltametrina sobre a Fluidez de Membranas Artificiais e Naturais por Polarização de Fluorescência

5.6.9.1 Preparo das Membranas Artificiais (liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina - DMPC)

Os liposomas de DMPC foram preparados de acordo com a metodologia descrita por ANTUNES-MADEIRA et al. (1980), utilizando-se DMPC em

concentração final de $345 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O fosfolípido foi dissolvido em clorofórmio e o solvente foi evaporado até a secura, em evaporador rotatório, a 25°C . O filme lipídico foi então hidratado com volume adequado de tampão Tris-maleato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0, KCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e disperso por agitação manual, em banho a 30°C (7°C acima da temperatura média de transição de fase do fosfolípido). A amostra foi agitada vigorosamente durante um minuto e então submetida a ultrasonicação suave em banho de ultra-som (THORTON T 7), visando dispersar agregados e tornar a suspensão homogênea. O tempo de sonicação foi controlado pela medida da turbidez da suspensão, a 600 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U 2001 UV/VIS, até atingir uma absorvância de aproximadamente 0,2. Os liposomas preparados nestas condições são multilamelares (ANTUNES-MADEIRA et al., 1995).

5.6.9.2 Preparo das Membranas Naturais (liposomas de membranas mitocondriais)

As membranas naturais foram preparadas de acordo com a metodologia utilizada por ANTUNES-MADEIRA et al. (1980), padronizando a concentração de mitocôndrias com relação à concentração de lipídios em $345 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O procedimento foi realizado como descrito no item anterior, exceto que as mitocôndrias foram diluídas em volume adequado de tampão Tris-maleato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0, contendo KCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e PMSF $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em banho a 30°C . A amostra foi agitada vigorosamente durante um minuto e submetida a sonicação suave em banho de ultra-som (THORTON T 7). O tempo de sonicação foi controlado pela turbidez da suspensão a 600 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U 2001 UV/VIS, até atingir uma absorvância de aproximadamente 0,2.

A concentração de fosfolípidios nas preparações mitocondriais foi determinada seguindo o método de BARTLETT (1959).

5.6.9.3 Incorporação das Sondas as Membranas Artificiais e Naturais

Foram utilizadas duas sondas o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que se

localiza no interior hidrofóbico da membrana, e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA), que permanece ancorado à superfície da membrana. Estas sondas foram solubilizadas em tetrahydrofurano e dimetilformamida, respectivamente. Alíquotas das soluções concentradas das sondas foram injetadas, sob agitação vigorosa em vórtex, nas suspensões de membranas (DMPC e mitocôndrias), mantidas a 28°C. A concentração final da sonda e o quociente sonda/lipídeo foram ajustados para 1,73 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1/200 respectivamente, tanto na situação do DPH quanto do DPH-PA.

As preparações de membranas artificiais e naturais já em presença das sondas foram incubadas no escuro, durante aproximadamente 19 horas, a 8°C para evitar precipitação de proteínas. Ambas as sondas incorporam-se rapidamente às membranas multilamelares, atingindo intensidade de fluorescência constante ao fim de 90 minutos de incubação (LENTZ et al., 1976).

Para cada amostra (suspensão de membranas contendo sonda) foi preparado um controle sem sonda, contendo volume correspondente de tetrahydrofurano ou dimetilformamida (controle branco) e que sofreu tratamento igual ao da amostra. Estes controles foram utilizados na correção das medições fluorimétricas, para descontar a interferência da luz dispersa pelas partículas em suspensão (*light scattering*). As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas na presença de deltametrina ou de glifosato. Controles com o solvente utilizado na presença e ausência das sondas também foram realizados.

5.6.9.4 Medições Fluorimétricas

As medições fluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro modelo RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.), equipado com agitação constante e célula termostaticada pela circulação de água a partir de banho de circulação (PHARMACIA). O controle de temperatura foi de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Para as medições de polarização de fluorescência (P) foram utilizados polarizadores Polaroid: um, entre a amostra e o monocromador de excitação, para interceptar o feixe de excitação; outro, entre a amostra e o monocromador de emissão, para interceptar o feixe de emissão (analisador).

A amostra foi excitada pelo componente vertical da luz monocromática e foram medidas as intensidades da luz emitida quando o analisador estava orientado paralela (I_{\parallel}) e perpendicularmente (I_{\perp}) à direção de polarização da luz de excitação. As direções de polarização de I_{\parallel} e I_{\perp} foram, respectivamente, as dos eixos Z e X (Figura 8). O índice de polarização de fluorescência (P) foi calculado como recomendado por LITMAN & BARENHOLZ (1982), pelo quociente descrito na equação 2.

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) \quad (\text{Equação 2})$$

Considerando que a intensidade de I_{\parallel} e I_{\perp} foi medida depois que o feixe de luz atravessa a rede de difração do monocromador de emissão, onde ocorre dispersão e alteração da polarização, a dispersão da luz, dependente do comprimento de onda, resulta em transmissão desigual dos dois componentes da luz polarizada. Assim, foi necessário introduzir ainda um fator de correção nesta equação. A correção matemática desta distorção instrumental foi feita conforme recomendado por TOPLAK et al. (1990), introduzindo-se na equação anterior o fator:

$$G = I_{\perp}^* / I_{\parallel}^* \quad (\text{Equação 3})$$

em que I_{\perp}^* e I_{\parallel}^* correspondem às intensidades dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador estiver orientado horizontalmente. A amostra excitada com o componente horizontal da luz proveniente do monocromador de excitação deverá produzir componentes da luz emitida, vertical e horizontal idênticos, porque as probabilidades de reorientação das moléculas excitadas, durante o tempo de vida da excitação, são idênticas em todas as direções horizontal e vertical. A diferença dos componentes vertical e horizontal, depois de atravessarem o monocromador de emissão, deve-se à dispersão e, portanto, transmissão desigual desses componentes. O valor corrigido do índice de

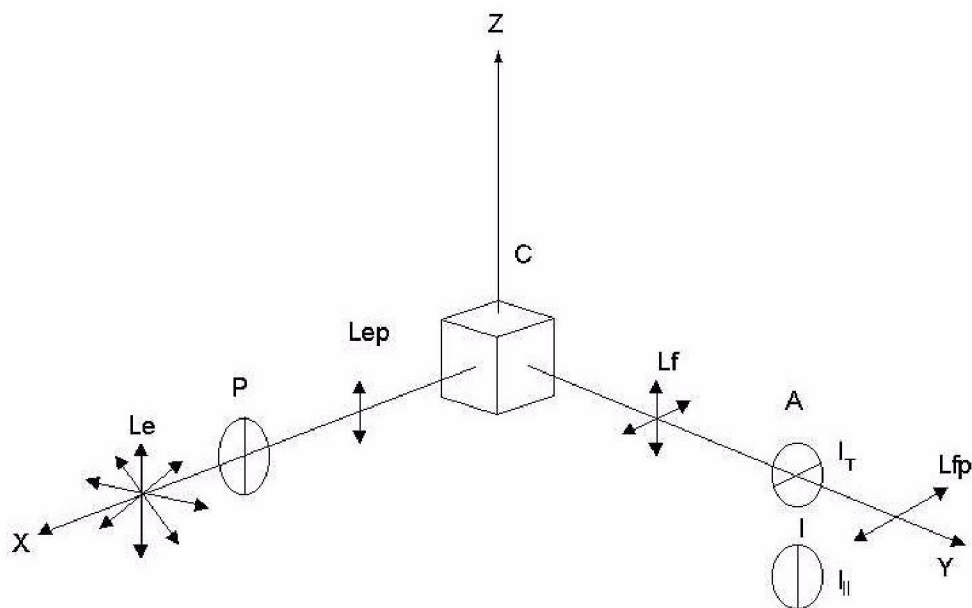


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

NOTA: A luz monocromática de excitação (L_e) ao passar pelo polarizador (P), orientado na vertical, dá lugar a um componente vertical da luz polarizada (L_{ep}) que excita a amostra contida na célula C. A luz emitida (L_f) ao passar pelo analisador (A) dá lugar a componentes da luz polarizada (L_{fp}), $I_{||}$ ou I_{\perp} conforme o analisador estiver colocado paralelamente ou a 90° à direção de polarização da luz de excitação. No processo, são preferencialmente excitadas as moléculas da amostra que se encontram alinhadas com o vetor eletromagnético do feixe polarizado de excitação. Estas moléculas, devido a difusão, vão depois se orientar em várias direções no período de tempo do estado excitado e, por isso, é possível detectar na emissão componentes polarizados paralelamente ($I_{||}$) e perpendicularmente (I_{\perp}) à excitação. Isto é, as moléculas excitadas vão reorientar-se em todas as direções do espaço e, assim, a fluorescência emitida é despolarizada.

polarização visualizado na equação 4, é:

$$P = (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}) \quad (\text{Equação 4})$$

Deve-se salientar que a interferência da dispersão da luz pelas partículas em suspensão da amostra foi descontada de todas as intensidades de fluorescência medidas (I_{\parallel} , I_{\perp} , I_{\parallel}^* , I_{\perp}^*) subtraindo-lhes as correspondentes intensidades de luz emitida por um controle branco (sem sonda), nas mesmas condições da amostra. Assim, para cada amostra, a determinação do índice de polarização exigiu oito leituras independentes da quantidade de luz emitida nas diversas condições (LITMAN & BARENHOLZ, 1982).

As medições de polarização de fluorescência foram realizadas selecionando 365 nm para o comprimento de onda de excitação e 450 nm para o comprimento de emissão (LITMAN & BARENHOLZ, 1982). As fendas de excitação e emissão foram selecionadas em 3 nm. Para cada preparação os valores de polarização foram determinados no intervalo de 10°C a 40°C, variando-se a temperatura a cada 1°C ou 2°C. As temperaturas foram medidas com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ utilizando-se termômetro digital Minipa, modelo APPA-MT 510.

5.6.9.5 Determinação da Temperatura Média de Transição de Fase (T_m)

Para a determinação da T_m , a curva de polarização foi decomposta em três segmentos lineares e a T_m foi considerada como o ponto médio da projeção vertical do segmento com maior inclinação (ANTUNES-MADEIRA et al., 1980).

5.6.10 Efeito da Deltametrina e do Glifosato na Mobilização de Ferro da Ferritina

5.6.10.1 Preparo da solução de ferritina

O ferro fracamente ligado à ferritina de baço de cavalo foi removido pela

incubação durante uma hora a 4°C de uma alíquota de 0,3mL da proteína com igual volume de tampão Tris-HCl 20 mmol·L⁻¹, pH 7,4, contendo NaCl 140 mmol·L⁻¹ e EDTA 10 mmol·L⁻¹. Em seguida, a ferritina foi purificada em coluna Sephadex G-25, equilibrada com o mesmo tampão, porém sem EDTA. A preparação assim obtida foi mantida a temperatura de 4°C (OTEIZA et al., 1995) e a proteína dosada pelo método de LOWRY et al. (1951) como descrita no item 5.6.3.

5.6.10.2 Liberação de Ferro da Ferritina

A determinação da liberação de ferro da ferritina, foi realizada espectrofotometricamente segundo o método descrito por OTEIZA et al. (1995), variando-se as concentrações de deltametrina ou do glifosato. O meio consistia de ferritina (0,3 mg·mL⁻¹) em tampão Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 7,4, contendo sulfonato de batofenantrolina 1 mmol·L⁻¹. A liberação de Fe²⁺ da ferritina foi acompanhada a 530 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U - 2001 UV/VIS, e os resultados foram expressos em μmol·L⁻¹ de Fe²⁺ liberado, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do complexo Fe²⁺-batofenantrolina de 22,14 (mmol/L)⁻¹·cm⁻¹ (AUST et al.,1990).

5.6.11 Efeitos da Deltametrina e do Glifosato sobre a Lipoperoxidação de Membranas Ferro-induzida

A peroxidação de lipídios de preparações mitocondriais foi avaliada através da reação do malondialdeído com ácido tiobarbitúrico, de acordo com técnica descrita por BUEGE & AUST (1978).

Mitocôndrias (1,0 mg·mL⁻¹), obtidas de acordo com o procedimento descrito no item 5.5.1 foram incubadas, sob agitação a 37°C, em meio de reação constituída de: D-manitol 250 mmol·L⁻¹, HEPES 10 mmol·L⁻¹, pH 7,2, ADP 2 mmol·L⁻¹, FeCl₃ 0,2 mmol·L⁻¹ na ausência ou presença de deltametrina ou de glifosato.

A reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 5 mmol·L⁻¹. Alíquotas de 0,5 mL da mistura foram retiradas aos tempos zero, 10, 20, 30 e 45 minutos de

incubação na presença de substrato e adicionadas em 2 mL de reagente TBA constituído de TCA 15%, TBA 0,375% em HCl 0,25 N e BHT 0,01%. A mistura foi colocada em banho-maria fervente, por 15 minutos, resfriada e então centrifugada a $12.000 \times g$ por 5 minutos. Após o esfriamento a absorvância do sobrenadante foi determinada em 535 nm contra um branco, o qual continha todos os reagentes, exceto a fração protéica, submetidos aos mesmos procedimentos das amostras. Nas condições experimentais o solvente (DMSO) não interferiu na lipoperoxidação.

Os resultados foram expressos em μmol de malondialdeído formado por min por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (BUEGE & AUST, 1978).

5.6.12 Avaliação dos Efeitos da Deltametrina em Modelos Animais de Comportamento

Os estudos visando avaliar os efeitos do tratamento repetido com deltametrina no comportamento de ratos foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR, sob a supervisão dos professores Roberto Andreatini, Maria A. Vital e Paulo R. Dalsenter. Nesta avaliação foram realizados os testes de natação forçada, consumo preferencial de solução de sacarose, labirinto em cruz elevado e campo aberto.

5.6.12.1 Manipulação dos Animais

Os animais (ratos machos, variedade Wistar), obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, foram mantidos em salas com temperatura e umidade relativa do ar constantes, e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

5.6.12.2 Doses e Tratamento

Para o tratamento foi utilizada deltametrina do mesmo lote utilizado nos

experimentos *in vitro*, isto é, grau técnico com 99,2% de pureza, utilizando óleo de canola como veículo.

Ratos adultos ($n = 36$) foram randomicamente separados em quatro grupos ($n = 9$) e em caixas individuais. O praguicida foi administrado diariamente por via oral (*gavage*) por 63 dias consecutivos. O tratamento dos 4 grupos de animais foi o seguinte:

Grupo 1: os animais deste grupo receberam óleo de canola em um volume equivalente ($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) àquele usado com deltametrina (controle do veículo) e serviu como grupo controle ($n = 9$).

Grupo 2: os animais deste grupo foram tratados diariamente com a dose de deltametrina de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n = 9$).

Grupo 3: os animais deste grupo foram tratados diariamente com a dose de deltametrina de $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n = 9$).

Grupo 4: os animais deste grupo foram tratados diariamente com a dose de deltametrina de $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n = 9$).

As doses utilizadas de deltametrina foram estabelecidas a partir da NOEL-dose (No Observed Effect Level) para toxicidade materna, ou seja, a maior dose de deltametrina que não causa nenhum efeito adverso (não provoca toxicidade), e com base em estudos prévios realizados nos laboratórios do Departamento de Farmacologia (UFPR). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), a NOEL dose para deltametrina em ratos é de $3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EPA, 2000).

5.6.12.3 Teste de Consumo de Solução de Sacarose

O teste de consumo de solução de sacarose baseado no modelo de anedonia induzida por estresse brando repetido proposto por WILLNER et al. (1987), avalia o efeito reforçador de uma solução doce. Inicialmente os animais foram habituados por 48 horas com uma solução de sacarose a 1%, sendo posteriormente (uma semana depois), realizado o teste de verificação do consumo de sacarose 1%. Este teste foi realizado durante uma hora, imediatamente após um período de 24

horas de privação de água e ração. O consumo foi medido pela pesagem das garrafas antes e depois do teste, sendo expresso em percentagem de consumo de sacarose. Nesse teste têm-se os seguintes parâmetros: consumo de solução de sacarose 1%, consumo de água, consumo total (consumo de água + consumo de sacarose) e percentagem de preferência pela sacarose $[(\text{consumo de sacarose } 1\% \times 100) / \text{consumo total}]$. Os animais foram testados individualmente em caixas semelhantes medindo $30 \times 10 \times 18$ cm. A redução da preferência ou do consumo de sacarose foi utilizada como indicativo de um estado de anedonia (redução do efeito reforçador), sugestivo de depressão (WILLNER, 1997).

5.6.12.4 Teste de Natação Forçada

Neste procedimento foi utilizada a metodologia descrita por PORSOLT et al. (1977) e BORSINI & MELI (1988), que é de uso corrente no laboratório de Farmacologia da UFPR. No dia anterior ao teste, os animais foram submetidos a uma sessão inicial (treino) na qual foram "forçados" a nadar em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro \times 50 cm de altura), com água a 30 cm de altura e a 25°C. A sessão teve duração de 15 minutos. Nesta condição, após um período de intensa movimentação, os animais adquirem uma postura de imobilidade, com movimentos mínimos para manterem a cabeça fora da água. Após 24 horas os animais foram submetidos a uma segunda sessão (teste) de cinco minutos, em que foi registrado o tempo de imobilidade. Os animais foram julgados imóveis quando pararam de nadar e permaneceram flutuando com movimentos mínimos, apenas o suficiente para manter a cabeça pouco acima do nível da água. A cada animal testado a água foi trocada, para evitar que alguma substância liberada pelo animal precedente alterasse o comportamento do animal testado na seqüência. Os tratamentos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade na 2ª sessão (BORSINI & MELI, 1988).

5.6.12.5 Teste do Campo Aberto

A atividade geral dos animais em campo aberto foi avaliada em aparelho construído segundo BROADHURST (1960). O ensaio foi realizado através da observação direta dos animais, em uma arena circular de madeira (campo aberto) com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada de branco e dividida por meio de três círculos concêntricos, em três partes, que por sua vez são subdivididos através de segmentos de reta em 19 partes aproximadamente iguais. A arena estava contida em uma caixa de madeira distando 48 cm do chão, e tendo na sua parte frontal uma cortina que, devido às condições de iluminação do ambiente permite uma total observação do animal no campo aberto dificultando a este a visão do observador. A parte superior da caixa, distante 74 cm do chão da arena, promovia a iluminação da mesma através de uma lâmpada de 40 watts.

Cada animal foi colocado individualmente na arena por um período de cinco minutos, uma única vez. Os animais controles e experimentais foram observados intercaladamente e no mesmo horário, entre 8:00 e 12:00h, isto é, no período claro do ciclo. Entre as observações de cada animal, o campo aberto foi limpo com uma solução de água-álcool a 5%.

Do repertório comportamental de um animal colocado em campo aberto os parâmetros indicativos de sua atividade geral escolhidos para a análise e quantificação foram: locomoção, levantar, e duração do tempo parado.

Cada unidade de locomoção foi correspondente ao ato do animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; cada unidade de levantar foi correspondente à postura do animal permanecer apoiado nas patas posteriores com o tronco perpendicular ao chão da arena tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores as paredes do campo aberto.

O parâmetro comportamental “parado” foi considerado como o período de tempo, em segundos, durante o qual o animal não apresentou atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e membros.

O registro das freqüências dos parâmetros foi realizado por intermédio de contagem, computando-se o total dos mesmos em cinco minutos de observação, cronometrando-se a duração de tempo parado.

5.6.12.6 Teste no Labirinto em Cruz Elevado

Este modelo que foi desenvolvido por HANDLEY & MITHANI (1984) consiste de um labirinto em cruz, com dois braços abertos (10 × 50 × 0,5 cm) e dois braços fechados (10 × 50 × 40 cm) dispostos de tal modo que os braços de um mesmo tipo ficam em posições opostas. Neste teste, o rato foi colocado na plataforma central, isto é, na zona de interseção dos 4 braços e avaliou-se o tempo e o número de entradas do animal em cada braço. A premissa deste modelo é que os ratos, assim como os camundongos, apresentam um conflito entre aversão pelos espaços abertos (representado pelo braço aberto) e uma tendência à exploração de todo labirinto pelo caráter de novidade (TREIT et al., 1993). Drogas ansiolíticas aumentam a porcentagem de entradas e/ou tempo gasto nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas diminuem estes parâmetros. Estes efeitos são observados sem que se observe uma alteração na atividade locomotora, que neste teste é avaliado pelo número de entradas nos braços fechados.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.7.1 Análise Estatística dos Experimentos *in vitro*

Os resultados obtidos foram analisados utilizando Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para localizar diferenças obtidas na ANOVA. Foi utilizado um pacote de estatística para microcomputador Statistica 5.5 (StatSoft, Inc.). Em todos os experimentos $p < 0,05$ foi usado como critério para significância estatística. Os experimentos de polarização de fluorescência usando membranas naturais foram avaliados através de regressão linear.

5.7.2 Análise Estatística dos Experimentos *in vivo*

As análises estatísticas dos experimentos *in vivo* foram realizadas utilizando-se ANOVA de 2 vias seguido pelo teste de Newman Keuls, utilizado para localizar diferenças obtidas na ANOVA, através de pacote de estatística para

microcomputador Statistica 5.5 (StatSoft, Inc.). O teste de Preferência pela Sacarose e o Peso Corporal dos animais foi avaliado por ANOVA para medidas repetidas para cada grupo como fator independente e tempo como medida repetida. Para os dados não paramétricos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do ponto de vista bioquímico-toxicológico as alterações relatadas na literatura causadas pela deltametrina e pelo glifosato, sejam elas funcionais ou morfológicas, podem estar diretamente correlacionadas a distribuição e possível acumulação dos praguicidas no fígado. Considerando tal possibilidade, a avaliação da toxicidade da deltametrina e do glifosato sobre parâmetros vinculados à bioenergética mitocondrial tornou-se relevante, disponibilizando, desta forma, informações importantes sobre o mecanismo bioquímico da ação destes praguicidas.

Para tanto, mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram utilizadas neste estudo como modelo experimental, avaliando-se inicialmente o efeito da deltametrina e do glifosato sobre a velocidade de consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa. Nestes experimentos foram utilizados como substratos para a cadeia respiratória mitocondrial o glutamato e o succinato, doadores de elétrons para o complexo I e para o complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, respectivamente.

6.1 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

As figuras 9-12 mostram os efeitos da deltametrina quando foram analisados os seguintes parâmetros: velocidade de consumo de oxigênio na presença de ADP (estado 3) e após o consumo do ADP (estado 4); coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O, utilizando glutamato ou succinato como substrato.

Na figura 9 pode-se observar que a deltametrina promoveu uma diminuição da velocidade respiratória no estado 3, na presença de ADP e do substrato L-glutamato ou succinato. Quando o L-glutamato foi utilizado como substrato, a deltametrina promoveu discreta inibição, porém estatisticamente significativa, em relação ao controle, em todas as concentrações utilizadas. Nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 150 e 200 nmol·mg⁻¹ de proteína as inibições da velocidade respiratória durante o estado 3 foram de 11, 13, 16, 23, 23 e 27% em relação ao controle, respectivamente.

Quando o succinato foi utilizado como substrato (Figura 9), o consumo de

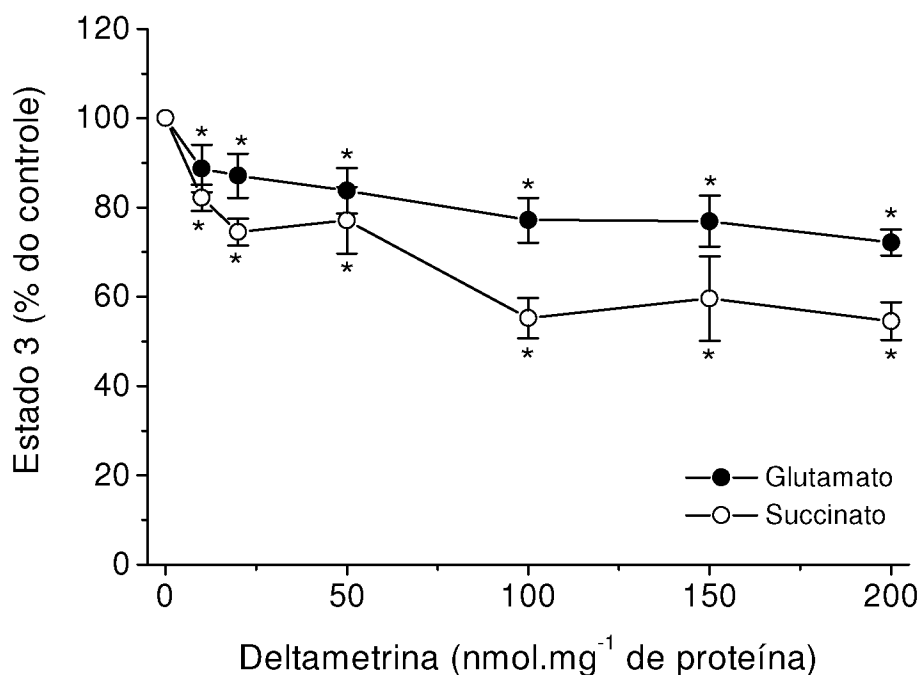


FIGURA 9 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 3 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol×L⁻¹, KCl 50 mmol×L⁻¹, fosfato de potássio 10 mmol×L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol×L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol×L⁻¹, e MgSO₄ 2 mmol×L⁻¹, suplementado com succinato de potássio 10 mmol×L⁻¹, rotenona 1 mmol×L⁻¹, ADP 0,1 mmol×L⁻¹ ou com glutamato de potássio 10 mmol×L⁻¹, ADP 0,2 mmol×L⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- O 100% do consumo de oxigênio na presença de ADP e substrato (Estado 3) corresponde a $44,3 \pm 6,0$ e $110,8 \pm 4,0$ nmol de oxigênio consumido×min⁻¹×mg⁻¹ de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média ± DP de cinco experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

oxigênio durante o estado 3 também foi inibido de forma estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas do praguicida, e na maior dose (200 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial) o efeito foi da ordem de 45%.

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram o efeito da deltametrina sobre a velocidade de consumo de oxigênio após a fosforilação do ADP (estado 4). A diminuição do consumo de oxigênio observada durante a oxidação do L-glutamato, em concentrações inferiores a 100 nmol.mg⁻¹ de proteína, embora reproduzíveis não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

A partir da concentração de 100 nmol.mg⁻¹ de proteína, quando o substrato empregado foi o glutamato, e a partir da concentração de 10 nmol.mg⁻¹ de proteína quando o substrato foi o succinato, o piretróide inibiu o estado 4, em aproximadamente 20% e 25%, respectivamente, nas concentrações testadas.

A relação entre os valores obtidos no estado 3 e no estado 4, fornece o coeficiente de controle respiratório (CCR). A figura 11 mostra que para o L-glutamato a deltametrina promoveu discreta diminuição do CCR, de aproximadamente 11% para as concentrações de 10, 20, 50 nmol.mg⁻¹ de proteína, e aproximadamente 20% nas concentrações de 100, 150 e 200 nmol.mg⁻¹ de proteína. Quando o substrato utilizado foi o succinato, a inibição do CCR foi de 17, 25, 32% nas concentrações de 100, 150 e 200 nmol.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Tal resultado é consequência do decréscimo no consumo de oxigênio durante o estado 3 e estado 4, com ambos os substratos utilizados.

A figura 12 apresenta o efeito da deltametrina sobre a relação ADP/O. Verifica-se que este piretróide não produziu alteração significativa neste parâmetro, nas concentrações e com os substratos utilizados, sugerindo que na presente condição experimental, apesar do decréscimo do CCR, a preparação ainda preserva a capacidade mitocondrial para fosforilar o ADP.

O decréscimo da velocidade respiratório de mitocôndrias de fígado de rato causado pela deltametrina poderia ser uma consequência de:

a) inibição da atividade de complexos enzimáticos e conseqüentemente restrição parcial no fluxo de elétrons na cadeia respiratória;

b) alteração da fluidez de membrana mitocondrial que afetaria não só a oxidação de substratos e o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória como

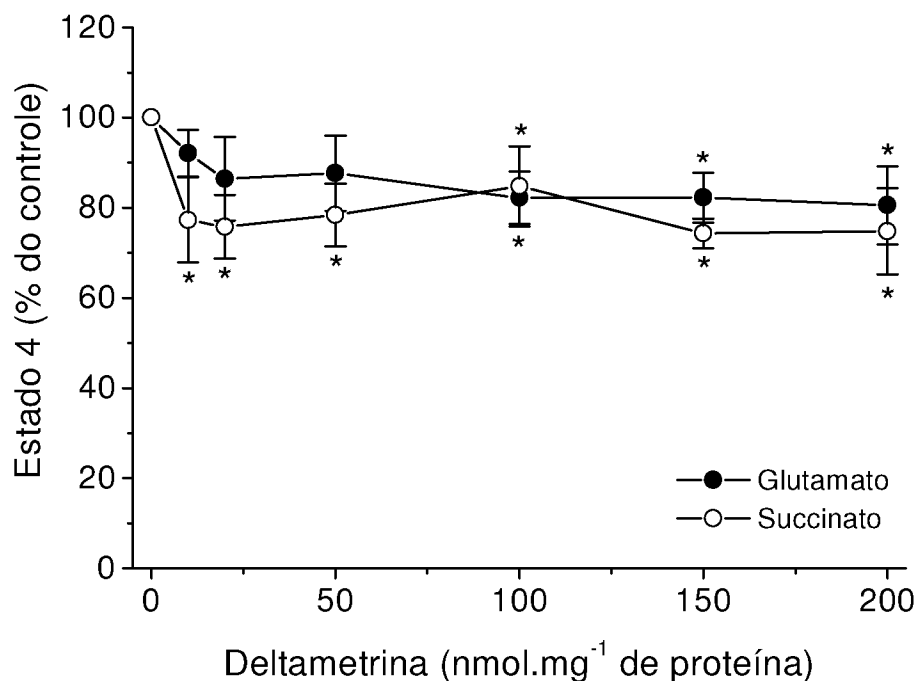


FIGURA 10 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 4 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol·L⁻¹, KCl 50 mmol·L⁻¹, fosfato de potássio 10 mmol·L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol·L⁻¹, e MgSO₄ 2 mmol·L⁻¹, suplementado com succinato de potássio 10 mmol·L⁻¹, rotenona 1 μmol·L⁻¹, ADP 0,1 mmol·L⁻¹ ou com glutamato de potássio 10 mmol·L⁻¹, ADP 0,2 mmol·L⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- O 100% do consumo de oxigênio, após a fosforilação de ADP (Estado IV), corresponde a 8,5 ± 4,0 e 19,5 ± 4,0 nmol de oxigênio consumido·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média ± DP de cinco experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

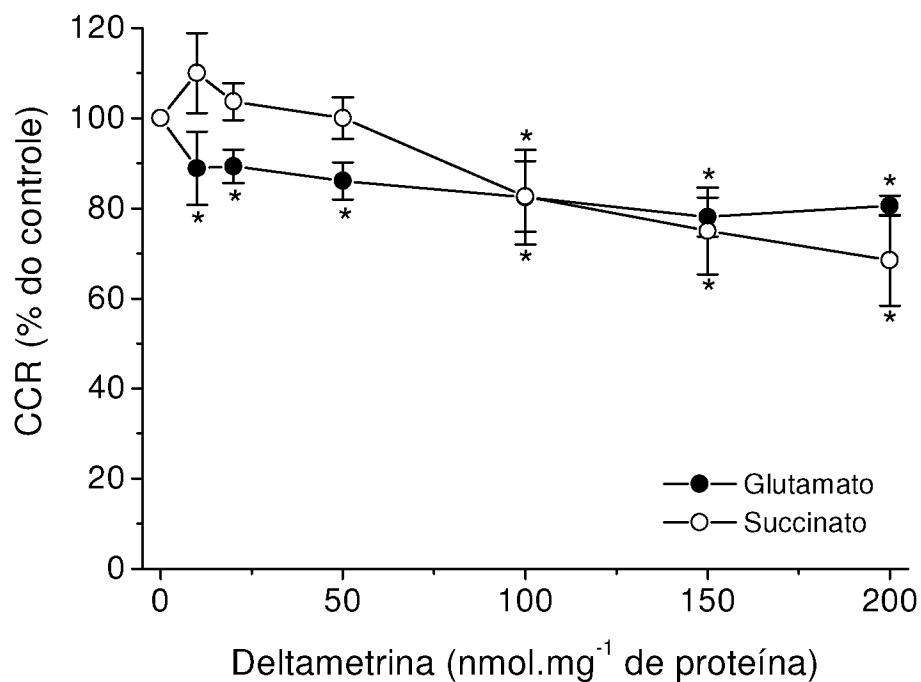


FIGURA 11 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol·L⁻¹, KCl 50 mmol·L⁻¹, fosfato de potássio 10 mmol·L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol·L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol·L⁻¹, e MgSO₄ 2 mmol·L⁻¹, suplementado com succinato de potássio 10 mmol·L⁻¹, rotenona 1 μmol·L⁻¹, ADP 0,1 mmol·L⁻¹ ou com glutamato de potássio 10 mmol·L⁻¹, ADP 0,2 mmol·L⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- Coeficiente de Controle Respiratório (CCR). O 100% corresponde a $5,7 \pm 1,0$ e $5,2 \pm 0,6$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média \pm DP de cinco experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

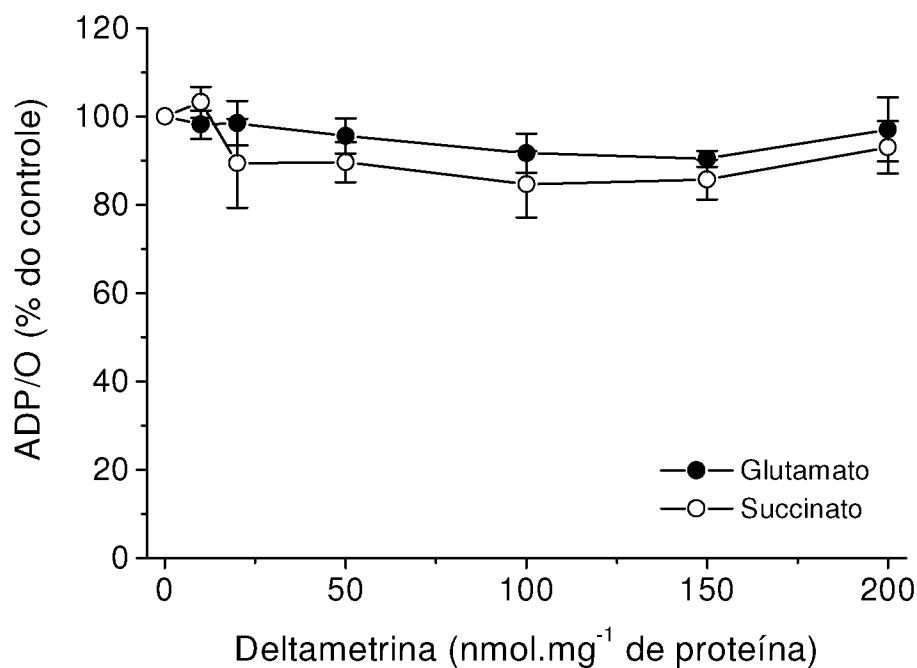


FIGURA 12 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol.L⁻¹, KCl 50 mmol.L⁻¹, fosfato de potássio 10 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,5 mmol.L⁻¹, e MgSO₄ 2 mmol.L⁻¹, suplementado com succinato de potássio 10 mmol.L⁻¹, rotenona 1 μmol.L⁻¹, ADP 0,1 mmol.L⁻¹ ou com glutamato de potássio 10 mmol.L⁻¹, ADP 0,2 mmol.L⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- O 100% da concentração de ADP/consumo de oxigênio (ADP/O), corresponde a 2,8 ± 0,9 e 1,7 ± 0,5 para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média ± DP de cinco experimentos independentes.

também os fenômenos resultantes deste processo (translocação de íons, manutenção do potencial eletroquímico de membrana e organização dos lipídios de membrana).

Tais possibilidades serão abordadas posteriormente neste estudo.

6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

De acordo com OLORUNSOGO et al. (1979), o tratamento *in vivo* de ratos com o glifosato resultaria em desacoplamento mitocondrial. Com a finalidade de melhor discriminar este efeito, no presente estudo optou-se pelo tratamento *in vitro* de mitocôndrias isoladas de fígado de rato com o glifosato. Na presente avaliação, as concentrações de glifosato utilizadas foram 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 e 12,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, que são correspondentes a concentrações milimolares no sistema e portanto, relativamente muito altas e superiores em relação aos níveis plasmáticos descritos por OLORUNSOGO et al. (1979).

As figuras 13-16 mostram que o glifosato, nas concentrações testadas, não alterou significativamente nenhum dos parâmetros avaliados (estado 3, estado 4, CCR e a relação ADP/O) durante o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato. Estes resultados, portanto contradizem as observações de OLORUNSOGO et al. (1979) em mitocôndrias de fígado de rato, que sugerem um efeito desacoplador para o glifosato. Vale destacar que ARNAUD et al. (1993) não encontrou efeitos do glifosato sobre mitocôndrias isoladas de batata. Em que pese as diferenças existentes entre a organela de origem vegetal e animal o que limita comparações diretas, os resultados do presente estudo estão de acordo com aqueles obtidos por Arnoud et al (1993), onde não foram observadas alterações em mitocôndrias de batata, nos mesmos parâmetros presentemente analisados.

Embora o glifosato, nas condições experimentais e concentrações utilizadas não alterou a velocidade respiratória mitocondrial, os efeitos sobre os segmentos da cadeia respiratória, NADH oxidase e succinato oxidase, foram também avaliados com o objetivo de verificar se na ausência da barreira proporcionado pela membrana íntegra, o herbicida poderia alterar o funcionamento

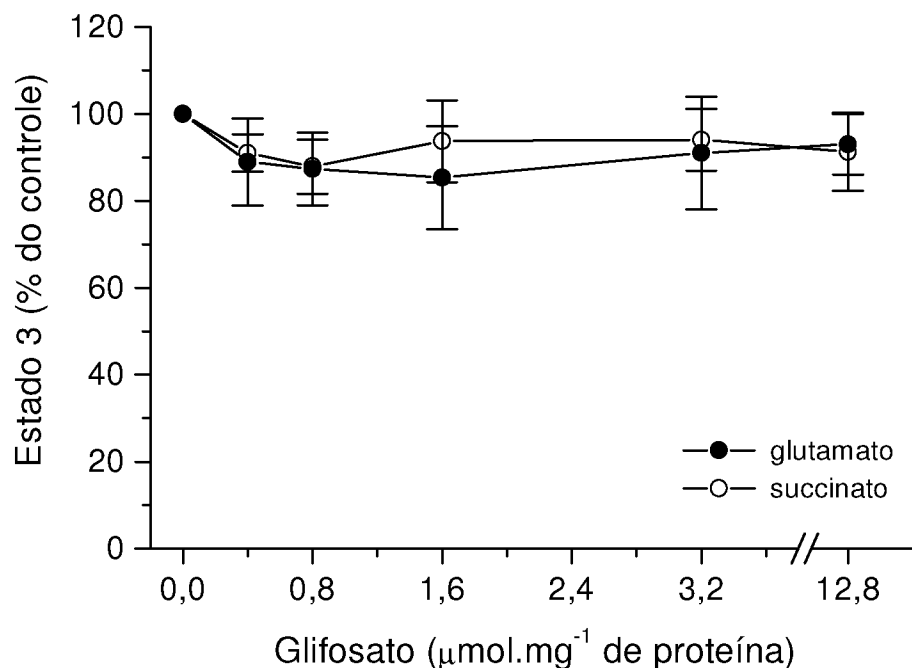


FIGURA 13 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 3 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol.L^{-1} , KCl 50 mmol.L^{-1} , fosfato de potássio 10 mmol.L^{-1} , Tris-HC 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, e MgSO_4 2 mmol.L^{-1} , suplementado com succinato de potássio 10 mmol.L^{-1} , rotenona $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ADP $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ou com glutamato de potássio 10 mmol.L^{-1} , ADP $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- O 100% do consumo de oxigênio na presença de ADP e substrato (Estado 3), corresponde a $47,0 \pm 10,0$ e $174,3 \pm 7,0 \text{ nmol de oxigênio consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média \pm DP de cinco experimentos independentes.

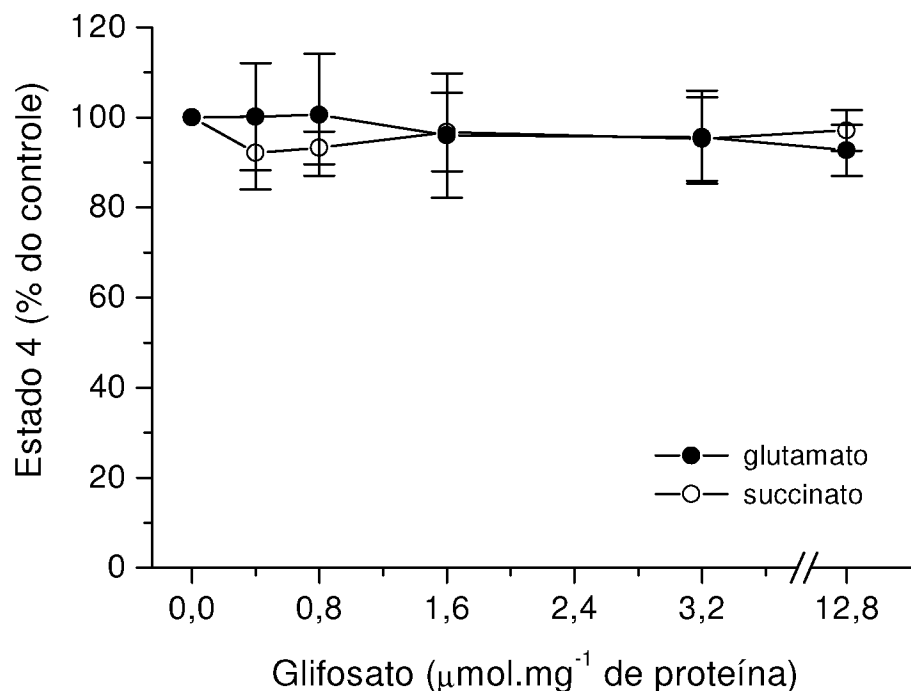


FIGURA 14: EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO 4 EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose $175 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, fosfato de potássio $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e MgSO_4 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com succinato de potássio $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ADP $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou com glutamato de potássio $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ADP $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- O 100% do consumo de oxigênio após a fosforilação de ADP (Estado 4), corresponde a $8,2 \pm 2,0$ e $42,5 \pm 7,2 \text{ nmol de oxigênio consumido}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média \pm DP de cinco experimentos independentes.

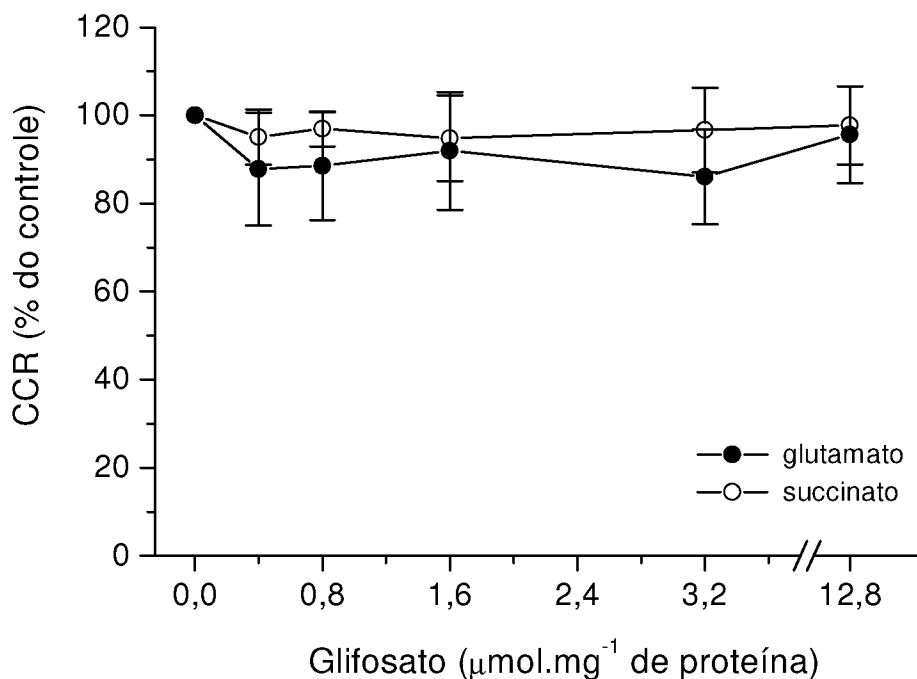


FIGURA 15 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O CCR DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol.L^{-1} , KCl 50 mmol.L^{-1} , fosfato de potássio 10 mmol.L^{-1} , Tris-HCl 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, e MgSO_4 2 mmol.L^{-1} , suplementado com succinato de potássio 10 mmol.L^{-1} , rotenona $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ADP $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ou com glutamato de potássio 10 mmol.L^{-1} , ADP $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- Coeficiente de Controle Respiratório (CCR). O 100% corresponde a $5,2 \pm 1,0$ e $4,1 \pm 0,3$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média \pm DP de cinco experimentos independentes.

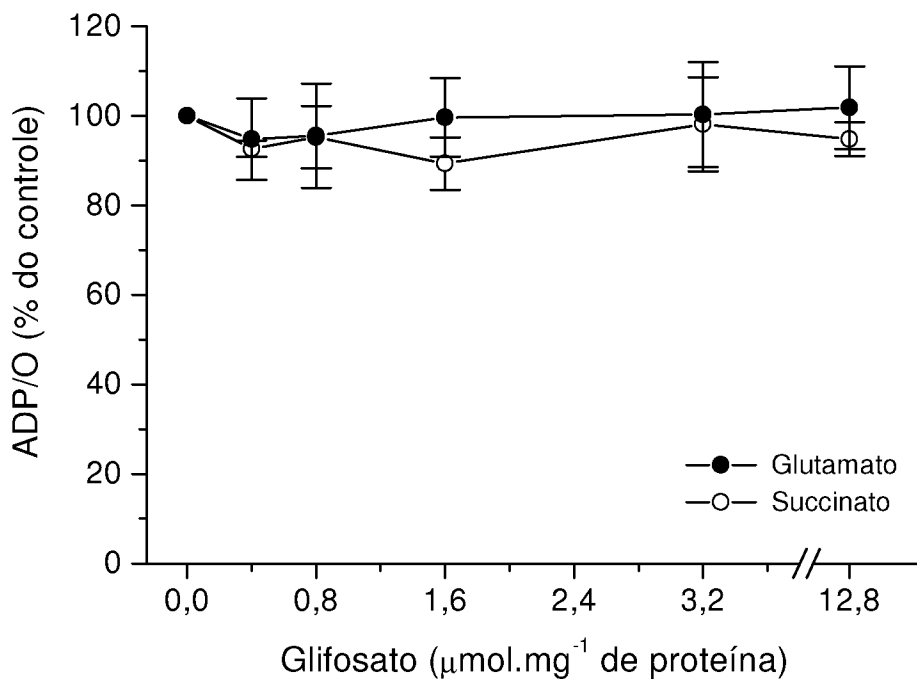


FIGURA 16 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Sacarose 175 mmol.L^{-1} , KCl 50 mmol.L^{-1} , fosfato de potássio 10 mmol.L^{-1} , Tris-HCl 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, e MgSO_4 2 mmol.L^{-1} , suplementado com succinato de potássio 10 mmol.L^{-1} , rotenona $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ADP $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ou com glutamato de potássio 10 mmol.L^{-1} , ADP $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 1 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de potássio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de potássio.

- Concentração de ADP/consumo de oxigênio (ADP/O). O 100% corresponde a $2,6 \pm 0,7$ e $1,6 \pm 0,2$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

- Cada valor representa a Média \pm DP de cinco experimentos independentes.

da cadeia respiratória. Além disso, o efeito do praguicida foi também avaliado sobre a atividade ATPásica e potencial elétrico de membrana, com a intenção de detectar sutis alterações eventualmente subavaliadas nos experimentos de consumo de oxigênio, como parâmetros de análise que pudessem dar subsídios para as observações de OLORUNSOGO et al. (1979).

6.3 ANÁLISE DOS EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Os resultados obtidos com a deltametrina, os quais mostraram o decréscimo no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato, sugeriram efeitos causados pelo piretróide sobre segmentos da cadeia de transporte de elétrons.

Os dados apresentados na tabela 6 referem-se aos efeitos da deltametrina sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial. Verifica-se nesta tabela que a deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial) inibe em 36% a atividade da NADH oxidase e em 30% a atividade da NADH citocromo *c* redutase. Verifica-se também que a NADH desidrogenase e a citocromo *c* oxidase não sofreram alteração significativa em suas atividades nas concentrações de deltametrina utilizadas. Desta maneira foi possível excluir um efeito deste praguicida diretamente sobre o complexo I e complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial. Este resultado difere daquele descrito para a permetrina, um piretróide do tipo I, o qual foi descrito como potente inibidor do complexo I da cadeia respiratória (GASSNER et al., 1997). Destaca-se porém que o efeito da permetrina ocorreu em concentrações muito superiores ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), quando comparadas às utilizadas no presente trabalho para a deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial).

As atividades enzimáticas da succinato oxidase, succinato desidrogenase e da succinato citocromo *c* redutase foram inibidas 37%, 21% e 38%, respectivamente, quando a dose utilizada de deltametrina foi de $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Estes resultados demonstram que a deltametrina atua sobre complexo II e III, uma vez que a desidrogenase do substrato succinato foi inibida.

A cipermetrina, outro piretróide do tipo II, foi mostrado por PHILIP et al.

TABELA 6 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA

DTM (nmol·mg ⁻¹ de proteína)	Valores em % relativos ao controle (100%)						
	NADH oxidase	NADH desidrogenase	NADH citocromo <i>c</i> redutase	Succinato oxidase	Succinato desidrogenase	Succinato citocromo <i>c</i> redutase	Citocromo <i>c</i> oxidase
10	89 ± 7 *	96 ± 3	96 ± 4	93 ± 10	102 ± 7	97 ± 8	97 ± 3
20	82 ± 5 *	94 ± 3	92 ± 4	85 ± 9 *	90 ± 4	82 ± 5 *	96 ± 6
50	81 ± 6 *	97 ± 8	88 ± 3 *	79 ± 8 *	90 ± 9	76 ± 6 *	97 ± 3
100	74 ± 5 *	95 ± 2	74 ± 6 *	73 ± 11 *	91 ± 9	68 ± 9 *	98 ± 2
150	65 ± 8 *	89 ± 4	75 ± 11 *	72 ± 12 *	90 ± 5	64 ± 5 *	98 ± 5
200	64 ± 5 *	93 ± 9	70 ± 4 *	63 ± 6 *	79 ± 7 *	62 ± 3 *	96 ± 6

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.4 da seção 5 Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: NADH oxidase = 174,36 nmol O₂ consumido·min⁻¹·mg⁻¹; NADH desidrogenase = 1,9 μmol de ferricianeto reduzido·min⁻¹·mg⁻¹; NADH citocromo *c* redutase = 328,42 nmol citocromo *c* reduzido·min⁻¹·mg⁻¹; succinato Oxidase = 117,41 nmol de oxigênio consumido·min⁻¹·mg⁻¹; succinato desidrogenase = 139,40 μmol de DCPIP reduzido·min⁻¹·mg⁻¹; succinato citocromo *c* redutase = 104,61 nmol citocromo *c* reduzido·min⁻¹·mg⁻¹; citocromo *c* oxidase = 64,54 nmol citocromo *c* oxidado·min⁻¹·mg⁻¹. Os resultados estão expressos em percentagem relativos aos controles (100%) e são Média ± DP de 3 experimentos independentes. *Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) – *p* < 0,05.

(1995) também inibir a succinato desidrogenase, além da malato desidrogenase do fígado, cérebro e rim de peixes (*Labeo rohita*) expostos a concentração subletal de $0,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e letal de $5,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ por 4 dias. Alterações nos níveis de lactado e piruvato, e diminuição no conteúdo de glicogênio e aumento na lactato desidrogenase também foram observados para a cipermetrina (PHILIP et al., 1995), entretanto as doses utilizadas por estes autores correspondem a $1,24$ e $12,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo 6 e 63 vezes maiores, respectivamente, comparadas com a dose máxima de deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) utilizada nos experimentos com as enzimas da cadeia respiratória.

Os resultados justificam aqueles obtidos nos experimentos de consumo de oxigênio quando se analisaram as velocidades respiratórias no estado 3 de mitocôndrias energizadas com os substratos L-glutamato e succinato. Porém, é importante ressaltar que nos estudos polarográficos os complexos enzimáticos foram indiretamente avaliados em mitocôndrias intactas e acopladas, enquanto que nos estudos das atividades parciais das enzimas da cadeia respiratória, eles fazem parte de fragmentos de membrana, obtidos pelo rompimento por choque térmico, onde o praguicida teria livre acesso aos complexos enzimáticos.

6.4 ANÁLISE DOS EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Embora o glifosato não tenha apresentado efeito sobre o consumo de oxigênio, seus efeitos sobre as enzimas da cadeia respiratória também foram avaliados, não descartando um possível efeito desta molécula sobre o transporte de elétrons mitocondrial em uma condição onde a membrana não representasse uma barreira para este composto.

Foram avaliadas as enzimas NADH oxidase e succinato oxidase. Os resultados obtidos mostraram que o glifosato até $12,8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, não alterou as atividades destes segmentos (Tabela 7), descartando-se portanto, a possibilidade de efeito do glifosato sobre o transporte de elétrons da cadeia respiratória, bem como confirma a ausência de efeitos sobre a velocidade respiratória do estado 3 e do estado 4. As observações deste trabalho estão de

TABELA 7 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Glifosato ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Atividade Enzimática	
	NADH oxidase	Succinato Oxidase
0	100	100
0,4	106,5 \pm 6,0	110,2 \pm 8,0
0,8	100 \pm 6,0	106,3 \pm 10,0
1,6	97,3 \pm 8,0	106,9 \pm 7,0
3,2	94,8 \pm 2,0	96,2 \pm 3,0
12,8	93,7 \pm 7,0	92,9 \pm 0,5

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.4 da seção Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: NADH oxidase = 52,9 \pm 4,8 nmol de oxigênio $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína; Succinato oxidase: 29,5 \pm 1,0 nmol de oxigênio $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os resultados são a Média \pm DP de 3 experimentos independentes e estão expressos em % em relação aos valores do controle (100%).

acordo com o descrito por ARNAUD et al. (1993) que avaliaram o efeito do glifosato sobre mitocôndrias isoladas de batata e propuseram que este composto não ora alcançaria concentrações suficientes para interferir nos complexos enzimáticos localizados na membrana.

6.5 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A ATIVIDADE DA F_1F_0 -ATPase

De acordo com a teoria quimio-osmótica (MITCHELL, 1961), o transporte de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial gera um gradiente eletroquímico de prótons no espaço entre as membranas interna e externa, e a utilização deste gradiente pela ATP sintase leva à síntese de ATP. Por outro lado, protonóforos, desacopladores, translocadores de prótons, substâncias que aumentam a condutância de prótons através da membrana, desfazem o gradiente eletroquímico, dissipam a força próton motriz, impedindo a síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Por ser uma molécula lipossolúvel, a deltametrina poderia afetar uma grande extensão da membrana mitocondrial interferindo, em maior ou menor grau, no funcionamento dos complexos nela inseridos como já mostrado pela interação com as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.

Neste trabalho avaliou-se o efeito da deltametrina sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias de fígado de rato intactas, em mitocôndrias intactas tratadas com FCCP, um desacoplador clássico, em mitocôndrias rompidas e em partículas submitocondriais. No primeiro caso, a membrana mitocondrial está intacta e o acesso da deltametrina a regiões internas da membrana e ao conteúdo da matriz é limitado. No segundo caso, a membrana mitocondrial interna embora permeável a prótons, representa ainda uma barreira, estando preservado o arranjo dos complexos enzimáticos na membrana. No terceiro caso, as membranas não são limitantes do acesso da deltametrina à enzima. Os resultados de tais experimentos estão apresentados na tabela 8, onde se verifica que a deltametrina nas concentrações utilizadas não interferiu na atividade de enzima em nenhuma das condições experimentais utilizadas, o que está de acordo com os resultados

TABELA 8 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO E DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS

Deltametrina (nmol.mg ⁻¹ de proteína)	Atividade ATPásica (% do controle)			
	Mitocôndria Intacta	Mitocôndria + FCCP	Mitocôndria Rompida	PSM
10	104 ± 7	111 ± 7	100 ± 5	99 ± 2
20	103 ± 9	109 ± 3	99 ± 5	104 ± 3
50	103 ± 8	110 ± 3	101 ± 9	101 ± 1
100	105 ± 11	111 ± 7	99 ± 6	103 ± 3
150	113 ± 8	116 ± 8	100 ± 6	106 ± 3
200	104 ± 10	111 ± 3	101 ± 4	107 ± 2

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.5 de Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: Mitocôndrias intactas = 16,3 ± 1,4 nmol de Pi liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína; Mitocôndrias desacopladas com FCCP = 44,1 ± 0,2 nmol de Pi liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína; Mitocôndrias rompidas = 622 ± 23 nmol de Pi liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína; PSM = 274 ± 3,4 nmol de Pi liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. Os resultados expressam a Média ± DP de 3 experimentos independentes e estão expressos em % em relação aos valores do controle (100%).

polarográficos obtidos inicialmente, como também exclui a possibilidade de uma interferência no translocador de nucleotídeos de adenina.

6.6 EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A ATIVIDADE DA F_1F_0 -ATPase

Os resultados da análise dos efeitos do glifosato sobre a atividade ATPásica nas três condições experimentais distintas estão na tabela 9. Nas concentrações utilizadas nestes experimentos, o glifosato não alterou a atividade da enzima ATPase em nenhuma das preparações utilizadas nos ensaios. Neste caso, a ausência de efeitos do glifosato sobre a atividade enzimática da ATPase também está de acordo com os resultados polarográficos. Entretanto, contrastam com os resultados de OLORUNSOGO et al. (1979) que afirmam ser o glifosato um agente desacoplador.

6.7 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO

O funcionamento da membrana mitocondrial interna como uma barreira seletiva para prótons e outros íons é de especial importância. Assim, o gradiente destes íons pode ser usado nos processos de transporte secundário para dirigir a captação seletiva de solutos e excreção de produtos finais do metabolismo (POOLMAN, 1992; POOLMAN & KONINGS, 1993).

O acúmulo ou a interferência de substâncias, tais como a deltametrina na bicamada lipídica pode afetar as interações entre os lipídios e as proteínas da membrana. Além disso, interações de moléculas do praguicida com regiões hidrofóbicas da membrana também podem ocorrer. Parâmetros como a espessura da membrana, a fluidez e composição de ácidos graxos regulam a atividade de enzimas ligadas a membrana. Todos estes parâmetros podem ser afetados pela interação de compostos lipofílicos com a bicamada lipídica (SIKKEMA et al., 1995).

O transporte de solutos através da membrana mitocondrial interna é acompanhado pelo transporte de água, resultando em inchamento ou contração do compartimento da matriz mitocondrial. A permeação de água, por outro lado, é

TABELA 9 - EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO E DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAS

Atividade ATPásica (% do controle)				
Glifosato ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Mitocôndria Intacta	Mitocôndria + FCCP	Mitocôndria Rompida	PSM
0,4	100 \pm 10	90 \pm 6	96 \pm 12	101 \pm 2
0,8	100 \pm 8	92 \pm 4	95 \pm 6	107 \pm 2
1,6	113 \pm 12	90 \pm 7	102 \pm 7	107 \pm 6
3,2	108 \pm 7	98 \pm 8	97 \pm 3	106 \pm 1
12,8	103 \pm 5	90 \pm 9	105 \pm 9	106 \pm 3

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.5 da seção Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: Mitocôndrias intactas = $16,3 \pm 1,4$ nmol de Pi liberado $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína; Mitocôndrias rompidas = 458 ± 23 nmol de Pi liberado $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína; Mitocôndrias desacopladas com FCCP = $44,1 \pm 0,2$ nmol de Pi liberado $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína; PSM = $274,4 \pm 6,3$ nmol de Pi liberado $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes e estão expressos em % em relação aos valores do controle (100%).

suficientemente rápida para assegurar que o equilíbrio osmótico seja mantido e que a velocidade do inchamento seja limitada pela velocidade do transporte de soluto (BEAVIS et al., 1985; GARLID & BEAVIS, 1985). Portanto, as medidas quantitativas da amplitude e da velocidade de inchamento da matriz, são ferramentas úteis para o estudo de mecanismos de transporte na mitocôndria (GARLID & BEAVIS, 1985). É possível acompanhar o inchamento mitocondrial pela medida do decréscimo de luz absorvida, quando se adicionam à suspensão mitocondrial os íons necessários (acetato de sódio) e um substrato oxidável (L-glutamato). A oxidação deste substrato gera uma diferença de potencial eletroquímico que favorece a entrada do sal de sódio, e conseqüentemente de água, atingindo o *steady state* em alguns minutos. A capacidade de contração da membrana mitocondrial interna também pode ser avaliada, promovendo-se a reversão do inchamento pela utilização de inibidores da cadeia respiratória ou da ATPsintase (SEPPALA et al., 1973).

Os efeitos da deltametrina sobre a amplitude de inchamento de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, e energizadas com glutamato de sódio estão representadas na figura 17. Verifica-se que a deltametrina reduziu a amplitude do inchamento, um efeito dependente da sua concentração presente no sistema de reação. A adição do piretróide (200 nmol·mg⁻¹ de proteína) previamente à energização, determina uma redução na amplitude do inchamento em até 30% (Figura 17, traçado *g*). Por outro lado, a contração da organela, visualizada após a adição de rotenona ao sistema, não é afetada pela deltametrina (Figura 17, traçados *b - g*). A diminuição do inchamento mitocondrial foi observada também para outro piretróide, a aletrina, que pertence ao grupo de piretróides do tipo I (SETTLEMIRE et al., 1974). Porém, os efeitos deste piretróide diferem do efeito da deltametrina, porque este composto apresentou atividade desacopladora, o que não aconteceu com a deltametrina.

A figura 18 apresenta o efeito da deltametrina sobre o inchamento mitocondrial quando o succinato de sódio foi utilizado como substrato. Como no caso anterior (Figura 17), ocorreu uma inibição dependente da concentração utilizada do piretróide. Na concentração de deltametrina correspondente a 200 nmol·mg⁻¹ de proteína a redução da amplitude de inchamento foi de aproximadamente 58% (Figura 18, traçado *g*) após a incubação por 2 minutos com deltametrina. Como

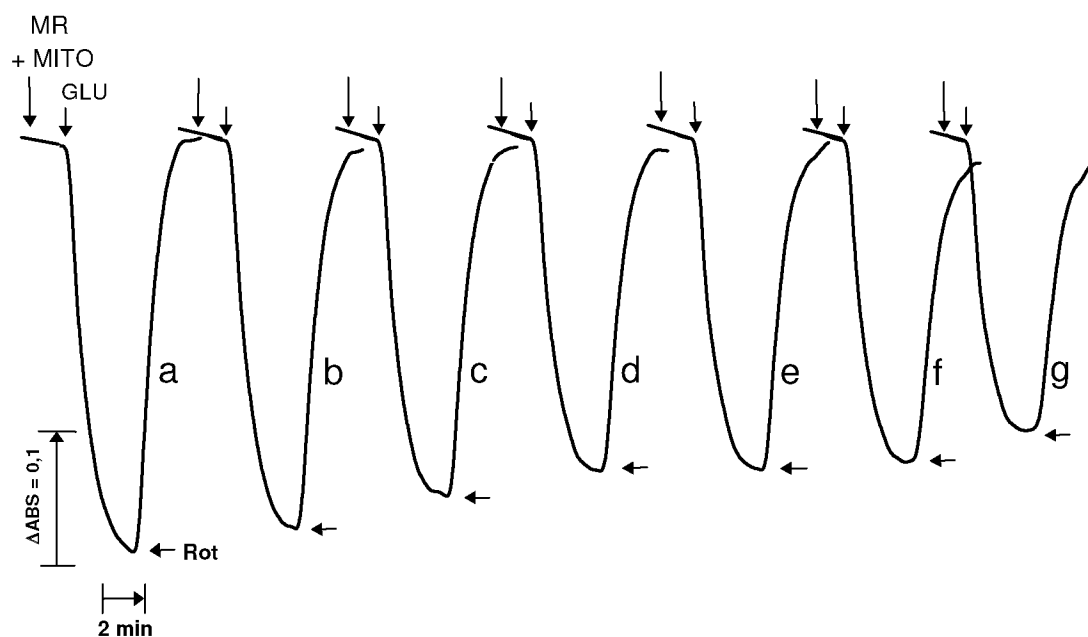


FIGURA 17 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO

SISTEMA: Sacarose $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mitocôndrias (2,0 mg) em volume final 3 mL. Deltametrina nas concentrações de (b) 10, (c) 20, (d) 50, (e) 100, (f) 150, e (g) $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubada por dois minutos antes da adição de glutamato (GLU) $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A contração foi observada pela adição de rotenona (Rot) $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O traçado (a) refere-se ao controle na ausência da deltametrina. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura mostra os traçados representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é indicado pela diminuição e a contração pelo aumento na absorbância.

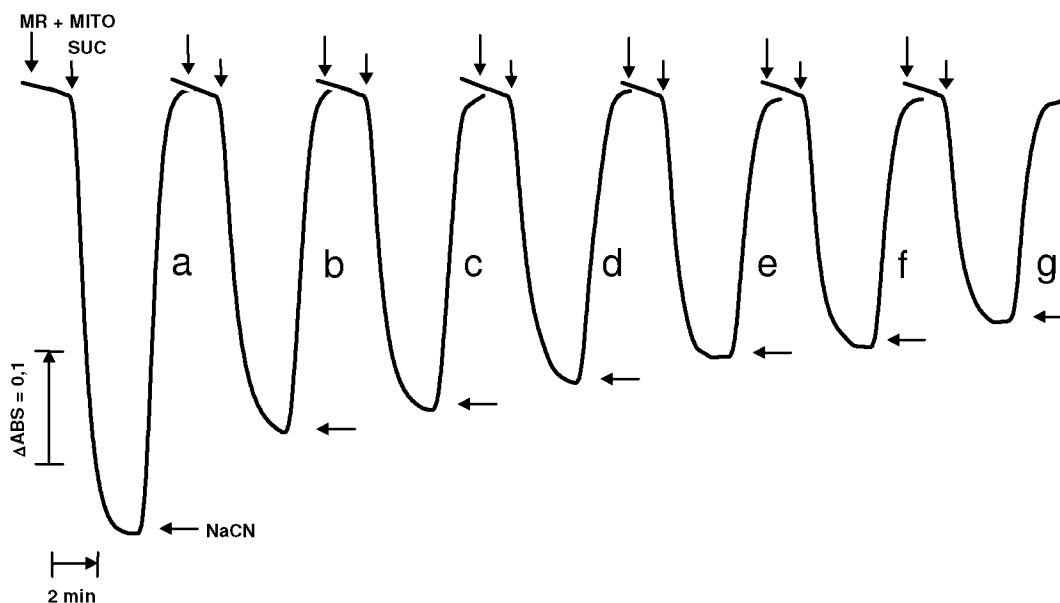


FIGURA 18 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM SUCCINATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO

SISTEMA: Sacarose $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mitocôndrias (1,0 mg) em volume final de 3 mL. A deltametrina nas concentrações de (b) 10, (c) 20, (d) 50, (e) 100, (f) 150, e (g) $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubada por dois minutos antes da adição de succinato (SUC) $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A contração foi observada pela adição de NaCN $1,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O traçado (a) refere-se ao controle na ausência da deltametrina. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura mostra os traçados representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é indicado pela diminuição e a contração pelo aumento na absorbância.

anteriormente, a amplitude e a velocidade da contração não sofreram alterações significativas na presente condição experimental.

A inibição do inchamento mitocondrial mais acentuada quando se utilizou succinato como substrato, está de acordo com os dados anteriores obtidos nos experimentos de velocidade respiratória e atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial por este praguicida. Estes resultados sugerem também que pode ocorrer um comprometimento do potencial da membrana mitocondrial interna.

6.8 EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO

O outro praguicida estudado, o glifosato, não exerceu efeitos sobre o inchamento mitocondrial (Figuras 19 e 20). Isso seria esperado face às informações anteriores já discutidas, mostrando ausência de efeitos sobre o consumo de oxigênio e sobre as atividades enzimáticas.

6.9 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL DESENERGIZADO

Mitocôndrias intactas são pouco permeáveis aos íons K^+ . De acordo com PRESSMAN (1976), esta restrição à penetração do K^+ e outros íons se deve aos componentes fosfolipídicos da membrana que tornam energeticamente desfavorável a penetração deste cátion na matriz mitocondrial. Entretanto, na presença do peptídeo macrocíclico, valinomicina, ocorre a formação do complexo valinomicina- K^+ , onde a carga está concentrada no interior da molécula. A formação deste complexo lipossolúvel reduz a necessidade energética para o transporte, facilitando a transferência do K^+ através da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Assim, a velocidade do transporte de K^+ é determinada pela rapidez com que o complexo se move na bicamada lipídica, sendo esta mobilidade dependente da fluidez da membrana. O complexo sofre dissociação e o K^+ é liberado na matriz mitocondrial levando ao inchamento mitocondrial (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

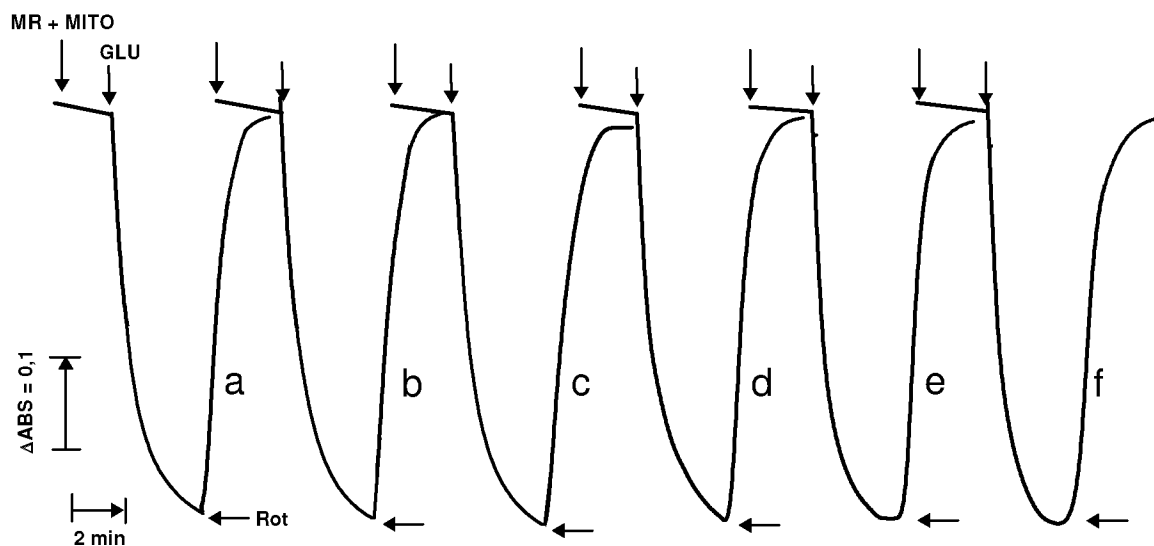


FIGURA 19 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM GLUTAMATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO

SISTEMA: Sacarose $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mitocôndrias (2,0 mg) em volume final de 3 mL. O glifosato nas concentrações de **(b)** 0,4, **(c)** 0,8, **(d)** 1,6, **(e)** 3,2, e **(f)** $12,8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubado por dois minutos antes da adição de glutamato (GLU) $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A contração foi observada pela adição de rotenona (Rot) $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O traçado **(a)** refere-se ao controle na ausência de glifosato. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura mostra os traçados representativos de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é indicado pela diminuição e a contração pelo aumento na absorbância.

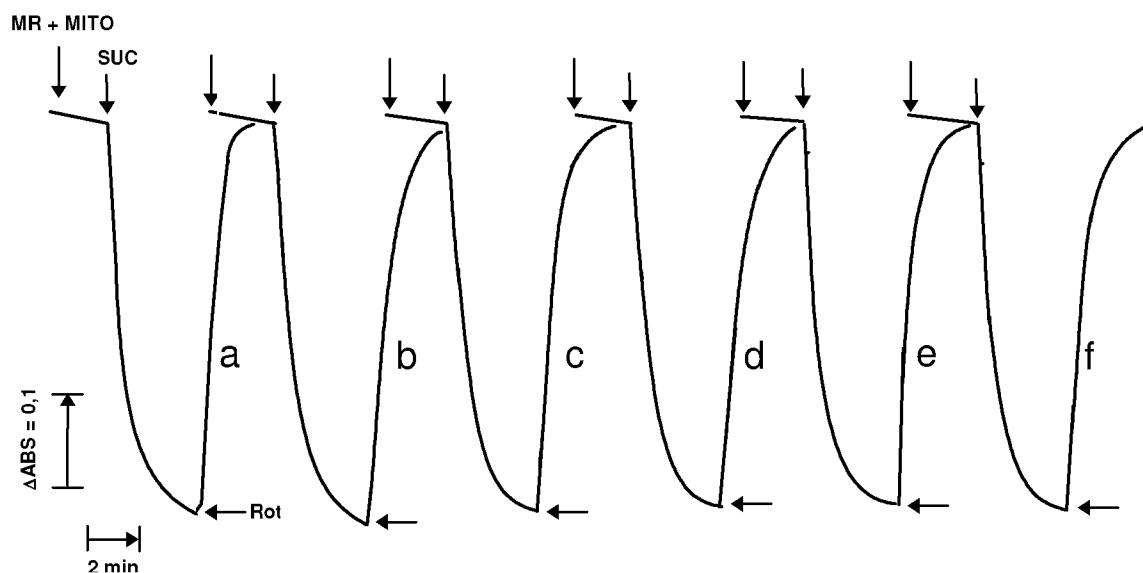


FIGURA 20 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO ENERGIZADAS COM SUCCINATO NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO

SISTEMA: Sacarose $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris-HCl $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, EDTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e mitocôndrias ($1,0 \text{ mg}$) em volume final de 3 mL . O glifosato nas concentrações de **(b)** $0,4$, **(c)** $0,8$, **(d)** $1,6$, **(e)** $3,2$, e **(f)** $12,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubado por dois minutos antes da adição de succinato (SUC) $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A contração foi observada pela adição de NaCN $1,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O traçado **(a)** refere-se ao controle na ausência da deltametrina. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura representa os traçados de três experimentos independentes em triplicata. O inchamento é indicado pela diminuição e a contração pelo aumento na absorbância.

A condição experimental empregada nos experimentos cujos resultados são descritos a seguir inclui a adição, ao sistema, de inibidores da cadeia de transporte de elétrons, nomeadamente a rotenona e a antimicina A. Assim uma eventual interferência do potencial eletroquímico de prótons, gerado pela oxidação de substratos endógenos foi eliminada.

A figura 21 (traçados *a - g*) mostra os efeitos da deltametrina, nas concentrações indicadas, sobre a velocidade e amplitude do inchamento induzido pela valinomicina, na presença de sal de potássio, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O resultado indica que o piretróide, na maior concentração avaliada ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) reduz a velocidade do inchamento (75%), bem como a sua amplitude (25%) (Figura 21, traçado *g*).

Estes resultados indicam que além do efeito no sistema de transporte de elétrons, a deltametrina tem uma ação primária sobre a fração lipídica da membrana mitocondrial, pois a velocidade do inchamento é uma consequência da mobilidade do complexo valinomicina- K^+ através da bicamada lipídica e, então, independente dos outros efeitos da deltametrina sobre o metabolismo mitocondrial.

6.10 EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL DESENERGIZADO

A mesma metodologia foi utilizada para avaliar um possível efeito do glifosato sobre o mecanismo de transporte do complexo valinomicina- K^+ através da bicamada lipídica mitocondrial.

A figura 22 mostra que o glifosato reduziu a amplitude do inchamento mitocondrial induzido pela valinomicina- K^+ , em todas as concentrações utilizadas. O glifosato ($12,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) inibiu a amplitude mitocondrial em 48% e a velocidade em 69% (Figura 22, traçado *f*). À primeira vista, esse resultado pareceu surpreendente, primeiro porque o praguicida não apresentou efeitos sobre os parâmetros anteriormente analisados e segundo porque, por tratar-se de um composto muito hidrofílico, sua inserção na membrana para afetar o parâmetro em análise estaria prejudicada. Embora uma interação do glifosato em regiões mais superficiais da membrana não possa ser descartada, um importante aspecto a ser

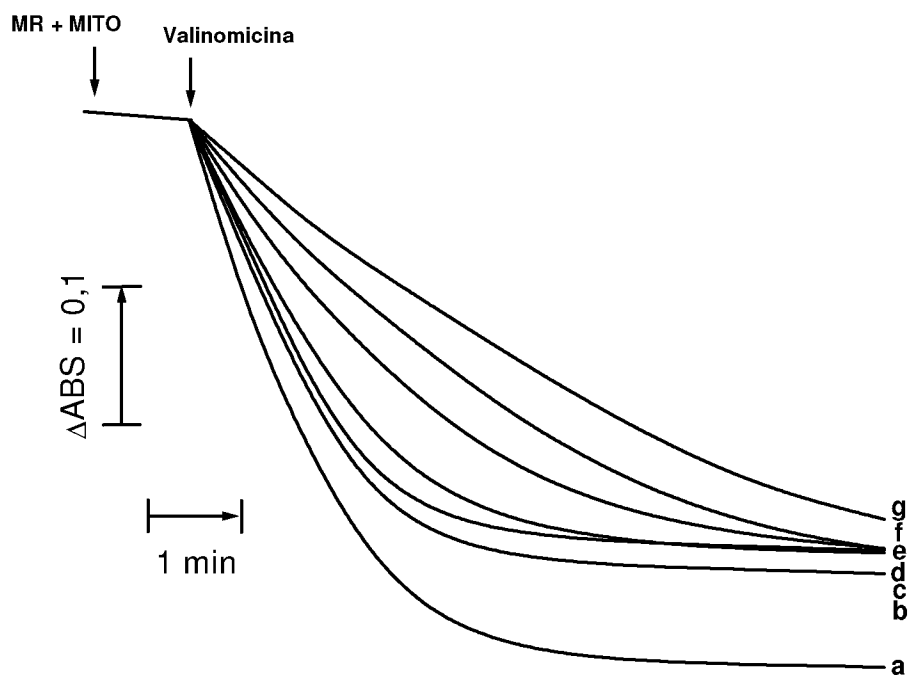


FIGURA 21 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO INDUZIDO POR VALINOMICINA E POTÁSSIO

SISTEMA KNO_3 $135 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES-NaOH $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, antimicina A $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e mitocôndrias (1,0 mg de proteína) em volume final de 3,0 mL. Deltametrina nas doses de (b) 10; (c) 20; (d) 50; (e) 100; (f) 150 e (g) $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubada por 2 minutos antes da adição da valinomicina. O traçado (a) refere-se ao controle na ausência de deltametrina. A reação foi iniciada pela adição de valinomicina $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura representa os traçados de quatro experimentos independentes em triplicata.

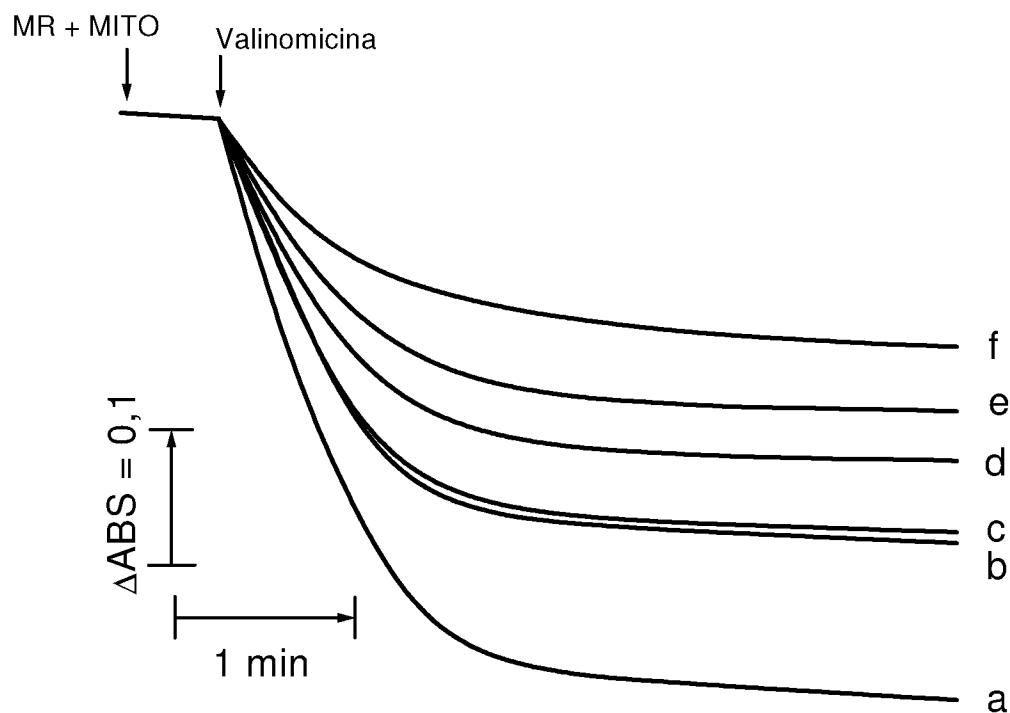


FIGURA 22 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO INDUZIDO POR VALINOMICINA E POTÁSSIO

SISTEMA: KNO_3 $135 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES-NaOH $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, antimicina A $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e mitocôndrias (1,0 mg de proteína) em volume final de 3,0 mL. Glifosato nas concentrações de (b) 0,4; (c) 0,8; (d) 1,6; (e) 3,2 e (f) $12,8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína foi incubado por 2 minutos antes da adição da valinomicina. O traçado (a) refere-se ao controle na ausência de glifosato. A reação foi iniciada pela adição de valinomicina $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. A figura representa os traçados de quatro experimentos independentes em triplicata.

considerado trata-se de uma possível interação do glifosato com o K^+ . Esta é uma possibilidade atraente para justificar o resultado, uma vez que este praguicida apresenta reconhecida propriedade quelante de metais (SUBRAMANIAM & HOGGARD, 1988; BARJA et al., 2001); o meio de reação empregado neste sistema contém K^+ , que complexado a valinomicina, se move através da membrana sendo liberado na matriz. Neste aspecto, a presença do glifosato tornaria o K^+ indisponível, resultando na diminuição do inchamento, como mostrado na figura 22.

6.11 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi$)

Os efeitos inibitórios da deltametrina sobre a velocidade de consumo de oxigênio, atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e inchamento da organela sugerem um comprometimento funcional da organela, em termos do desenvolvimento do potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$). Com a finalidade de avaliar tal possibilidade, o efeito da deltametrina foi então avaliado sobre o $\Delta\psi$ utilizando-se a captação de safranina como indicador do potencial. A safranina é um corante carregado positivamente, e apresenta características espectrais que variam em função de sua concentração. Estas resultam da agregação ou *stacking* da safranina do lado da matriz mitocondrial. A agregação se deve à associação dos radicais positivos da safranina com poliânions ou sítios aniônicos, localizados na porção hidrofóbica da membrana interna (ÅKERMAN & WIKSTRÖN, 1976; ZANOTTI & AZZONE, 1980). Portanto, sob a influência do $\Delta\psi$ obtido pela oxidação de substratos ou pela hidrólise de ATP, a safranina move-se do lado externo para o lado interno da membrana interna (matriz). Esta propriedade é útil para medir o estado energizado em mitocôndrias e as variações na fluorescência podem ser usadas como medida quantitativa do potencial de membrana (ZANOTTI & AZZONE, 1980).

A figura 23 mostra a influência de concentrações crescentes do piretróide deltametrina sobre o $\Delta\psi$ em mitocôndrias oxidando o succinato. Os dados de $\Delta\psi$ em milivolts (mV) foram obtidos através da curva de calibração apresentada na seção de

Materiais e Métodos (item 5.6.2.1). Verifica-se na figura 23 o experimento controle (traçado *a*) onde, na presença de substrato (succinato), o potencial desenvolvido é de aproximadamente 174 mV. A pré-incubação da preparação com o piretróide por 2 minutos leva a uma diminuição progressiva do $\Delta\psi$ em cerca de 40% na concentração de deltametrina de 200 nmol·mg⁻¹ de proteína (Figura 23). O efeito foi dose-dependente, caindo para aproximadamente 165, 151, 147, 145 e 110 mV quando a concentração de deltametrina usada foi de 20, 50, 100, 150 e 200 nmol·mg⁻¹ de proteína, respectivamente (Figura 23).

Os efeitos da deltametrina sobre o $\Delta\psi$ de membrana produziram resultados concordantes com aqueles anteriormente obtidos, que indicam interferência deste piretróide no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, e dos efeitos já discutidos nas figuras 9, 10, e tabela 6. Entretanto, considerando que a velocidade e amplitude do inchamento decorrente da captação de K⁺ na presença de valinomicina foram alterados pela deltametrina (Figura 21), uma investigação mais detalhada da possibilidade da deltametrina alterar características físicas da membrana mitocondrial se tornou relevante para esclarecer se existiria, além do efeito sobre a cadeia respiratória, um efeito sobre a fluidez da membrana. Esta possibilidade foi avaliada através da análise de incorporação de sondas fluorescentes em membranas artificiais e naturais e será apresentada na seqüência.

6.12 EFEITOS DO GLIFOSATO SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi$)

Os efeitos do glifosato sobre o $\Delta\psi$ de membrana também foram avaliados, não rejeitando a hipótese de que este herbicida pudesse alterar o ambiente de membrana e conseqüentemente o $\Delta\psi$. Entretanto, na figura 24 pode ser observado que o glifosato, nas concentrações testadas não alterou o potencial elétrico de membrana.

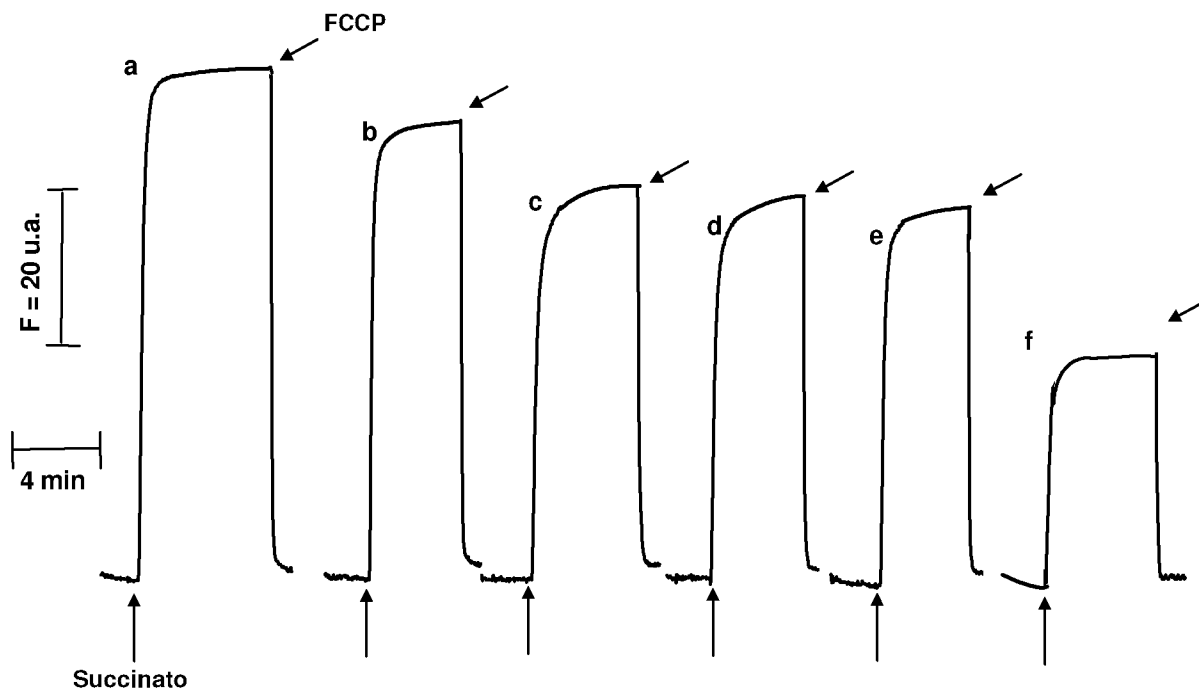


FIGURA 23 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO, ENERGIZADAS COM SUCCINATO DE SÓDIO

SISTEMA: Sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão MOPS $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, NaH_2PO_4 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e rotenona $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, safranina $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína mitocondrial. **(a)** controle sem deltametrina. Após 2 minutos de incubação com deltametrina **(b)** 20; **(c)** 50; **(d)** 100; **(e)** 150; **(f)** $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ foi adicionado succinato de sódio $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A figura representa os traçados de três experimentos independentes em triplicata.

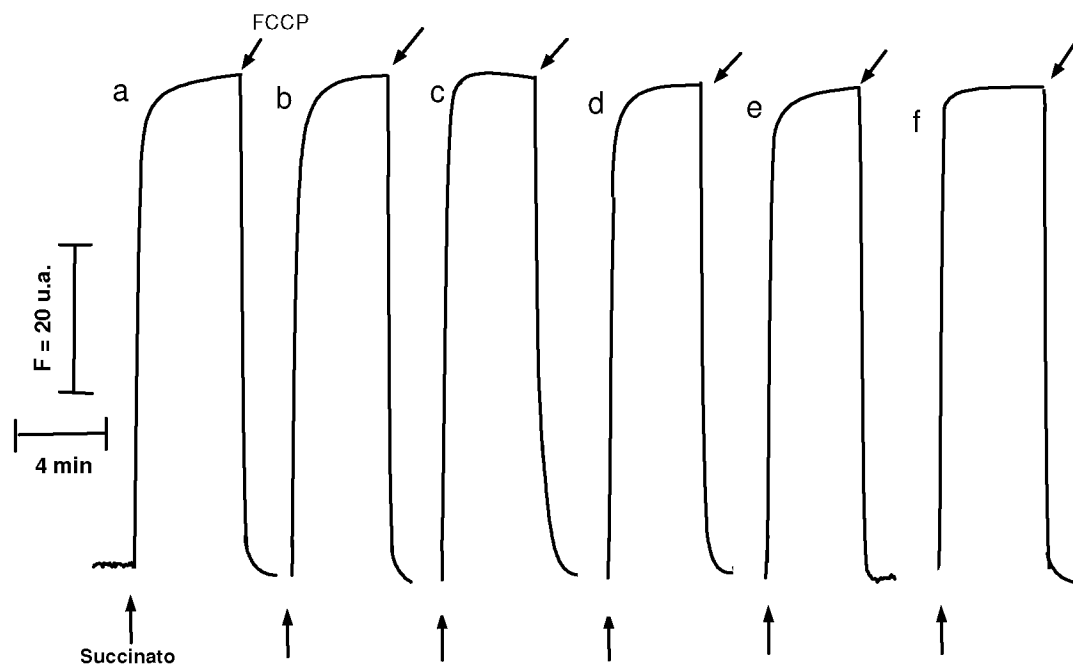


FIGURA 24 - Efeito do glifosato sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato de sódio

SISTEMA: Sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão MOPS $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, NaH_2PO_4 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rotenona $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, safranina O $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína mitocondrial. (a) controle sem glifosato. Após 2 minutos de incubação com glifosato (b) $0,4$; (c) $0,8$; (d) $1,6$; (e) $3,2$; (f) $12,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$, foi adicionado succinato de sódio $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A figura representa os traçados de três experimentos independentes em triplicata.

6.13 EFEITO DA DELTAMETRINA E DO GLIFOSATO SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DAS SONDAS 1,6-DIFENIL-1,3,5-HEXATRIENO (DPH) E 1,6-DIFENIL-1,3,5-HEXATRIENO-ÁCIDO PROPIÔNICO (DPH-PA) INCORPORADAS EM MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS (MITOCÔNDRIAS)

Compostos lipossolúveis distribuem-se em regiões hidrofóbicas de membranas ou em sítios protéicos nela inseridos podendo afetar funções como a difusão lateral de proteínas, a qual é importante para o acoplamento de unidades catalíticas de enzimas bem como para a ligação de íons bivalentes na superfície da membrana (GOLDSTEIN, 1984).

Considerando que as principais atribuições da membrana mitocondrial envolvem: (a) função de barreira e transdução de energia, que permite a formação de gradientes iônicos que podem ser utilizados para dirigir vários processos endergônicos, e (b) a formação de uma matriz para inserção de proteínas (enzimas), as alterações na integridade da membrana como resultado de interação de solutos lipofílicos com diferentes componentes da membrana, podem levar a dramáticas mudanças na estrutura da membrana (SIKKEMA et al., 1995).

Portanto, em função dos efeitos observados da deltametrina sobre alguns dos parâmetros mitocondriais avaliados, tais como: a inibição da cadeia de transporte de elétrons, inibição do inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas com glutamato e succinato, inibição do inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas e inibição do potencial elétrico de membrana, uma avaliação da interação da deltametrina com membranas artificiais foi realizada. Nestes experimentos foram utilizadas membranas artificiais, preparadas como lipossomas multilamelares constituídos de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC).

As perturbações na organização da bicamada lipídica podem ser induzidas pela temperatura, bem como por vários agentes químicos levando a alterações do perfil de transição das cadeias acil que envolvem a passagem do estado gel para o estado líquido cristalino. Durante a fase gel, as cadeias acil estão em forma altamente ordenada sendo que essa organização exige que todas as ligações carbono-carbono (C-C) estejam na conformação trans. Já no estado líquido

cristalino, algumas ligações C-C estão na conformação *gauche* (JAIN & WU, 1977).

A medida da polarização de fluorescência emitida por sondas específicas localizadas em diferentes regiões da membrana reflete a mobilidade destas sondas no ambiente hidrofóbico da membrana. As sondas imobilizadas numa matriz rígida e excitadas por luz polarizada emitem fluorescência que é polarizada paralela ou perpendicularmente a luz excitante. Um decréscimo na polarização de fluorescência desta sonda é uma medida de desordem da bicamada onde a mesma está inserida (GOLDSTEIN, 1984). As sondas utilizadas neste estudo foram a 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e seu derivado 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA). A sonda DPH fica localizada numa região mais hidrofóbica da membrana (cerne), enquanto a sonda DPH-PA fica ancorada próxima à região polar da bicamada (superfície) devido ao seu grupamento ácido propiônico. Desta forma, informações sobre regiões diferentes da bicamada podem ser obtidas a partir dos valores de polarização de fluorescência, isto é, um alto grau de polarização representa uma alta ordem estrutural ou uma baixa fluidez de membrana.

6.13.1 Efeitos da deltametrina sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH em membrana artificial

Neste estudo, o traçado da transição de fase, dependente da temperatura, será denominado de perfil termotrópico.

A figura 25 mostra o perfil termotrópico obtido quando as preparações contendo a sonda DPH, foram tratadas com o solvente da deltametrina (8 μ L de DMSO) na concentração final de 0,25% (v/v), correspondente ao mesmo volume utilizado quando a concentração de 120 μ mol·L⁻¹ de deltametrina foi analisada. Observa-se que na presente condição experimental o solvente não interferiu com o perfil termotrópico de fase de membranas de DMPC do controle, as quais continham somente as membranas de DMPC e a sonda DPH. Nesta condição (ausência de deltametrina), a temperatura média de transição de fase (T_m) foi de 23,5 °C, e não se alterando quando DMSO estava presente (Figura 25). Este valor é semelhante ao descrito por outros autores que utilizaram esta mesma metodologia (ANTUNES-MADEIRA et al., 1991; CADENA et al., 2002). A T_m corresponde à temperatura na

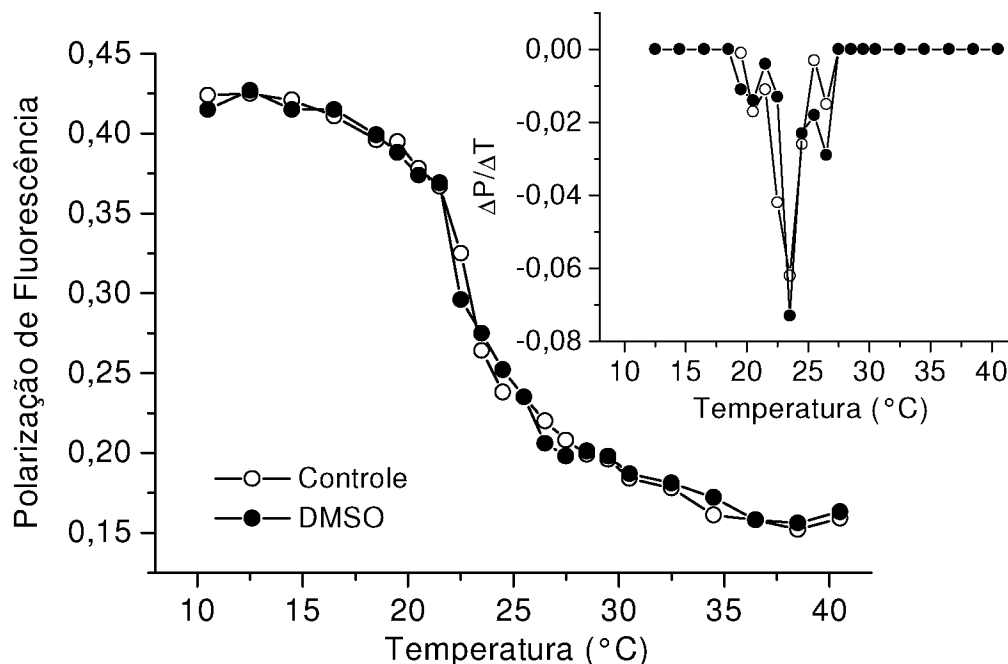


FIGURA 25 - EFEITO DO DMSO (0,25% v/v), SOBRE TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. Uma alíquota da solução concentrada de DPH foi injetada, sob agitação vigorosa em vórtex, na suspensão de membranas (DMPC) mantidas a 28°C. A concentração final de sonda e o quociente sonda/lípido foram ajustados para $1,73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1/200, respectivamente. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 horas na presença de DMSO (8 μL) na concentração final de 0,25 % (v/v). O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura (°C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes

qual os fosfolípidios passam do estado de gel para o de líquido-cristalino. Abaixo da T_m as cadeias acil dos ácidos graxos estão empacotadas de forma ordenada, o que restringe o movimento das sondas, resultando em altos valores de polarização. Acima da T_m as cadeias acil dos ácidos graxos estão desordenadas e possuem uma maior liberdade de movimento, permitindo, assim, que as sondas também se movimentem com maior facilidade, o que resulta em valores mais baixos de polarização. Portanto o DMSO 0,25% (v/v) não alterou a fluidez de membrana no volume correspondente a maior concentração de deltametrina ($120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizada nestes experimentos.

As figuras 26, 27 e 28 mostram os efeitos da deltametrina nas concentrações de 40, 60, e $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, sobre o perfil termotrópico de transição de fase de membranas de DMPC, quando se utilizou a sonda DPH.

A análise da figura 26 evidencia alterações causadas pelo piretróide na concentração de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, perturbando o ambiente hidrofóbico da membrana de maneira significativa. Tal alteração é mais evidente nas temperaturas abaixo da T_m sugerindo que a deltametrina perturba o ambiente lipídico no estado gel, conforme observado pela diminuição dos valores de polarização. O perfil termotrópico também sugere uma antecipação do início da fase de transição. Através do gráfico (inserto) na figura 26, obtido pelo cálculo de $\Delta P/\Delta T$, esta antecipação reflete uma mudança na temperatura média de transição de fase de $23,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (controle) para $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (deltametrina $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Portanto, a diminuição nos valores de polarização em temperaturas abaixo da T_m , promoveu uma diminuição de $1 \text{ }^\circ\text{C}$ na T_m .

Quando a concentração de deltametrina utilizada nestes experimentos foi de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 27), as modificações no perfil termotrópico tornaram-se mais evidentes. O piretróide provoca uma diminuição dos valores de polarização em relação ao controle na região abaixo da T_m , semelhante ao observado na concentração de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 25). Porém, acima da T_m , os valores de polarização para a concentração de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foram superiores aos do controle.

O efeito condensante sobre as membranas de DMPC pela deltametrina ficou mais evidente quando a concentração utilizada foi de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 28). Nesta concentração e acima da T_m , os valores de polarização foram superiores

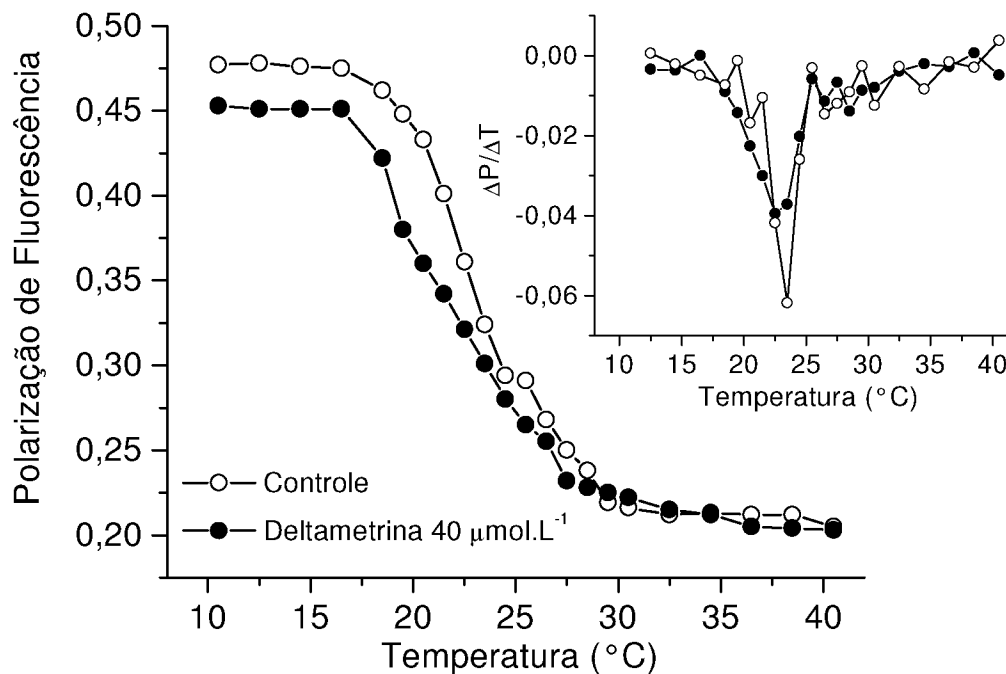


FIGURA 26 - EFEITOS DA DELTAMETRINA (40 µmol.L⁻¹) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 horas na presença de deltametrina 40 µmol.L⁻¹. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura (°C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

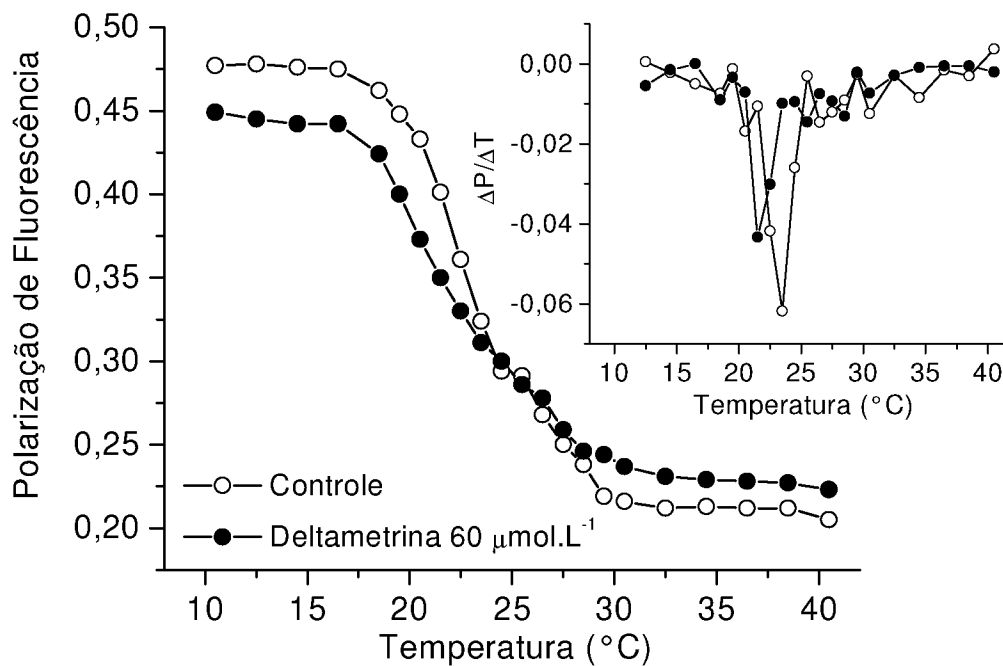


FIGURA 27 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH.

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 horas na presença de deltametrina $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O incerto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura (°C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

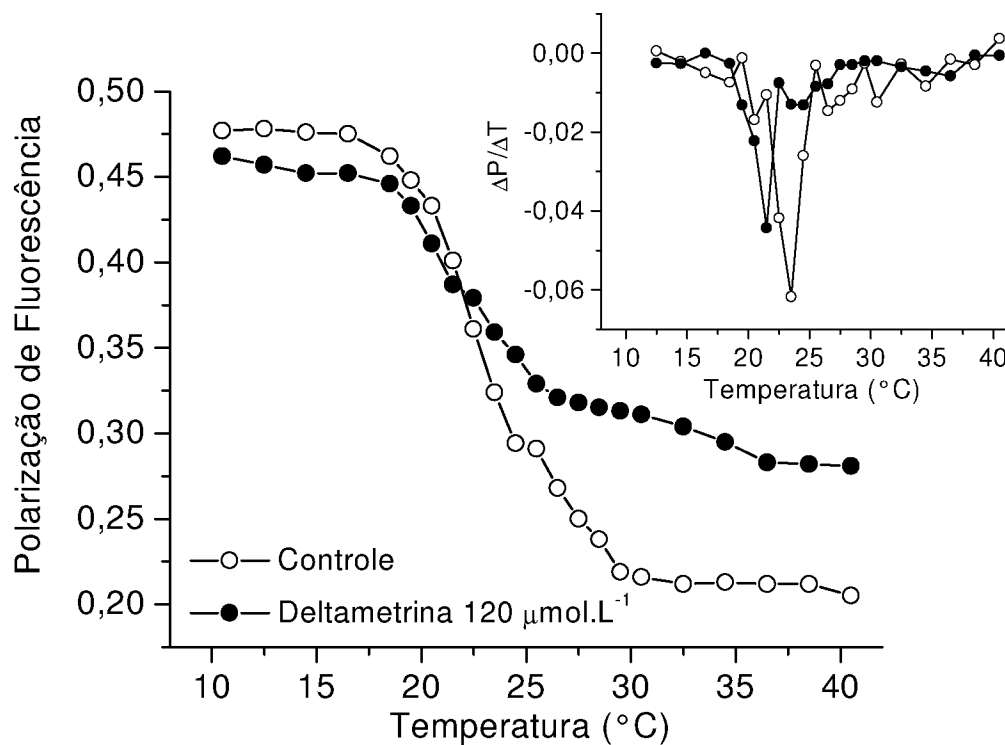


FIGURA 28 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($120 \mu\text{mol.L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 horas na presença de deltametrina $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura (°C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

aos da concentração anterior e aos do controle. Da mesma forma esta alteração no perfil termotrópico refletiu na T_m do lipídio utilizado, deslocando a T_m de 23,5 para 21,5°C (Figura 28, inserto).

6.13.2 Efeitos da deltametrina sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH-PA em membrana artificial

As análises de polarização de fluorescência utilizando membranas de DMPC também foram realizadas com a sonda DPH-PA, que monitora as regiões superficiais da membrana.

A figura 29 mostra o perfil termotrópico obtido quando as preparações contendo a sonda DPH-PA, foram tratadas com o solvente da deltametrina (8 μL DMSO) em concentração final de 0,25% (v/v), correspondente ao mesmo volume de deltametrina $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Observa-se que o solvente utilizado para solubilizar a deltametrina, não interferiu com o perfil termotrópico de fase de membranas de DMPC do controle, as quais continham somente as membranas de DMPC e a sonda DPH. A temperatura média de transição de fase (T_m), determinada através desta sonda, nos experimentos controle (ausência de deltametrina), foi estimada em 23,5°C, e manteve-se a mesma quando DMSO estava presente (Figura 29). O valor encontrado para o controle foi semelhante ao descrito por outros autores que utilizaram esta mesma metodologia (ANTUNES-MADEIRA et al., 1991; CADENA et al., 2002).

As figuras 30, 31 e 32 mostram os efeitos da deltametrina nas concentrações de 40, 60, e $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, sobre o perfil termotrópico de transição de fase de membranas de DMPC, utilizando sonda DPH-PA.

Na figura 30, nenhuma alteração significativa no perfil termotrópico foi observada quando deltametrina ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi incubada com as membranas de DMPC e a sonda DPH-PA. Portanto, a temperatura média de transição de fase para a deltametrina $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ permaneceu igual àquela para o controle (23,5°C).

Quando a concentração de deltametrina utilizada foi de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (figura 31), uma diminuição significativa nos valores de polarização abaixo da T_m foi

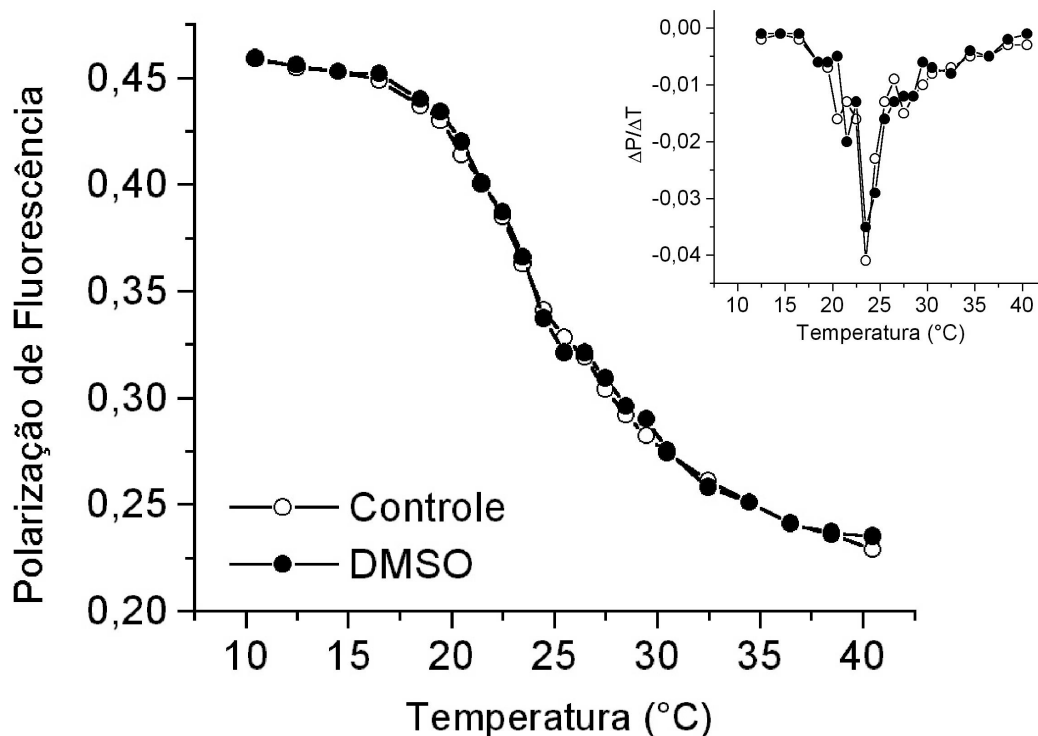


FIGURA 29 - EFEITO DO DMSO (0,25% v/v), SOBRE TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por 2 horas na presença de DMSO (8 μ L) na concentração final de 0,25% (v/v). O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}$ C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

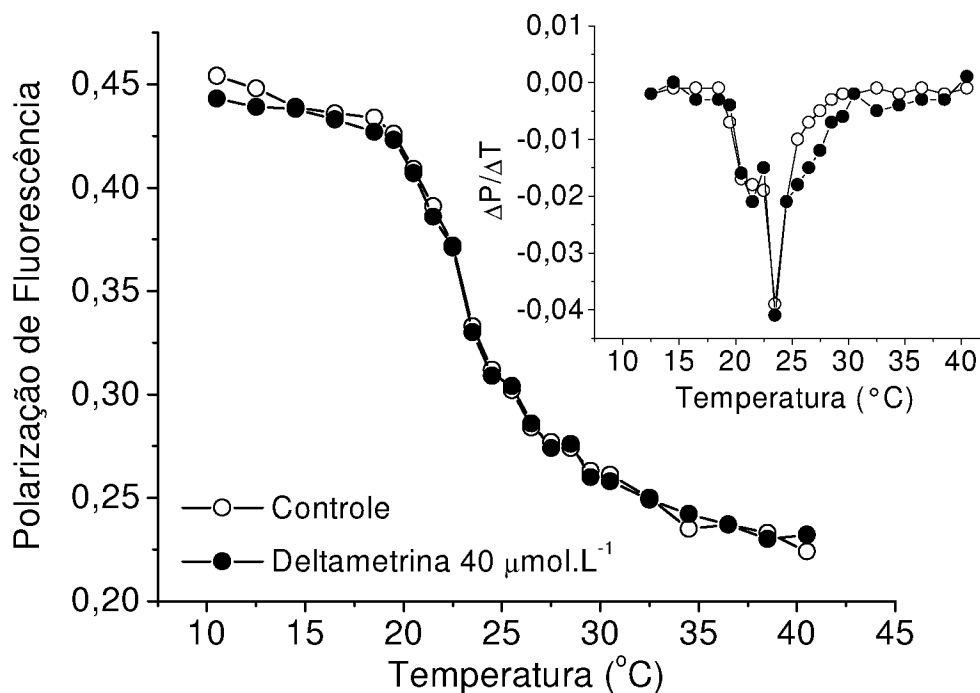


FIGURA 30 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de deltametrina $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

observado, sugerindo um maior fluidez da membrana nesta região mais hidrofílica da membrana. No entanto, a T_m não foi afetada pela deltametrina na concentração de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, com esta sonda.

A figura 32 mostra o efeito da deltametrina $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a transição de fase do DMPC na presença da sonda DPH-PA. Na presença do piretróide, valores de polarização de fluorescência inferiores ao controle durante a fase gel, ou seja, abaixo da T_m , sugerem uma antecipação da transição de fase do lipídio e um aumento na fluidez da membrana nesta região. Após a T_m , isto é, na fase líquida cristalina, o aumento nos valores de polarização foi observado, sugerindo o efeito condensante sobre a membrana de DMPC, durante a fase de líquido cristalino. Nesta condição, T_m diminuiu em 2°C , caindo de $23,5^\circ\text{C}$ para $21,5^\circ\text{C}$.

Estes resultados mostram que a deltametrina nas concentrações estudadas perturba o ambiente lipídico de membranas, tanto na região hidrofóbica quanto na hidrofílica ou mais superficial. No entanto, os dados são sugestivos de maior interação da deltametrina com a região hidrofóbica do que com a hidrofílica, como pode ser inferido da menor variação da polarização de fluorescência da sonda DPH-PA quando comparada à sonda DPH, sugerindo que o piretróide teria menor efeito sobre a organização dos domínios polares da membrana.

Tal localização preferencial na região mais hidrofóbica da membrana, está de acordo com as características de solubilidade da deltametrina que é extremamente baixa em soluções aquosas ($K_{ow} = 4,6$ à 25°C) (TOMLIN,1995).

Por outro lado, a diminuição nos valores de polarização de fluorescência quando os fosfolipídios estão no estado líquido-cristalino (Figuras 27, 28 e 32), tanto para a sonda DPH quanto para a sonda DPH-PA, indicam que o piretróide provoca aumento da rigidez na membrana.

6.13.3 Efeitos da deltametrina sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH em membrana natural

Embora demonstrado de forma inequívoca a interação da deltametrina com membranas, os resultados descritos foram obtidos com liposomas de DMPC, cujo ácido graxo (C_{14}) tem cadeia saturada. Considerando que em membranas naturais

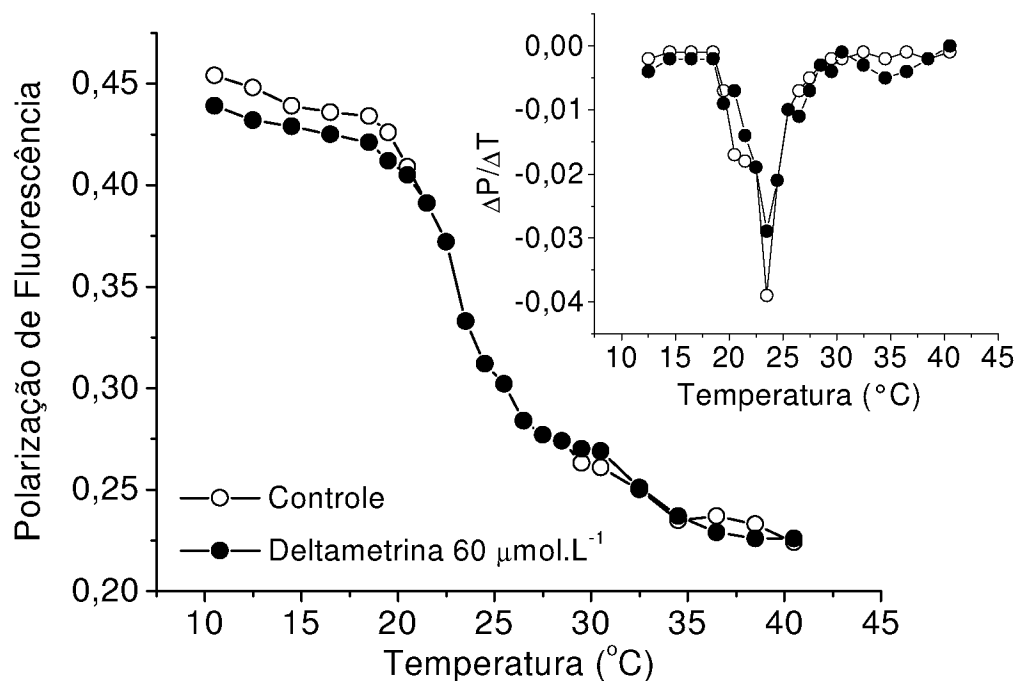


FIGURA 31 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de deltametrina $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

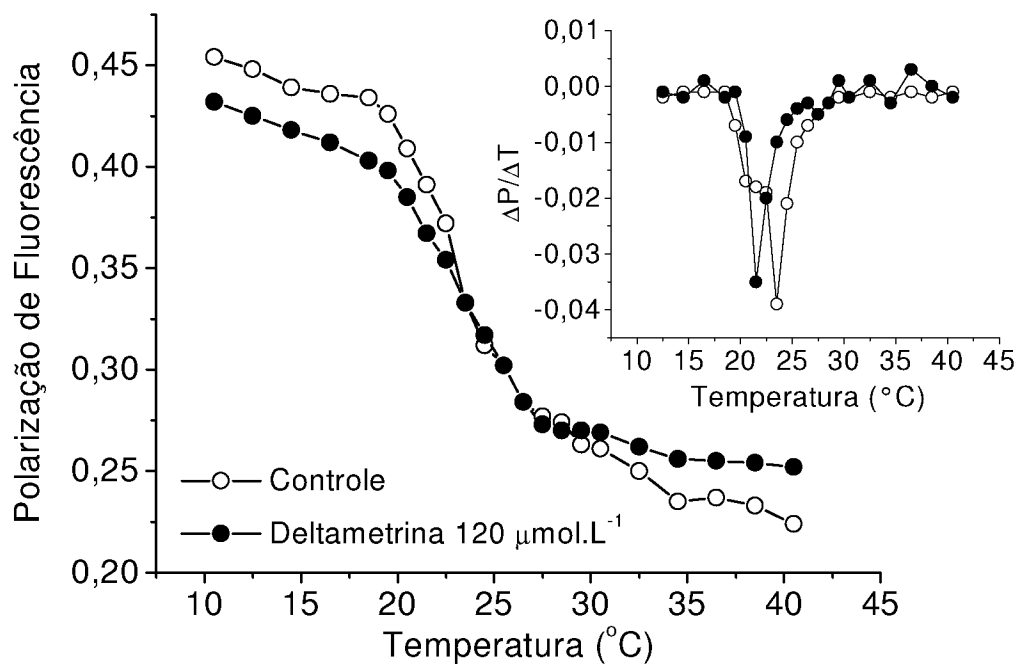


FIGURA 32 - EFEITOS DA DELTAMETRINA ($120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de deltametrina $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

como a membrana mitocondrial interna, os fosfolipídios constituintes possuem alto percentual de ácidos graxos insaturados, as análises de polarização de fluorescência foram estendidas também a estas, sendo utilizado como modelo a própria membrana mitocondrial, em experimentos que utilizaram as mesmas sondas DPH e DPH-PA.

Dependendo do conteúdo de colesterol presente em uma membrana, a polarização de fluorescência de membranas nativa varia linearmente com a variação da temperatura (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA 1990; ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA 1989). Outro fator importante é a presença de proteínas de membrana. A grande quantidade de dados disponíveis sobre a dinâmica de componentes da membrana sugere que a fluidez e as propriedades funcionais das membranas biológicas é alcançada pela colaboração entre proteínas e lipídios (SHINITZKY & BARENHOLZ, 1978).

Como as membranas mitocondriais são isentas de colesterol (ANTUNES-MADEIRA & MADEIRA, 1990) estas permanecem no estado líquido cristalino, não havendo uma acentuada passagem do estado gel para o de líquido-cristalino, tal como é observado para as membranas artificiais de DMPC.

A polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA, inseridas nas bicamadas de membranas de mitocôndrias de fígado de rato foi monitorada seguindo o aumento de temperatura de 0,1 °C a partir de 10,5 até 40,5 °C para cada concentração de deltametrina utilizada.

A figura 33 mostra o perfil termotrópico de membranas mitocondriais nativas, obtido quando as preparações contendo a sonda DPH, foram tratadas com o solvente da deltametrina (8 µL de DMSO) em concentração final de 0,25% (v/v), correspondente ao mesmo volume de deltametrina 120 µmol·L⁻¹. Observa-se que o solvente utilizado para solubilizar o piretróide, não interferiu no perfil termotrópico de membranas mitocondriais (controle), as quais continham somente as membranas mitocondriais e a sonda DPH (coeficiente de correlação -0,961 para o controle e -0,978 para o DMSO). Ainda na figura 33 pode ser observado o efeito da incubação da deltametrina nas concentrações de 40 e 60 µmol·L⁻¹, sob a faixa de temperatura em estudo (10,5 - 40,5°C). Um aumento nos valores de polarização de fluorescência em relação ao controle foi observado, indicando um efeito de enrigecimento da

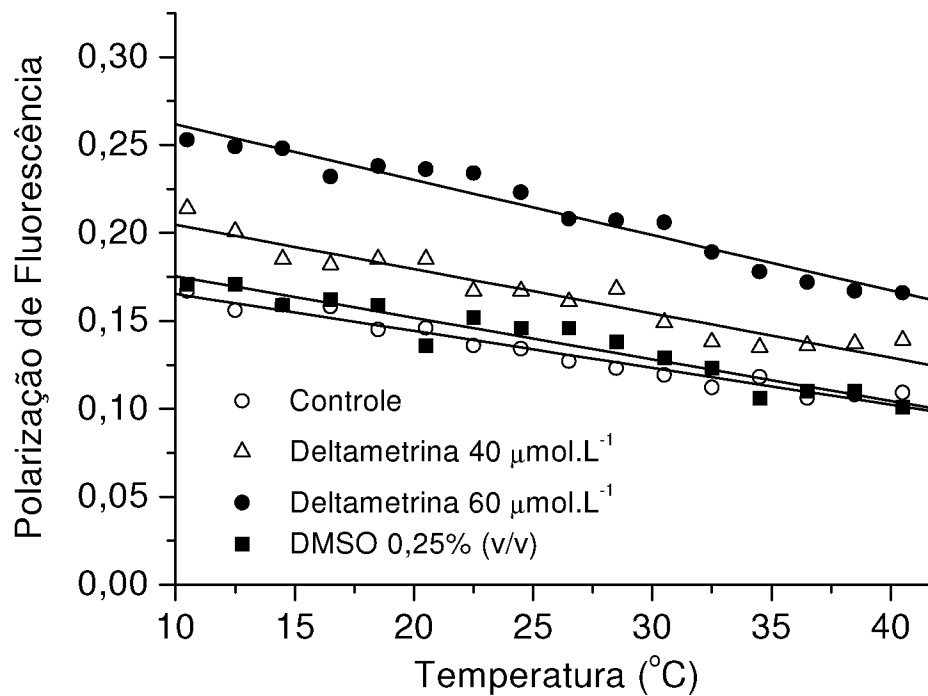


FIGURA 33 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas mitocondriais foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo a sonda foram incubadas por 2 horas na presença de deltametrina 40 e 60 µmol.L⁻¹, ou na presença de DMSO (8 µL) na concentração final de 0,25 % (v/v). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

membrana. Este comportamento é similar ao descrito para a ação da deltametrina observada com as membranas artificiais de DMPC, em temperaturas acima da T_m (Figura 27).

6.13.4 Efeitos da deltametrina sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH-PA em membrana natural

Os efeitos da deltametrina também foram avaliados em membranas mitocondriais incubadas com a sonda DPH-PA.

A figura 34 mostra o perfil termotrópico de membranas mitocondriais obtido quando as preparações contendo a sonda DPH-PA, foram tratadas com o solvente (8 μL de DMSO) em concentração de 0,25% (v/v), correspondente ao mesmo volume de deltametrina $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (coeficiente de correlação para o controle = -0,964 e para o DMSO = -0,925). Nesta condição, o solvente utilizado para solubilizar o piretróide, não interferiu com o perfil termotrópico de fase de membranas mitocondriais do controle, as quais continham somente as membranas mitocondriais e a sonda DPH-PA.

Na concentração de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ o piretróide (Figura 34), não alterou a mobilidade da sonda DPH-PA, como se depreende dos valores de polarização, que foram semelhantes aos dos experimentos controle.

Quando a concentração utilizada foi $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de deltametrina (Figura 34), o efeito condensante da membrana é caracterizado pela observação dos valores de polarização superiores aos do controle.

6.13.5 Efeitos do glifosato sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH em membrana artificial

Devido ao acentuado efeito do glifosato sobre o inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e K^+ (Figura 22), uma avaliação dos possíveis efeitos deste herbicida sobre lipossomas de DMPC e membranas mitocondriais tornou-se importante, a fim de esclarecer a natureza deste efeito.

A figura 35 mostra que o glifosato não altera significativamente o perfil

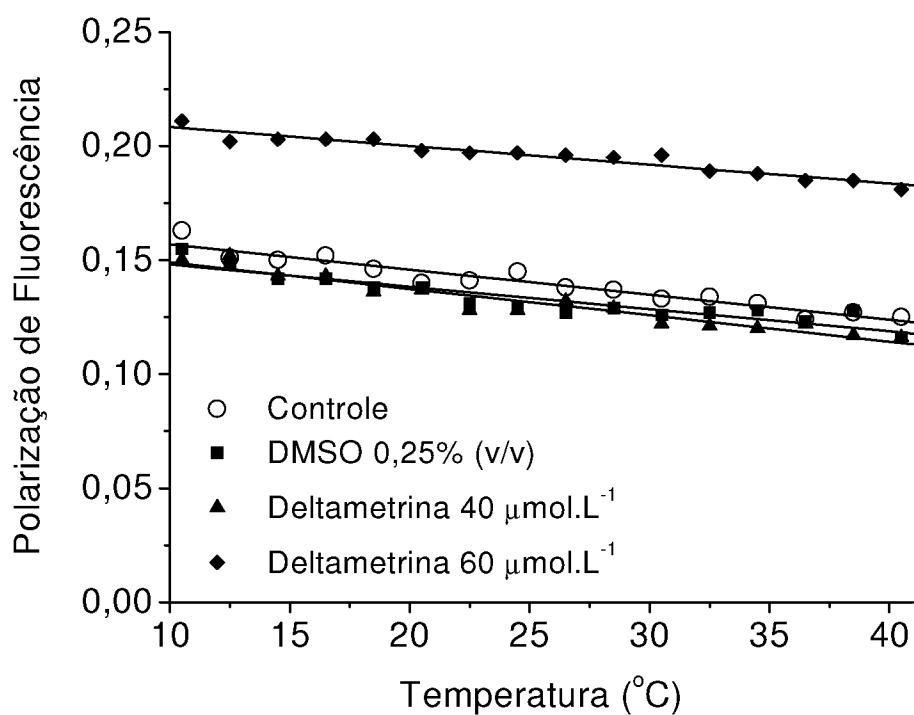


FIGURA 34 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas mitocondriais foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo a sonda foram incubadas por duas horas na presença de DMSO (8 µL) na concentração final de 0,25 % (v/v). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

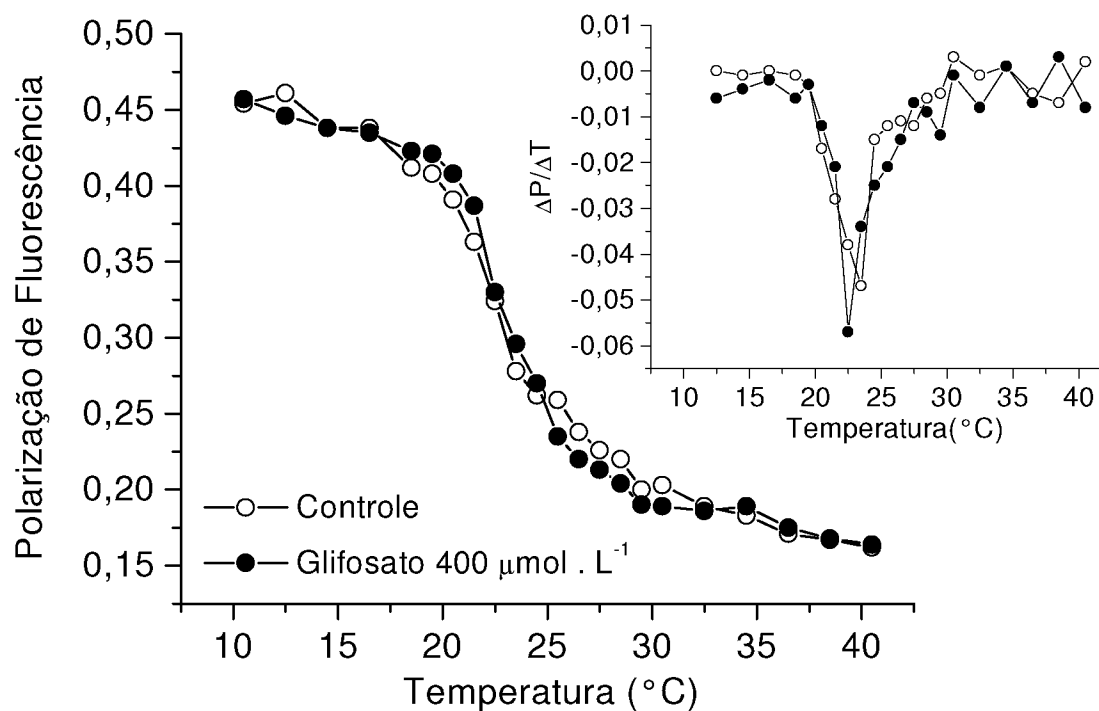


FIGURA 35 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

termotrópico das membranas de DMPC quando a concentração do defensivo foi de $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Porém uma diminuição de 1°C na T_m de transição de fase do fosfolípido foi observado (de $23,5$ para $22,5^\circ\text{C}$) quando a sonda utilizada foi DPH. Com o aumento da concentração do glifosato (Figura 36) foram observadas alterações discretas do perfil termotrópico na região de $24,5^\circ\text{C}$ até $27,5^\circ\text{C}$ em relação ao controle, acompanhada da diminuição da T_m em 1°C (de $23,5^\circ\text{C}$ para $22,5^\circ\text{C}$).

6.13.6 Efeitos do glifosato sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH-PA em membrana artificial

As figuras 37 e 38 demonstraram que o glifosato não interfere no perfil termotrópico de membranas de DMPC quando a sonda de DPH-PA foi utilizada. Nenhuma alteração da polarização ou da T_m foi observada nestes experimentos, o que é compatível com as características estruturais do composto, que é polar.

6.13.7 Efeitos do glifosato sobre a polarização de fluorescência da sonda de DPH e DPH-PA em membrana natural

Da mesma forma, quando foram utilizadas membranas mitocondriais e as sondas de DPH (Figura 39) e DPH-PA (Figura 40), e glifosato na concentração de $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, não foi observado alterações significativas nos valores de polarização de fluorescência em relação ao controle. Os valores dos coeficientes de correlação (r) obtidos foram $-0,966$ e $-0,963$ para os controles, e $-0,981$ e $-0,961$ para o glifosato, com as sondas de DPH e DPH-PA, respectivamente (Figuras 38 e 39).

Os resultados destes experimentos excluem efeitos do glifosato sobre membranas artificiais e naturais. Portanto, a inibição do inchamento mitocondrial em preparações desenergizadas demonstrada na figura 21, reforça a proposição da provável interação entre o glifosato e o K^+ , que fica indisponível para transpor a membrana, via o ionóforo valinomicina.

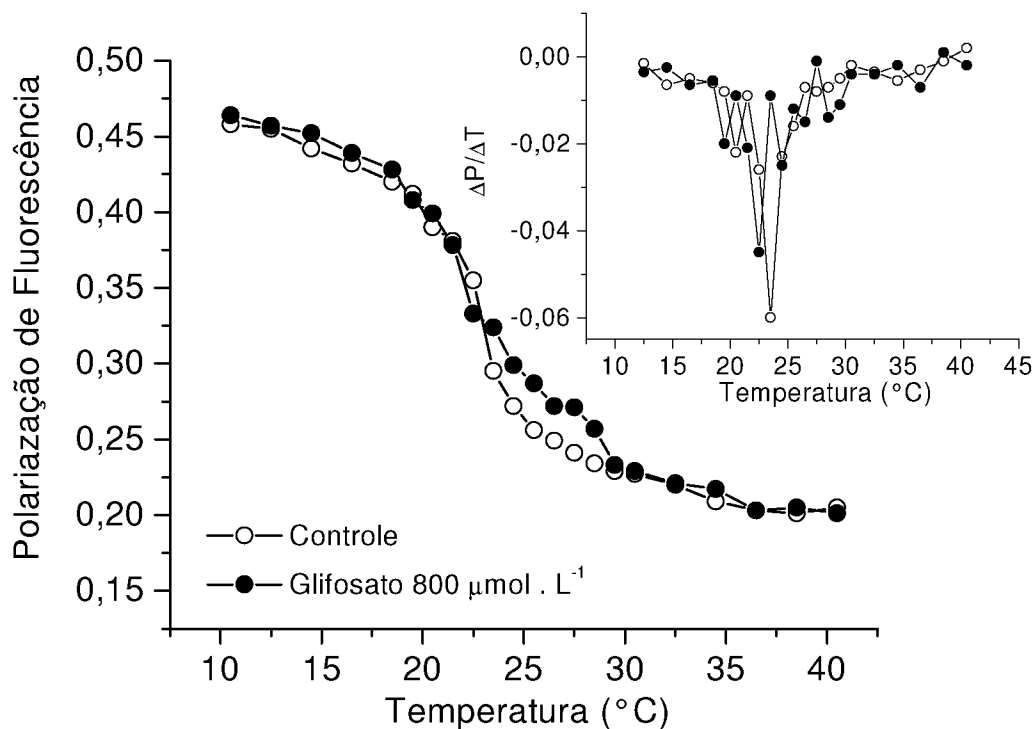


FIGURA 36 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura (°C). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

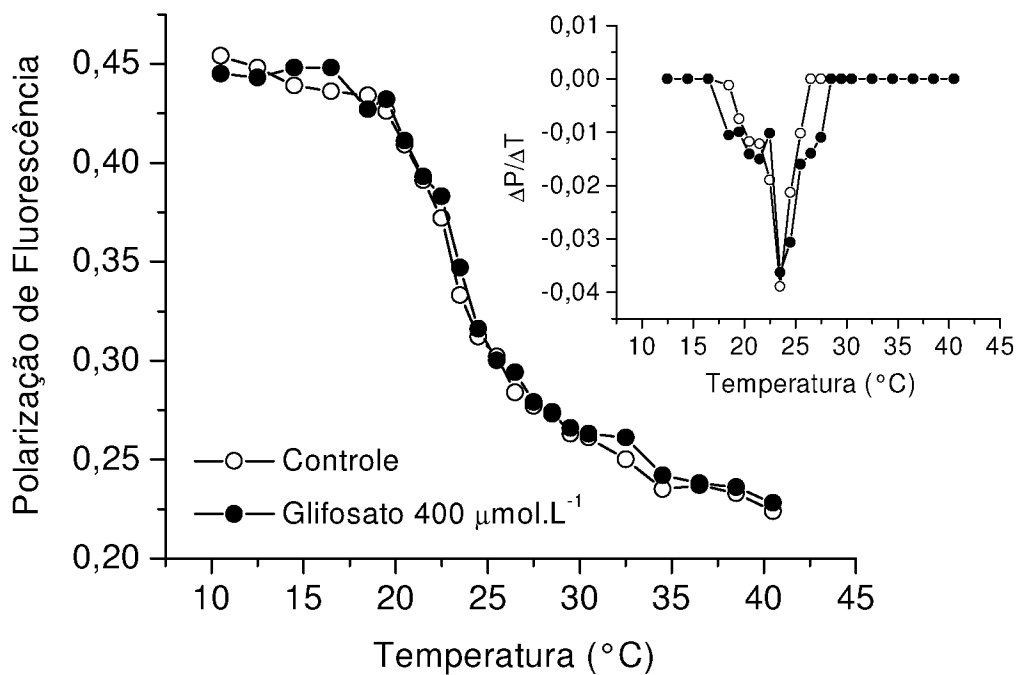


FIGURA 37 - EFEITOS DO GLIFOSATO ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

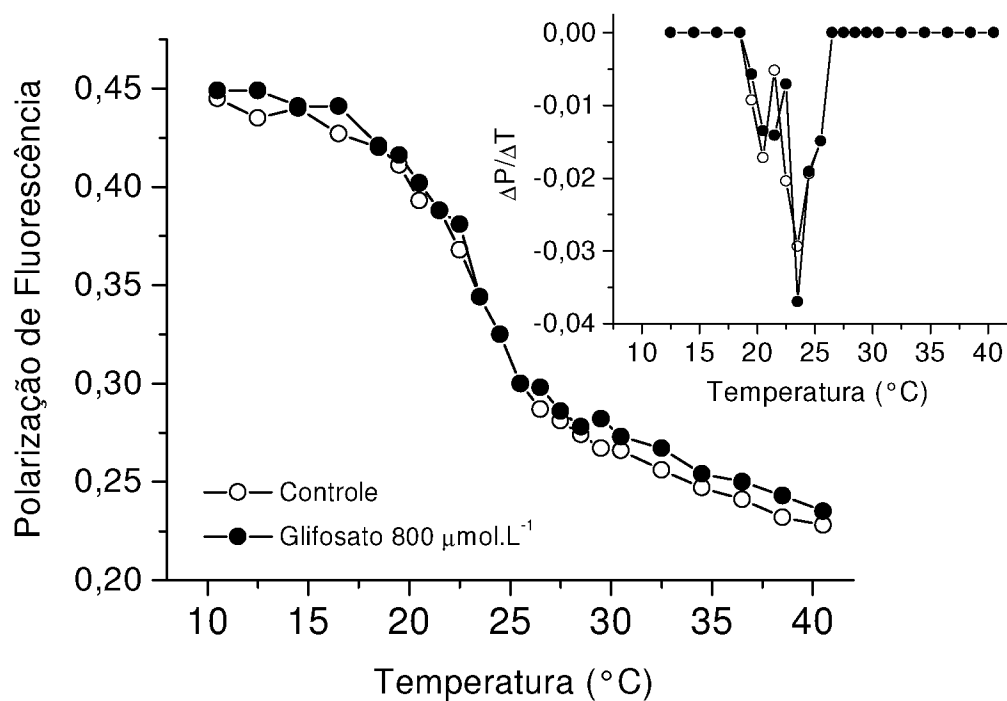


FIGURA 38 - EFEITOS DO GLIFOSATO (800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NA TRANSIÇÃO TERMOTRÓPICA DE FASE DE BICAMADAS DE DMPC, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas de DMPC foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O inserto representa a polarização diferencial da sonda de DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

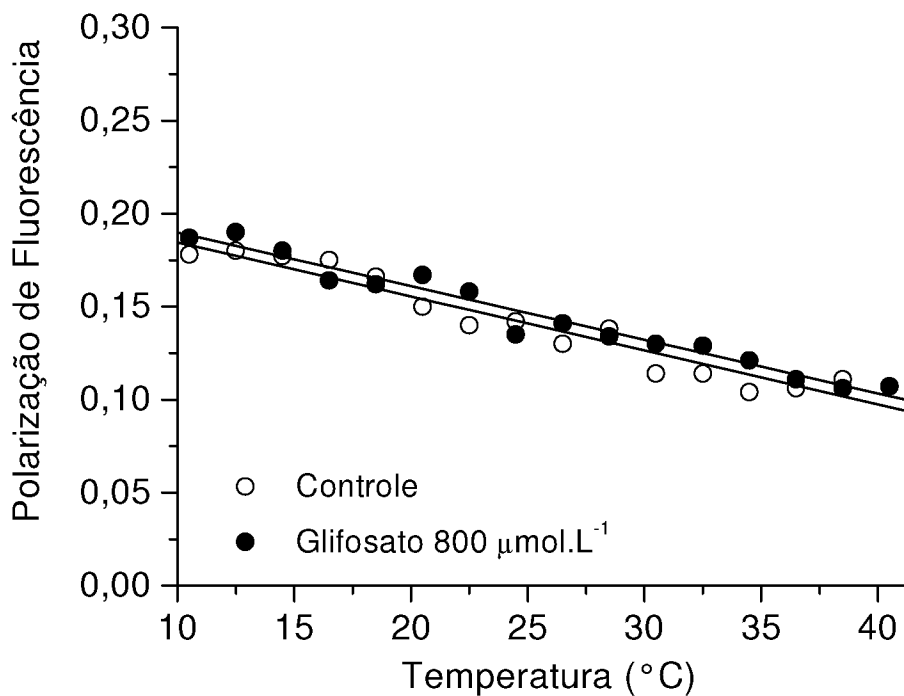


FIGURA 39 - EFEITOS DA GLIFOSATO (800 µmol.L⁻¹) NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH

SISTEMA: Membranas mitocondriais foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato 800 µmol.L⁻¹. Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

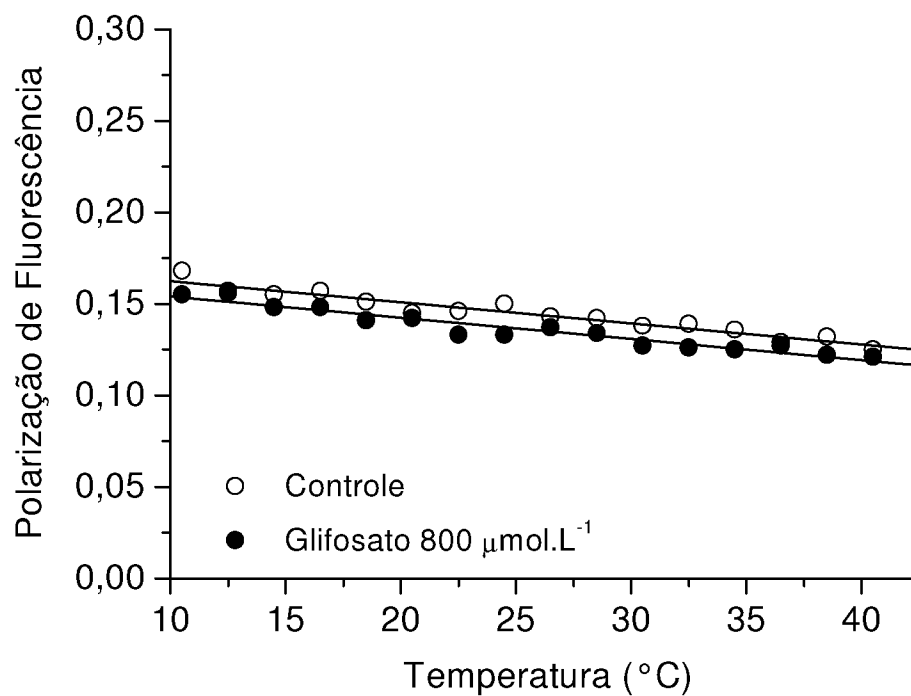


FIGURA 40 - EFEITOS DA GLIFOSATO (800 µmol.L⁻¹) NA FLUIDEZ DE MEMBRANAS MITOCONDRIAIS, DETERMINADO POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DPH-PA

SISTEMA: Membranas mitocondriais foram preparadas como no item 5.6.9. As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas por duas horas na presença de glifosato 800 µmol.L⁻¹. Os valores no gráfico são as médias de 3 experimentos independentes.

6.14 DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO-INDUZIDA PELA DELTAMETRINA E GLIFOSATO

A toxicidade dos piretróides pode estar ligada a diferentes mecanismos, incluindo o estresse oxidativo e geração de ERO (MAITI et al., 1995; GUPTA et al., 1999; KALE et al., 1999; GABBIANELLI et al., 2002). Neste contexto KALE et al. (1999) observaram um aumento na peroxidação lipídica bem como na atividade das enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além da concentração de glutatona reduzida (GSH) em eritrócitos de ratos expostos a piretróides. Desta forma considerando estes estudos, uma investigação dos efeitos da deltametrina sob este enfoque em mitocôndrias isoladas tornou-se relevante. Assim, o processo de lipoperoxidação em preparações mitocondriais expostas a deltametrina, foi avaliado através da reação com o ácido tiobarbitúrico segundo BUEGE & AUST (1978).

A lipoperoxidação, quando ocorre em membranas mitocondriais, resulta em perda irreversível das funções da organela, tais como a respiração mitocondrial, a fosforilação oxidativa e o transporte iônico (VLADIMIROV et al., 1980; MASINI et al., 1985).

A lipoperoxidação, processo que pode ser induzido por muitos diferentes agentes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), é iniciado por um radical livre, o qual abstrai um átomo de hidrogênio de ácidos graxos insaturados da membrana, levando a geração de radicais lipídicos, os quais combinam-se com o oxigênio molecular ($L^{\bullet} \rightarrow LOO^{\bullet}$). Os radicais formados propagam a reação de lipoperoxidação que pode ser interrompida pela reação entre dois radicais lipídicos ou por antioxidantes como a vitamina E (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Neste trabalho foram utilizados ADP e $FeCl_3$ para induzir a lipoperoxidação em mitocôndrias energizadas pela oxidação de 2-oxoglutarato. Neste sistema, o complexo $ADP-Fe^{3+}-O_2^{\bullet}$ inicia a reação de lipoperoxidação (SASSA et al., 1994).

A figura 41 mostra que a deltametrina estimulou o processo de lipoperoxidação em mitocôndrias de fígado de rato. Na concentração de $10 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína o estímulo foi significativo somente no tempo de 45 minutos. Com deltametrina $100 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína a partir de 30 minutos já foi

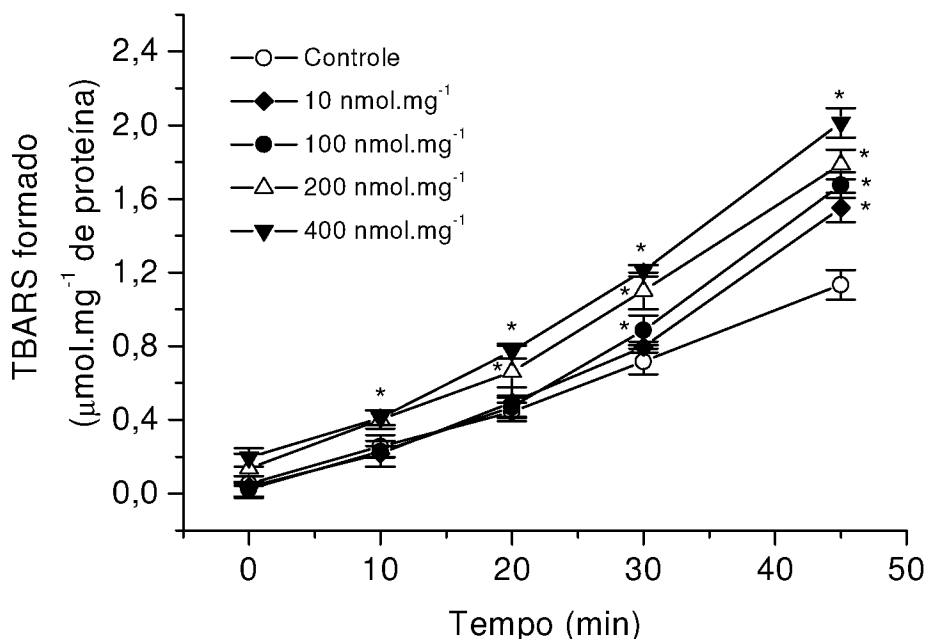


FIGURA 41 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO INDUZIDA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubadas sob agitação a 37°C , em mistura de reação constituída de: D-manitol $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, ADP $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na ausência e presença de deltametrina (10, 100, 200 e $400 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína). A incubação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Aliquotas de 0,5 mL da mistura foram retiradas nos tempos zero (anterior à adição de substrato) e em 10, 20, 30 e 45 minutos de incubação na presença de substrato e adicionadas em 2 mL de reagente TBARS (TCA 15%, TBA 0,375% em HCl 0,25 N e BHT 0,01%). Os resultados experimentais estão expressos em μmol de TBARS formado por miligrama de proteína. Os pontos experimentais são as médias de 4 experimentos distintos. As barras de erros representam os desvios padrão.

*Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

observado um aumento significativo na lipoperoxidação. Quando a concentração utilizada foi de 200 e 400 nmol·mg⁻¹ de proteína o efeito sobre a lipoperoxidação foi significativo a partir de 20 e 10 minutos, respectivamente. No tempo 45 minutos os valores de TBARS aumentaram de 37, 47, 57 e 77% nas concentrações de deltametrina de 10, 100, 200 e 400 nmol·mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Estes resultados incluem a deltametrina como mais um piretróide a apresentar efeito estimulador da lipoperoxidação que foi também descrito para o fenvalerato, outro piretróide do tipo II (MAITI et al., 1995).

Entre os fatores que contribuem para este efeito da deltametrina deve-se destacar o caráter altamente lipofílico da molécula deste piretróide, e a sua interação na região mais hidrofóbica da membrana, como já discutido anteriormente. Cabe também ressaltar que a clivagem de piretróides, contendo o grupo alfa-ciano, e seus ésteres metabólicos, geram cianohidrininas, as quais são muito instáveis sob condições fisiológicas e se decompõem rapidamente em cianeto e aldeído (WHO, 1990; SHAN & HAMMOCK, 2001). Os aldeídos e outros conjugados lipofílicos podem levar ao estresse oxidativo durante a intoxicação por piretróide (KALE et al., 1999). Neste aspecto, vale destacar que os experimentos controle mostraram que o composto não gerou grupos aldeídicos correspondentes no sistema nas mesmas condições experimentais, porém, na ausência de mitocôndrias, descartando-se, desta forma, fatores interferentes de reação não específica nos resultados observados. Outro aspecto refere-se aos níveis de cianeto formado por hidrólise da deltametrina. De acordo com SHAN & HAMMOCK (2001) estes não são suficientes para causar efeito tóxico em humanos. A conversão da cianohidrina a aldeído é pH-dependente e a conversão é promovida por condições básicas. A taxa de conversão de cianohidrina em aldeído aumenta rapidamente em pH 8 ou superior (SHAN & HAMMOCK, 2001), desta forma os experimentos controle, realizados na ausência de mitocôndrias descartaram também a possibilidade da formação de cianeto e aldeído a partir da deltametrina.

A figura 42 mostra o efeito do glifosato nas concentrações de 3,2 e 12,8 µmol·mg⁻¹ de proteína sobre a lipoperoxidação ferro-induzida. O glifosato inibiu significativamente o processo de lipoperoxidação em todos os tempos analisados. A inibição foi de 64 e 84% nas concentrações de 3,2 e 12,8 µmol·mg⁻¹ de proteína no

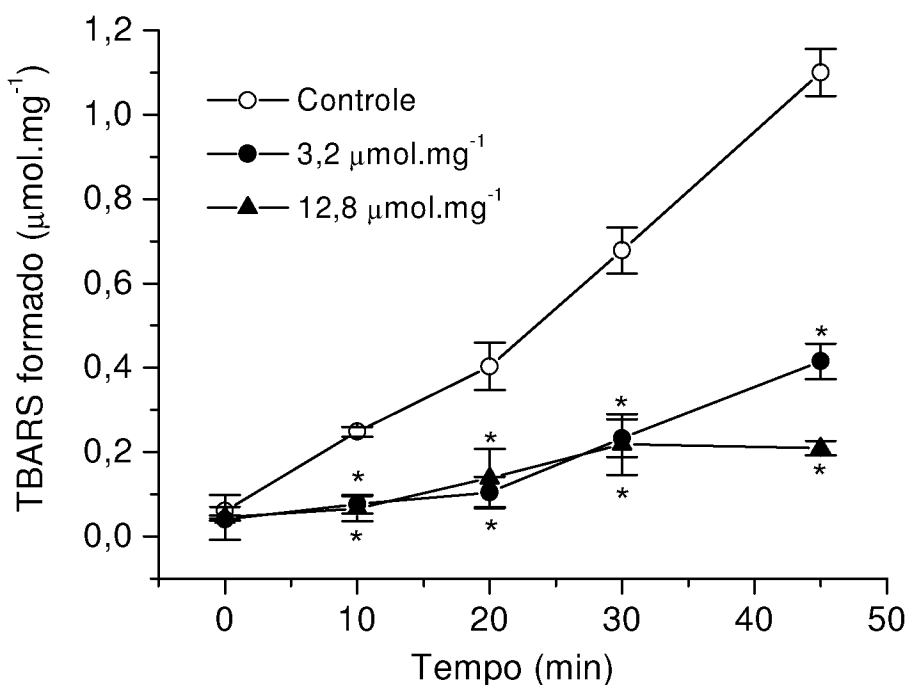


FIGURA 42 - EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO INDUZIDA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubadas sob agitação a 37°C , em mistura de reação constituída de: D-manitol $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2, ADP $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na ausência ou presença de: glifosato ($3,2$ e $12,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína). A incubação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alíquotas de $0,5 \text{ mL}$ da mistura foram retiradas nos tempos zero (anterior à adição de substrato) e em 10, 20, 30 e 45 minutos de incubação na presença de substrato e adicionadas em 2 mL de reagente TBARS (TCA 15%, TBA 0,375% em HCl 0,25 N e BHT 0,01%). Os resultados experimentais estão expressos em μmol de TBARS formado por miligrama de proteína. Os pontos experimentais são as médias de 4 experimentos independentes. As barras de erros representam os desvios padrão.

*Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

tempo de 45 minutos. Considerando a capacidade do glifosato na formação de complexos metálicos, pode-se propor que o efeito seja resultante de uma complexação do herbicida com o metal, o que diminuiria a disponibilidade de ferro no sistema. Outra possibilidade seria a interferência do glifosato na redução do ferro. Tais possibilidades permanecem em aberto como possibilidade de investigação futura onde estudos visando elucidar se o glifosato impede a redução do ferro, por aceitar elétrons ou se o praguicida é quelante de ferro nas condições experimentais utilizadas, deverão ser realizados.

6.15 DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA PELA DELTAMETRINA E GLIFOSATO

Considerando que a deltametrina estimula a lipoperoxidação ferro-dependente, a avaliação da possibilidade deste piretróide promover a liberação de ferro da ferritina tornou-se relevante, considerando o papel desta proteína no armazenamento de uma grande quantidade de ferro no seu interior (WATT et al., 1985). A agregação do metal à ferritina, contribui para proteger a célula contra a toxicidade envolvendo radicais de oxigênio formados pelo ferro e por peróxidos nas reações de Fenton e Haber-Weiss (HARRISON & AROSIO, 1996). Contudo, o Fe^{3+} da ferritina pode ser reduzido por vários radicais como o ânion superóxido e semiquinona, e liberado como Fe^{2+} pode promover dano oxidativo à célula através das reações citadas (MONTEIRO et al., 1988; THOMAS et al., 1985). A mobilização do ferro da ferritina *in vitro* pode ocorrer por quelação direta do Fe^{3+} ou pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FUNK et al., 1985). Alguns estudos sugerem que a presença de um xenobiótico pode promover a liberação de ferro da ferritina, e desta forma, a ferritina funciona como uma fonte de ferro, que quando liberado, pode promover lipoperoxidação *in vivo* (THOMAS et al., 1985).

Os experimentos cujos resultados estão apresentados na figura 43 foram planejados para avaliar o efeito da deltametrina sobre a liberação de ferro da ferritina. Verifica-se que isto ocorreu em um efeito que foi dependente da concentração do piretróide, sendo significativo desde a concentração de $10 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os valores absolutos obtidos para a liberação de ferro da

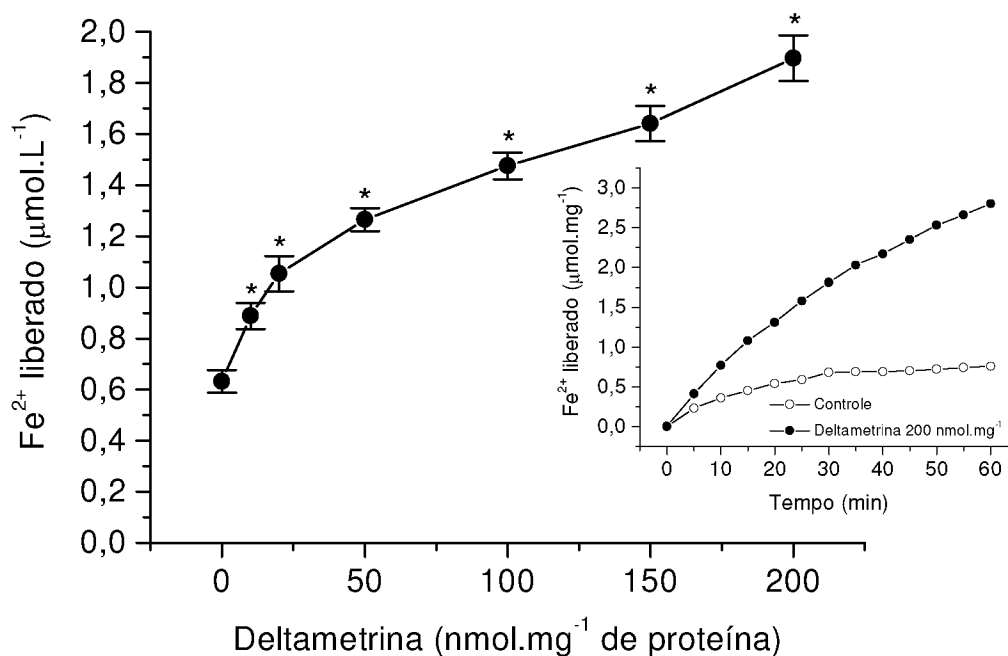


FIGURA 43 - EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA

SISTEMA: A liberação de ferro da ferritina foi observada seguindo-se o aumento na absorbância a 530 nm devido a quelação de Fe^{2+} por sulfonato de batofenantrolina. O sistema de reação era composto de sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.L^{-1} , ferritina de baço de cavalo $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} , pH 7,4. A liberação de Fe^{2+} da ferritina foi acompanhada sem a adição (controle) e após a adição de deltametrina nas doses de 10, 20, 50, 100, 150 e 200 nmol.mg^{-1} . O inserto representa a liberação de ferro da ferritina em função do tempo na dose de 200 nmol.mg^{-1} . Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe^{2+} liberado da ferritina em 20 minutos a 25°C e são a Média \pm DP de três experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

ferritina, estão descritos na tabela 10. Na concentração de $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, a deltametrina promoveu um aumento na liberação de ferro da ferritina de aproximadamente 2 vezes o valor do controle. O inserto na figura 43 mostra que o ferro continua sendo liberado pela deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína em função do tempo. Algumas considerações podem ser feitas a partir destes resultados. A superóxido dismutase desempenha uma importante função na proteção celular contra a toxicidade pelo ânion superóxido, o qual em mamíferos é gerado, normalmente no citosol e na mitocôndria (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Apesar da reatividade do $\text{O}_2^{\bullet-}$ ser relativamente baixa, um aumento de sua formação pode causar danos celulares já que o mesmo pode reduzir Fe^{2+} e levar a formação de $\bullet\text{OH}$, altamente reativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Por outro lado, o aumento na liberação de ferro da ferritina poderia também estar sendo causado pela geração, no sistema, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Portanto, com a finalidade de avaliar o envolvimento do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 na liberação de ferro da ferritina, os experimentos foram realizados na presença de superóxido dismutase e de catalase.

Os resultados estão apresentados na tabela 10, onde se verifica que o deslocamento de ferro da proteína na ausência de deltametrina era de $0,595 \pm 0,039$. A presença do piretróide ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) no meio de reação promoveu o aumento na liberação de ferro da ferritina para $1,932 \pm 0,069$, ou seja, um estímulo de aproximadamente três vezes, confirmando o dado mostrado na figura 43. A adição de SOD (40 e 80 UI), ao sistema contendo a deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) e em presença de ferritina, provocou uma redução na liberação de ferro da ferritina de 32 e 46%, respectivamente, (Tabela 10), demonstrando o envolvimento de ânion superóxido no mecanismo de ação da deltametrina, quanto a liberação de ferro da ferritina.

A tabela 10 mostra que a presença de catalase no sistema também reduziu a liberação de ferro da ferritina provocada pela deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína). Neste caso, a liberação de ferro diminuiu de $1,932 \pm 0,064 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para $0,994 \pm 0,064 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,029 \pm 0,175 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, quando catalase 10 e 25 UI estava presente, respectivamente. Portanto, a redução de aproximadamente 47-49%

TABELA 10 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA NA PRESENÇA DE SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE

Deltametrina nmol.mg ⁻¹ de proteína	Ferro liberado ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
0 (controle)	0,595 \pm 0,039
200	1,932 \pm 0,069*
200 + SOD 40 UI	1,295 \pm 0,052**
200 + SOD 80 UI	1,024 \pm 0,200**
200 + CAT 10 UI	0,994 \pm 0,064**
200 + CAT 25 UI	1,029 \pm 0,175**

SISTEMA: A liberação de ferro da ferritina foi observada seguindo-se o aumento na absorbância a 530 nm devido a quelação de Fe^{2+} por sulfonato de batofenantrolina. O sistema de reação era composto de sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.L⁻¹, ferritina de baço de cavalo 0,3 mg.L⁻¹ em tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 7,4. A liberação de Fe^{2+} da ferritina foi acompanhada sem a adição (controle) e após a adição de deltametrina 200 nmol.mg⁻¹. Superóxido dismutase (SOD) 40 e 80 UI ou Catalase (CAT) 10 e 25 UI foi adicionada ao sistema antes da adição de deltametrina. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe^{2+} liberado da ferritina em 20 minutos a 25°C e são a Média \pm DP de três experimentos independentes.

*valores estatisticamente significativos em relação ao controle na ausência de deltametrina ($p < 0,05$).

**valores estatisticamente significativos em relação ao controle com deltametrina ($p < 0,05$).

(catalase 10-25 UI) sugere um envolvimento do H_2O_2 , o qual poderia estar sendo gerado durante a incubação da deltametrina com a proteína.

Considerando tais resultados, é viável a proposição de que o Fe^{3+} da ferritina possa ser reduzido pelos radicais formados e liberado como Fe^{2+} , provocando dano oxidativo. Cabe aqui ressaltar que radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e metais de transição, tal como o ferro, pode iniciar a reação de lipoperoxidação em sistemas biológicos, onde então, a reação de Haber-Weiss para a iniciação da lipoperoxidação provocada pela deltametrina seria fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O radical hidroxil ($\cdot OH$), formado a partir de $O_2\cdot^-$, metais e H_2O_2 , seria gerado através desta reação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O efeito do glifosato sobre a liberação de ferro da ferritina também foi avaliado. A figura 44 mostra que o glifosato nas concentrações de 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 e $12,8 \mu mol \cdot mg^{-1}$ de proteína não mobiliza ferro da molécula de ferritina. Como já discutido, a molécula de glifosato apresenta três grupos químicos diferentes (amina, carboxila e fosfato). Como em pH neutro os grupos carboxila e fosfato estariam desprotonados, existe a possibilidade de uma forte ligação do herbicida com íons metálicos (SUBRAMANIAM & HOGGARD, 1988; BARJA et al., 2001). Portanto, uma competição entre a batofenantrolina e o glifosato, pelo ferro da ferritina não pode ainda ser excluída, permanecendo como possibilidade de investigação futura.

Sabe-se que na interação de xenobióticos com a bicamada lipídica podem estar envolvidos processos oxidativos como a lipoperoxidação, porém a participação de outros mecanismos associados não pode ser excluída. Dentre estes, destaca-se a transição de permeabilidade mitocondrial, um fenômeno para o qual não há dados na literatura sobre o envolvimento da deltametrina. Com a finalidade de avaliar tal possibilidade, os efeitos da deltametrina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial foram analisados e são descritos a seguir. Os experimentos com o glifosato não foram realizados devido a sua atividade quelante de cátions (BARJA et al., 2001).

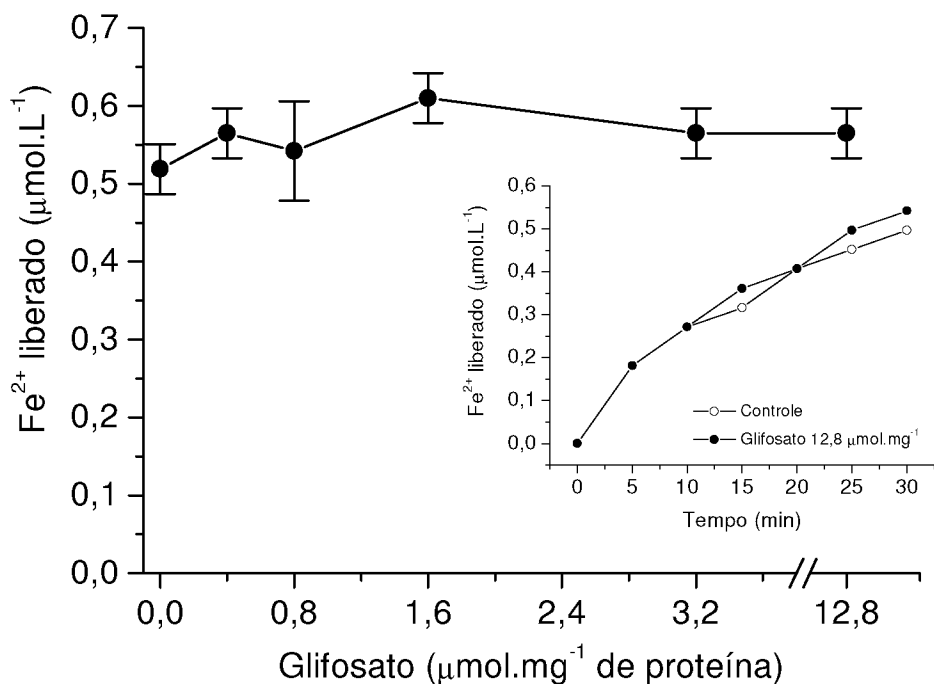


FIGURA 44 - EFEITO DA GLIFOSATO SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA

SISTEMA: A liberação de ferro da ferritina foi observada seguindo-se o aumento na absorbância a 530 nm devido a quelação de Fe^{2+} por sulfonato de batofenantrolina. O sistema de reação era composto de sulfonato de batofenantrolina $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ferritina de baço de cavalo $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4. A liberação de Fe^{2+} da ferritina foi acompanhada sem a adição (controle) e após a adição de glifosato nas doses de 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 e $12,8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$. O inserto representa a liberação de ferro da ferritina em função do tempo na dose de $12,8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe^{2+} liberado da ferritina em 20 minutos a 25°C e são a média \pm dp de três experimentos independentes.

6.16 EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Sob condições fisiológicas normais, a membrana mitocondrial é permeável a alguns metabólitos e íons. Entretanto sob condição de estresse, um poro não específico conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) pode ser aberto na membrana mitocondrial interna permitindo a livre passagem de moléculas menores do que 1,5 kDa (CROMPTON, 1999; HALESTRAP et al., 2002). Quando ocorre a abertura do poro, a barreira de permeabilidade imposta pela membrana mitocondrial interna torna-se frágil e embora todos os solutos de pequeno peso molecular movam-se livremente através da membrana, as proteínas não conseguem atravessá-la e, como resultado, elas exercem uma pressão osmótica que causa o inchamento mitocondrial (HALESTRAP et al., 2004). A abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) é atualmente reconhecida como fenômeno importante durante a morte celular necrótica e apoptótica (HALESTRAP & BRENNER, 2003).

Os principais elementos constituintes do MPTP são: a translocase de nucleotídeos de adenina (ANT) na membrana mitocondrial interna, a ciclofilina D, na matriz, e o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), (também conhecido como porina) na membrana externa (HALESTRAP & BRENNER, 2003). Acredita-se que estas estruturas que compõem o poro, estejam reunidas nas junções intermembranares formando o MPTP, cuja abertura ocorre em função da elevação da concentração de Ca^{2+} da matriz e é sensibilizado por outros eventos tais como a depleção de nucleotídeos de adenina e pelo estresse oxidativo que freqüentemente termina em morte celular (HALESTRAP & BRENNER, 2003). A abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) é sensível a concentrações submicromoleculares do agente imunossupressor ciclosporina A (HALESTRAP et al., 1997; KOWALTOWSKI et al., 2001; GUNTER et al., 2004). A transição pode estar associada com a oxidação de grupos tiol de proteínas da membrana mitocondrial (BERNARDES et al., 1994; CASTILHO et al., 1995; BERNARDI, 1996; KOWALTOWSKI et al., 2001) por reagentes tiol ou por espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pela cadeia respiratória mitocondrial, principalmente no nível da coenzima Q (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 2001).

Este fenômeno é caracterizado por uma diminuição no $\Delta\psi$, saída de íons da matriz mitocondrial, incluindo Ca^{2+} , e inchamento mitocondrial. A permeabilização da membrana pode ser devido a alterações na organização da bicamada fosfolipídica, como a que ocorre em decorrência da lipoperoxidação (LE QUOC & LE QUOC, 1989; NEPOMUCENO et al., 1991; MACIEL et al., 2001).

Experimentalmente, a indução da transição de permeabilidade mitocondrial é caracterizada por um amplo inchamento mitocondrial, causado pelo influxo do suporte osmótico associado com o aumento não específico na permeabilidade da membrana, e ainda queda do $\Delta\psi$, acompanhado pelo efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, GSH, e NAD(P)H (SAVAGE et al., 1991; BERNARDI, 1992; PETRONILLI et al., 1994), levando a liberação de citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas, as quais ativam a cascata das caspases e iniciam o processo apoptótico (KROEMER & REED, 2000; CARDOSO et al., 2004), sendo todos estes eventos inibidos pela ciclosporina A (BROEKMEIER et al., 1989).

Os resultados até aqui obtidos mostraram que a deltametrina tem como importante alvo a membrana mitocondrial. A deltametrina foi capaz de afetar o comportamento termotrópico de bicamadas lipídicas artificiais e naturais, alterar atividades enzimáticas importantes da cadeia respiratória mitocondrial, e reduzir o potencial elétrico de membrana mitocondrial, além de estimular a lipoperoxidação. Com a finalidade de verificar se algumas destas alterações poderiam estar relacionadas com o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial, experimentos cujos resultados estão descritos na figura 45, foram conduzidos em condições nas quais a cadeia respiratória mitocondrial e o potencial elétrico de membrana eram funcionais.

Os traçados (b), (c), (d) da figura 45 mostram o inchamento de mitocôndrias energizadas com succinato na presença de Ca^{2+} 10, 25 ou 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e de fosfato inorgânico (0,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Uma evidente dependência da concentração de Ca^{2+} utilizado pode ser observada, além do que, na ausência de Ca^{2+} não foi observado o inchamento mitocondrial, como mostrado no traçado (a) da figura 45. O extensivo inchamento promovido por 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca^{2+} foi completamente inibido quando a suspensão mitocondrial foi incubada por dois minutos com deltametrina 200 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, similar ao que ocorre quando ciclosporina A,

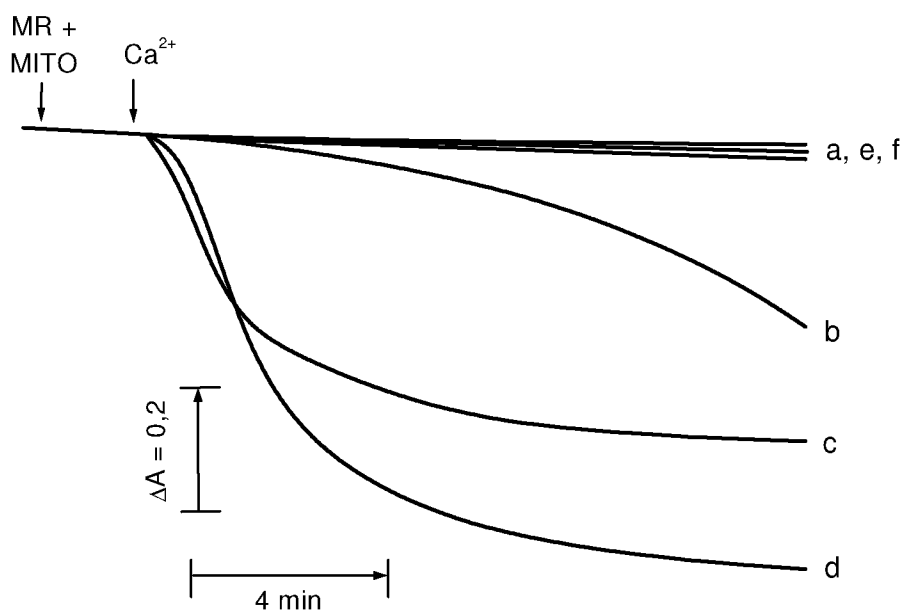


FIGURA 45 - EFEITO DA DELTAMETRINA NA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{2+}

SISTEMA: Mitocôndrias ($0,3 \text{ mg}$) foram adicionadas ao meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Hapes $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em volume final de 1 mL a 28°C . Ca^{2+} foi adicionado nas concentrações indicadas:

- (a) Controle na ausência de Ca^{2+} ;
- (b) Ca^{2+} $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- (c) Ca^{2+} $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- (d) Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- (e) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína + Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- (f) ciclosporina A $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (controle positivo).

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca^{2+} . A figura representa os traçados de 3 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorbância.

um potente inibidor do poro de transição de permeabilidade é adicionado ao sistema (traçado *f*).

Considerando que a deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) inibiu totalmente a transição de permeabilidade quando o inchamento foi induzido por Ca^{2+} ($50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), o efeito de diferentes concentrações de deltametrina foi então avaliado, fixando-se a concentração de Ca^{2+} em $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Na figura 46 observa-se a dependência do efeito frente às concentrações utilizadas de deltametrina. Nas concentrações de deltametrina de 50, 100 e $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, apresentadas nos traçados (*e*), (*d*) e (*c*), respectivamente, são observadas as inibições dose-dependente na amplitude do inchamento mitocondrial causadas pela deltametrina com o efeito máximo ocorrendo em $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Com a finalidade de avaliar o comportamento do piretróide na presença de indutores específicos da abertura do poro de transição, experimentos foram também realizados utilizando-se de conhecidos indutores da transição, tais como a diamida e o mersalil.

A figura 47 mostra o inchamento mitocondrial obtido na presença de cálcio e diamida, e presença de deltametrina. O traçado (*d*) mostra um controle, na ausência das drogas. O traçado (*f*) desta figura mostra, o inchamento obtido quando a diamida ($300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi adicionada ao sistema. Em comparação com a condição na ausência de diamida (traçado *d*), observa-se aumento na velocidade e amplitude do inchamento. A presença de DTT ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), na preparação mitocondrial suplementada com Ca^{2+} e diamida, impediu a ocorrência do fenômeno (traçado *a*), como seria de se esperar frente a ação oxidante de grupos -SH pela diamida, levando a formação de pontes dissulfeto (KOSOWER et al., 1969; FAGIAN et al., 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995). Os traçados (*c*) e (*e*) desta figura mostram que na presença de diamida o efeito protetor da deltametrina (100 e $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) é substancialmente reduzido, contrastando com a proteção de 100% conferida na ausência de diamida (traçado *b*). Portanto, embora no fenômeno de transição de permeabilidade desencadeado pelo Ca^{2+} e diamida, a deltametrina ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) ainda confira certa proteção, pode-se propor que este piretróide não evita a oxidação extensiva de grupos sulfidrílicos.

Outro agente indutor de transição de permeabilidade mitocondrial cujos

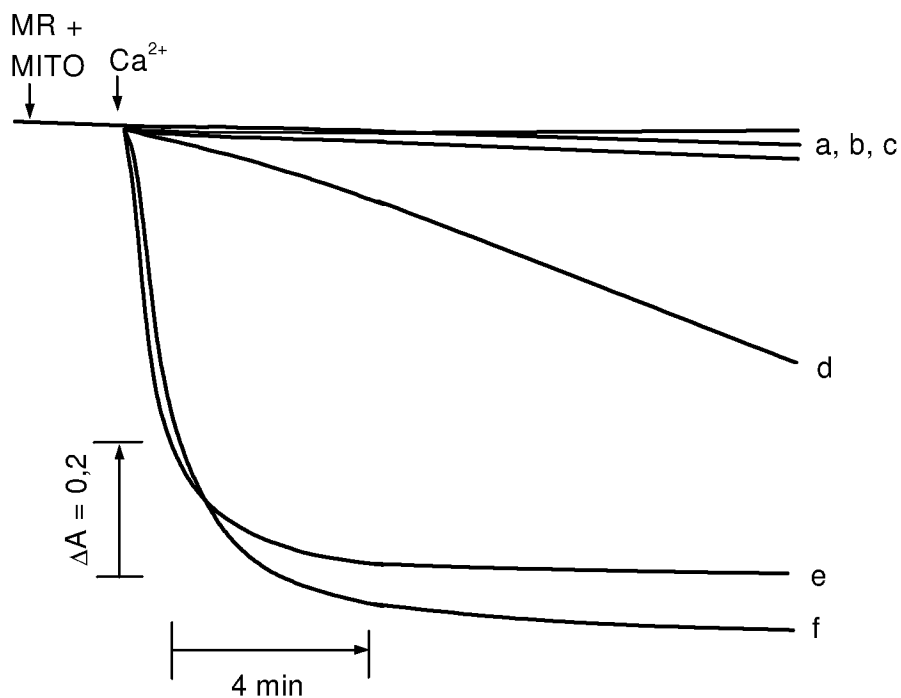


FIGURA 46 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

SISTEMA: Mitocôndrias (0,3 mg) foram adicionadas ao meio contendo sacarose 250 mmol·L⁻¹, Hapes 10 mmol·L⁻¹, pH 7,4, rotenona 6 μmol·L⁻¹, succinato 3 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 0,3 mmol·L⁻¹ em volume final de 1 mL a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de Ca²⁺ 50 μmol·L⁻¹.

- (a) Controle na ausência de Ca²⁺;
- (b) deltametrina 200 nmol·mg⁻¹ de proteína sem Ca²⁺;
- (c) deltametrina 200 nmol·mg⁻¹ de proteína e Ca²⁺;
- (d) deltametrina 100 nmol·mg⁻¹ de proteína e Ca²⁺;
- (e) deltametrina 50 nmol·mg⁻¹ de proteína e Ca²⁺;
- (f) controle na presença de Ca²⁺.

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca²⁺. A figura representa os traçados de 3 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância.

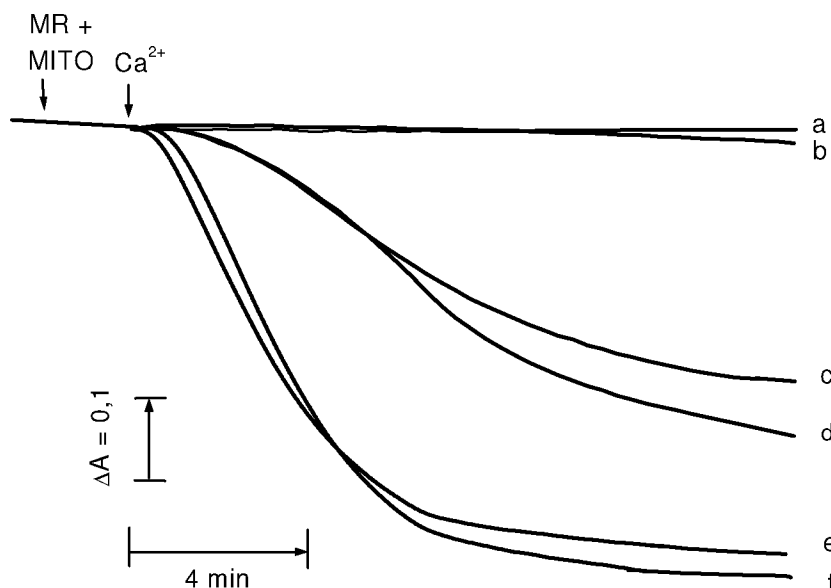


FIGURA 47 - INTERFERÊNCIA DA DIAMIDA NO EFEITO DA DELTAMETRINA, SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E Pi EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($0,3 \text{ mg}$) foram adicionadas ao meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Hapes $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em volume final de 1 mL a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com:

- (a) DTT $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Diamida $300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- (b) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e Ca^{2+} ;
- (c) diamida $300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, e Ca^{2+} ;
- (d) controle na presença de Ca^{2+} ;
- (e) diamida $300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, deltametrina $100 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e Ca^{2+} ;
- (f) diamida $300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} .

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca^{2+} . O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância em 540 nm . O traçado é representativo de 3 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria.

efeitos na oxidação de grupos tióis são reconhecidos é o mersalil (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Com a finalidade de avaliar a interferência do mersalil na proteção do inchamento mitocondrial exercida pela deltametrina, o mersalil foi também utilizado nas mesmas condições experimentais anteriores. Vale destacar que a diamida pelas suas características lipossolúveis, tem a sua ação mais no centro da bicamada lipídica, alterando estruturas protéicas nela inserida, pela oxidação dos grupos -SH (CASTILHO et al., 1995), enquanto que o mersalil, pelo seu caráter hidrofílico, tem sua ação mais periférica à membrana (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

O traçado (e) da figura 48 mostra o inchamento mitocondrial nas condições controle e na ausência dos compostos. O traçado (f) desta figura mostra o comportamento das mitocôndrias quando a suspensão é incubada com mersalil $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os traçados (d) e (c) foram obtidos na presença de deltametrina 100 e $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente e em concomitância com o mersalil. Verifica-se portanto que embora o mersalil também interfira no efeito protetor da deltametrina, essa interferência é de menor magnitude que aquela exercida pela diamida, na presente condição experimental.

Estes resultados sugerem que o efeito protetor da deltametrina na transição de permeabilidade mitocondrial, é reduzido pelos agentes oxidantes de grupos -SH.

Considerando que a deltametrina apresentou efeito que estimula a lipoperoxidação e que nas mitocôndrias este efeito é associado com diminuição irreversível no potencial de membrana, liberação de Ca^{2+} , e inchamento (WISWEDEL et al., 1988; BACON et al., 1986; BACON et al., 1993; MASINI et al., 1989; CECCARELLI et al., 1995), eventos que são característicos da transição de permeabilidade mitocondrial, experimentos de transição de permeabilidade na presença de ferro, foram realizados.

A figura 49 mostra os controles na presença de Ca^{2+} (traçado e) e na ausência de Ca^{2+} (traçado a). A pré-incubação da suspensão mitocondrial com FeCl_3 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (traçado f), promoveu a antecipação do inchamento bem como o aumento na sua amplitude em relação ao controle com Ca^{2+} $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (traçado e). O traçado (b) mostra a inibição de 100% do inchamento causado pela deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína em comparação com o traçado (e) (Ca^{2+}).

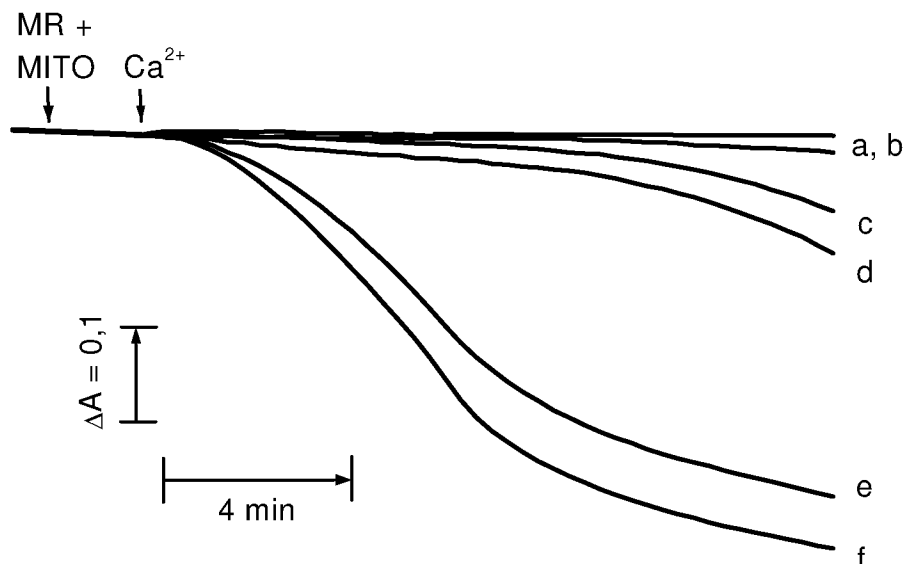


FIGURA 48 - INTERFERÊNCIA DO MERSALIL NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E P_i EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($0,3 \text{ mg}$) foram adicionadas ao meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em volume final de 1 mL a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com:

- (a) Controle na ausência de Ca^{2+} ;
- (b) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e Ca^{2+} ;
- (c) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, Mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} ;
- (d) deltametrina $100 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, Mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} ;
- (e) controle na presença de Ca^{2+} ;
- (f) Mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} .

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca^{2+} . O traçado é representativo de 3 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância em 540 nm .

Quando deltametrina 100 e 200 nmol·mg⁻¹ de proteína (figura 49, *d* e *c*) foi incubada com a suspensão mitocondrial, contendo Ca²⁺ e ferro, um efeito protetor foi observado, porém muito inferior àquele na ausência de ferro. Estes resultados são de difícil interpretação. Embora a possibilidade de certa atividade complexante de ferro não possa ser descartada, visto que experimentos específicos não foram realizados, pode-se propor que a redução do Fe³⁺ a Fe²⁺ resulte em estímulo de processos de lipoperoxidação, o qual como discutido anteriormente, é por sua vez estimulado pela deltametrina. Neste caso, o mecanismo de proteção estaria sobreposto sobre a lipoperoxidação que é um fenômeno caracteristicamente associado com o inchamento seguido de posterior lise de suspensões mitocondriais. Vale destacar que nos experimentos de lipoperoxidação a concentração de FeCl₃ foi o dobro da utilizada nos experimentos de transição. Além disso, o tempo aplicado nos experimentos de lipoperoxidação foi de até 45 minutos.

Com a finalidade de investigar melhor o efeito de proteção exercido pela deltametrina foram realizados experimentos na presença e ausência de catalase (Figura 50). Na figura 50, o traçado (*e*) representa um controle do inchamento na presença de Ca²⁺. Como mostra a figura, este inchamento foi totalmente inibido pela deltametrina (traçado *a*). A presença do FeCl₃ (traçado *g*) promove a antecipação e aumento da amplitude do fenômeno em comparação àquele induzido apenas pelo Ca²⁺ (traçado *e*), o que poderia ser esperado uma vez que o ferro estimula a lipoperoxidação, fenômeno associado a com a diminuição irreversível do $\Delta\psi$ e inchamento mitocondrial (GOSDVADZE et al., 2003). O efeito nesta condição foi parcialmente reduzido pela deltametrina (traçado *d*). Os traçados (*f*) e (*c*) foram obtidos quando a catalase foi utilizado na concentração de 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. No traçado (*f*) verificou-se uma pequena diminuição na amplitude do inchamento promovido pelo FeCl₃. Entretanto, o traçado (*c*) mostra um efeito protetor da catalase mais acentuado, próximo de 100%, quando a enzima foi utilizada na concentração de 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Quando deltametrina (200 nmol·mg⁻¹ de proteína), catalase (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), e FeCl₃ (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) estavam presentes no sistema, observou-se que o inchamento foi quase totalmente inibido (traçado *b*). A recuperação do efeito protetor da deltametrina em presença da catalase reforça a proposição do envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) no mecanismo

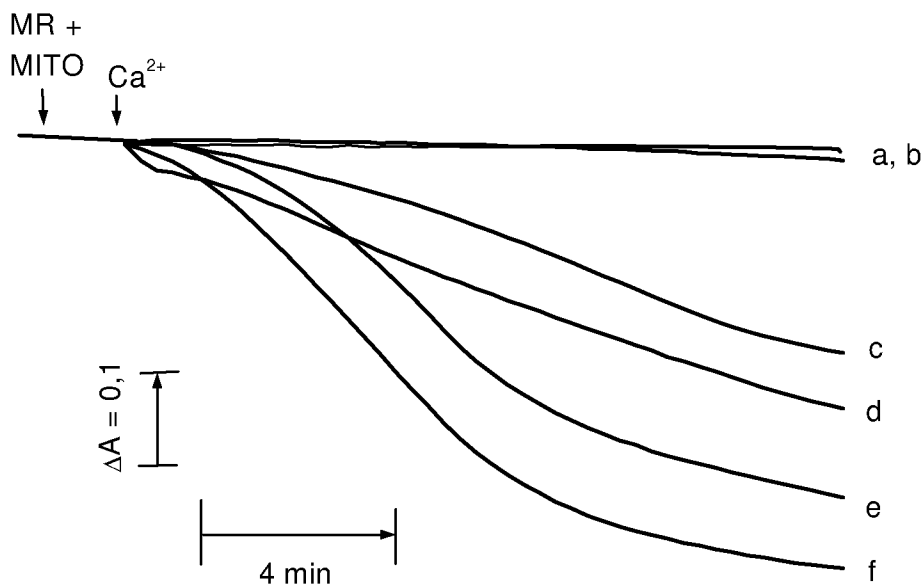


FIGURA 49 - INTERFERÊNCIA DO FeCl_3 NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E P_i EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($0,3 \text{ mg}$) foram adicionadas ao meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em volume final de 1 mL a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com:

- (a) Controle na ausência de Ca^{2+} ;
- (b) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e Ca^{2+} ;
- (c) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} ;
- (d) deltametrina $100 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} ;
- (e) controle na presença de Ca^{2+} ;
- (f) FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Ca^{2+} .

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca^{2+} . O traçado é representativo de 3 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância em 540 nm .

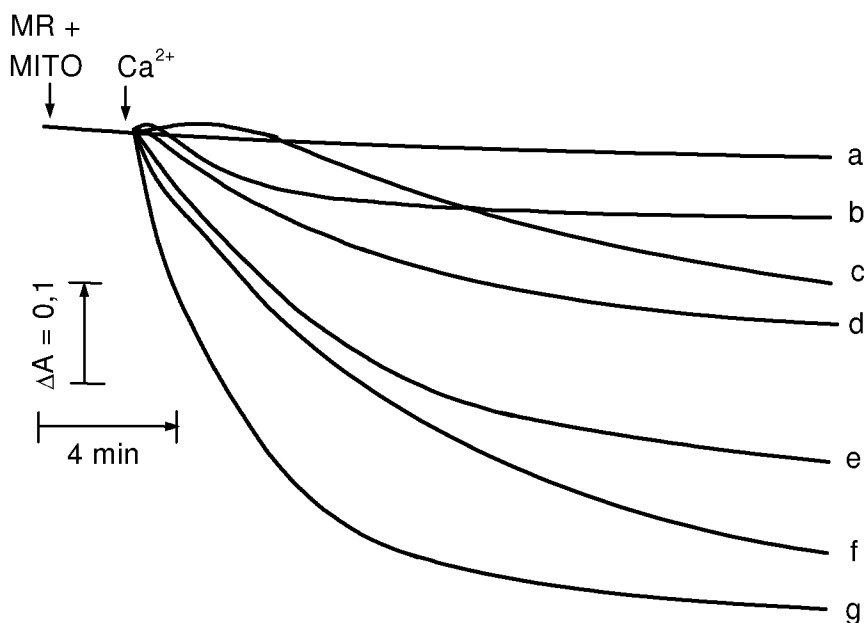


FIGURA 50 - INTERFERÊNCIA DA CATALASE E FERRO NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} E P_i EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO

SISTEMA: Mitocôndrias ($0,3 \text{ mg}$) foram adicionadas ao meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Hapes $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, rotenona $6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, succinato $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em volume final de 1 mL a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com:

- (a) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e Ca^{2+} ;
- (b) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, Catalase $8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} ;
- (c) catalase $8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} ;
- (d) deltametrina $200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} ;
- (e) controle na presença de Ca^{2+} ;
- (f) catalase $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} ;
- (g) FeCl_3 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e Ca^{2+} ;

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca^{2+} . A figura representa os traçados de 2 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância em 540 nm .

dos efeitos da deltametrina.

Os experimentos de transição de permeabilidade descritos foram realizados com preparações mitocondriais utilizando succinato. Considerando que a deltametrina apresenta um efeito na oxidação deste substrato, inibindo a succinato desidrogenase, foram realizados também experimentos utilizando mitocôndrias desenergizadas, condição alcançada quando mitocôndrias são incubadas num sistema contendo FCCP, antimicina A e rotenona, na ausência de substrato para a cadeia respiratória.

A figura 51 representa o resultado de experimentos onde o inchamento de preparações desenergizadas foi também avaliado na presença de H_2O_2 adicionada exogenamente. O traçado (f) desta figura representa o inchamento da condição controle, apenas na presença de Ca^{2+} , enquanto o traçado (a) mostra o efeito protetor da deltametrina. A presença de H_2O_2 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) no sistema, leva a um rápido inchamento mitocondrial (traçado g), que é associado à lipoperoxidação da membrana. Isto ocorre porque H_2O_2 é convertido em radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) via reação de Fenton, o qual estimula a transição de permeabilidade mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2001). O efeito é protegido pela catalase (4 e $8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) como seria esperado (traçados e e b). A extensão do inchamento com H_2O_2 foi parcialmente inibida pela deltametrina (traçado d), sendo que o piretróide exerce discreto efeito adicional sobre aquele da catalase ($4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (traçado c).

Embora a deltametrina estimule a lipoperoxidação, ela se comporta como agente de proteção da transição de permeabilidade e não como um indutor. Destaca-se ainda que a proteção exercida sobre a MPT parece não resultar de um efeito direto sobre a cadeia transportadora de elétrons pois o efeito se observa também em preparações desenergizadas (Figura 51). Vários compostos de reconhecida toxicidade comportam-se como agentes protetores do fenômeno de MPT (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Destaca-se que embora interações específicas como aquela envolvendo a ciclosporina A não possam ser discutidas, deve-se mencionar o efeito enrijecedor da membrana demonstrado para a deltametrina nos experimentos de polarização de fluorescência, o qual provavelmente está também envolvido pois contribui para o decréscimo de elasticidade da membrana o que resultaria em menor amplitude do inchamento mitocondrial.

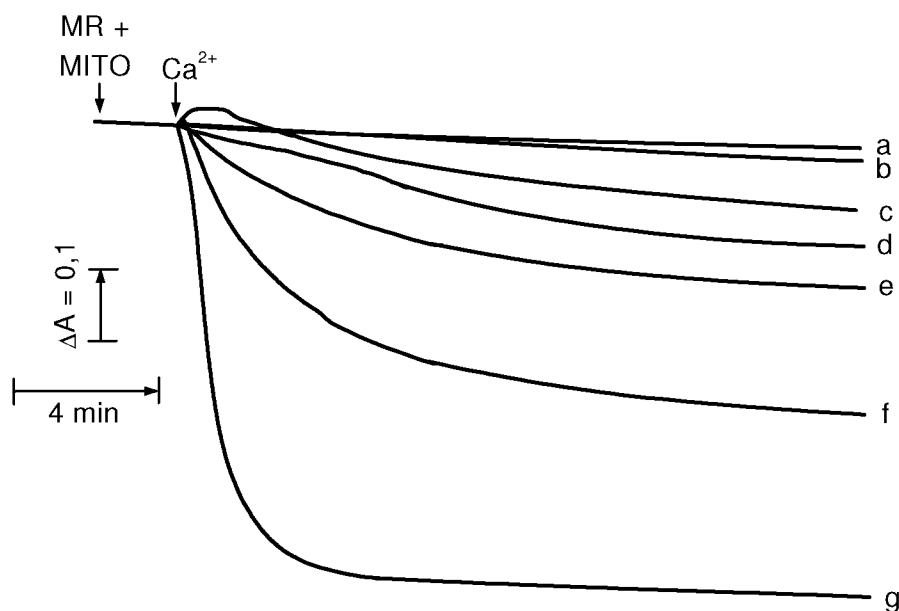


FIGURA 51 - INTERFERÊNCIA DO H₂O₂ E CATALASE NO EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca²⁺ E Pi EM MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS

SISTEMA: Mitocôndrias (0,3 mg) foram adicionadas ao meio contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹, Hepses 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4, rotenona 6 μmol.L⁻¹, FCCP 1 μmol.L⁻¹, antimicina A 150 μg.mg⁻¹ de proteína; KH₂PO₄ 0,3 mmol.L⁻¹ em volume final de 1 mL a 28 °C. O inchamento foi iniciado pela adição de Ca²⁺ 500 μmol.L⁻¹, suplementado com:

- (a) deltametrina 200 nmol.mg⁻¹ de proteína e Ca²⁺;
- (b) Catalase 8 μmol.L⁻¹ e Ca²⁺;
- (c) Deltametrina 200 nmol.mg⁻¹ de proteína, H₂O₂ 10 mmol.L⁻¹, Catalase 4 μmol.L⁻¹ e Ca²⁺;
- (d) Deltametrina 200 nmol.mg⁻¹ de proteína, H₂O₂ 10 mmol.L⁻¹ e Ca²⁺;
- (e) Catalase 4 μmol.L⁻¹ + Ca²⁺;
- (f) Controle na presença de Ca²⁺;
- (g) H₂O₂ 10 mmol.L⁻¹ + Ca²⁺.

A deltametrina foi adicionada 2 minutos antes da adição do Ca²⁺. A figura representa os traçados de 2 experimentos independentes. MR = meio de reação; MITO = mitocôndria. O inchamento é indicado pela diminuição na absorvância em 540 nm.

6.17 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DELTAMETRINA *in vivo*

6.17.1 Efeito do tratamento prolongado com deltametrina sobre o comportamento de ratos

Alguns autores têm sugerido que a exposição prolongada a piretróides altera a atividade motora espontânea de ratos (VERSCHOYLE & BARNES, 1972; HUSAIN et al., 1996). Sintomas como salivação, movimentos abruptos das patas e convulsão progressiva (coreoatetose) foram observados por estes autores após administração oral ou intravenosa.

A série de experimentos, cujos resultados são descritos a seguir foi realizada em conjunto com o Departamento de Farmacologia desta Universidade e tiveram como finalidade verificar se a deltametrina, nas doses testadas, poderia causar alteração comportamental em ratos machos após um tratamento prolongado por 63 dias com este praguicida. As doses diárias de deltametrina utilizadas foram 1, 2 e 4 mg·kg⁻¹, ou seja, duas doses abaixo e uma acima da dose NOEL (No Observed Effect Level) para toxicidade materna de 3,3 mg·kg⁻¹ (U.S. EPA, 2000), e os parâmetros analisados foram ganho de peso corporal, preferência pela solução de sacarose, comportamento no labirinto em cruz elevado, no campo aberto, e teste de natação forçada.

6.17.2 Efeito da deltametrina no Ganho de Peso Corporal

Durante o período de administração de deltametrina aos animais, uma vez por semana eles eram pesados, com a finalidade de avaliar o ganho de peso corporal destes animais em relação aos animais do grupo controle.

O efeito do tratamento prolongado com deltametrina sobre o peso corporal de animais adultos é apresentado na figura 52. A análise de variância de duas vias, considerando o peso em cada intervalo de tratamento como medida repetida (9 medidas) e tratamento como medida independente, revela que a administração diária de deltametrina 1, 2 e 4 mg·kg⁻¹ não provocou alterações no ganho de peso corporal dos animais dos grupos teste em relação aos animais do grupo controle. Não houve efeito significativo do tratamento [$F(3,28) = 0,13$; $p = 0,9425$] como

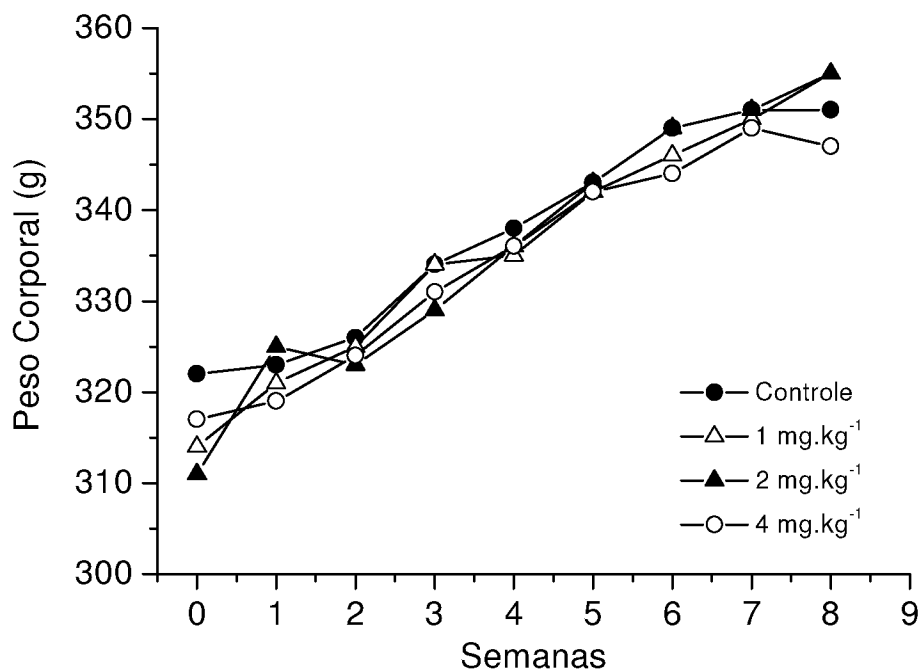


FIGURA 52 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA (1, 2, 4 mg.kg⁻¹) SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DE RATOS ADULTOS.

NOTA: Os animais distribuídos em caixas individuais foram submetidos à administração de deltametrina (1, 2 e 4 mg.kg⁻¹ por 63 dias) como descrito no item 5.6.12.2 da seção Materiais e Métodos, e foram individualmente pesados ao final de cada semana de tratamento. Os pontos experimentais representam a média de cada grupo (n por grupo = 9).

também não houve efeito significativo entre tratamento \times medida [$F(24,224) = 0,38$; $p = 0,9969$]. Embora todos os grupos apresentassem um aumento significativo do peso corporal com o passar dos dias (efeito da medida), nos animais tratados com deltametrina o ganho de peso corporal seguiu a mesma proporção daquela do grupo controle.

Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por LAZARINI et al. (2001). Estes autores administraram a ratas grávidas $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de deltametrina, sem que houvesse alteração no ganho de peso corporal materno e dos filhotes.

6.17.3 Avaliação da Preferência pela Sacarose

A preferência por soluções doces é normalmente exibida por ratos quando são colocadas em suas gaiolas uma garrafa contendo solução doce ao lado de uma garrafa contendo água. Esta preferência é significativamente diminuída após a exposição aguda a um estresse de intensidade suficiente ou após a exposição crônica a estresses de grau moderado a intenso (KATZ, 1982; WILLNER, 1991; WILLNER et al., 1997).

Considerando que a experiência do estresse, seja pela manipulação e administração diária de deltametrina ou pelo condicionamento dos animais, ou pelo próprio efeito da deltametrina, poderia afetar a capacidade do animal em experimentar algo que lhe dê prazer, e que isto poderia ser um fator precipitante da anedonia (ZURITA et al., 1999), o objetivo desta avaliação foi verificar se a deltametrina poderia interferir no teste de preferência de sacarose, levando em consideração que as doses diárias utilizadas foram $1, 2$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

A tabela 11 mostra o resultado de tal avaliação onde a análise de variância de duas vias considerando a percentagem de ingestão de solução de sacarose 1% em relação a ingestão total em cada intervalo de tratamento, ao tratamento, e ao nº de semanas, cada um como uma variável dependente, demonstra que não houve efeito significativo do tratamento [$F(3,27) = 0,13$; $p = 0,9384$], nem entre as medidas [$F(8,216) = 2,76$; $p = 0,063$]. Não houve também interação significativa entre tratamento e medida [$F(24,216) = 1,53$; $p = 0,0592$] (Tabela 11). Vale destacar que

TABELA 11 - EFEITOS DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA SOBRE O TESTE DE PREFERÊNCIA PELA SACAROSE

Grupos	Semanas								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	73,1 ± 12,7	79,7 ± 7,7	71,9 ± 8,8	69,7 ± 14,0	77,5 ± 14,4	78,6 ± 13,0	76,9 ± 12,9	79,2 ± 12,1	70,5 ± 8,7
1 mg.kg ⁻¹	74,8 ± 12,1	77,2 ± 12,7	72,5 ± 8,5	63,5 ± 7,0	78,2 ± 9,1	70,3 ± 16,8	82,1 ± 13,8	70,2 ± 6,9	82,2 ± 3,5
2 mg.kg ⁻¹	77,8 ± 10,6	85,3 ± 16,7	72,1 ± 13,3	75,4 ± 11,2	84,9 ± 7,0	86,8 ± 16,0	79,9 ± 6,4	77,9 ± 13,0	73,6 ± 17,2
4 mg.kg ⁻¹	76,5 ± 13,4	73,5 ± 11,4	67,8 ± 10,0	67,3 ± 7,8	84,9 ± 9,3	70,3 ± 6,0	80,9 ± 7,8	83,4 ± 12,5	67,4 ± 5,8

NOTA: O teste de Preferência pela Sacarose foi realizado como descrito no item 5.6.12.3 de Materiais e Métodos. Os animais foram distribuídos randomicamente em caixas individuais e realizado um primeiro teste de preferência pela sacarose, e após 7 dias foi iniciado o tratamento com deltametrina. O teste preferência pela sacarose foi realizado 1 vez por semana no mesmo horário durante todo o tratamento (63 dias), com todos os animais de cada grupo (n total = 36).

na média todos os animais (grupo controle e tratados) mostraram valores que variaram de 67,3 a 86,8% de preferência pela solução doce em relação a água pura, portanto não entraram em anedonia.

6.17.4 Avaliação do comportamento de ratos no Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado, no qual os animais são colocados no centro de um labirinto suspenso, com dois braços abertos e dois braços fechados, é modelo de reconhecida aplicação para uso com ratos (PELLOW et al., 1985) e com camundongos (RODGERS & COLE, 1993). A passagem do animal nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, seja forçada ou voluntária, é associada a elevação da concentração de corticosterona plasmática, aumento do tempo parado, produção de bolo fecal (PELLOW et al., 1985) e também como alterações hormonais e comportamentais que são indicativos de ansiedade aumentada (HOGG, 1996). Em contraste, a administração de compostos ansiolíticos reduz a aversão natural aos braços abertos e promovem a sua exploração (HOGG, 1996).

Neste modelo animal de depressão os resultados indicam que não houve mudanças no comportamento dos animais tratados diariamente com deltametrina 1, 2 e 4 mg·kg⁻¹ em relação ao grupo controle (Tabela 12). As análises de variância de uma via revelam que em nenhuma das medidas houve diferença significativa entre os grupos (nº de entradas no braço aberto – $p = 0,6991$; Tempo no braço aberto – $p = 0,2107$; Nº de entradas no braço fechado – $p = 0,5508$; Tempo no braço fechado – $p = 0,4174$; % de tempo no braço aberto – $p = 0,2106$; % de entradas no braço aberto – $p = 0,3779$).

6.17.5 Teste de Natação Forçada

Este teste é baseado na observação de que ratos, inicialmente se movimentam na tentativa de escapar do cilindro com água, e na seqüência desenvolvem uma postura de imobilidade. Se eles são recolocados no cilindro 24 h depois, eles assumem rapidamente esta postura de imobilidade. A imobilidade reflete dois tipos de comportamento: a desistência para escapar, ou o desenvolvimento de um comportamento passivo do animal como conseqüência de

TABELA 12 - EFEITOS DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS DO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Parâmetros	Grupos				
	n	Controle	Deltametrina		
			1 mg·kg ⁻¹	2 mg·kg ⁻¹	4 mg·kg ⁻¹
Nº de entradas no braço fechado	9	4,2 ± 1,1	4,2 ± 0,8	5,3 ± 0,9	6,2 ± 1,5
% de entradas nos braços abertos	9	18,9 ± 7,3	35,5 ± 7,0	11,4 ± 5,2	23,1 ± 7,2
% de tempo gasto nos braços abertos	9	28,3 ± 3,4	23,7 ± 8,2	23,3 ± 7,5	31,9 ± 8,1

NOTA: Os parâmetros do teste do Labirinto em Cruz Elevado foram avaliados como descrito no item 5.6.12.6 da seção Materiais e Métodos. Os animais tratados e controles foram avaliados durante a última semana de tratamento com deltametrina (1, 2 e 4 mg·kg⁻¹) e depois do teste de Campo Aberto. Os valores são a média ± EPM. n refere-se ao número de animais por grupo; n total = 36.

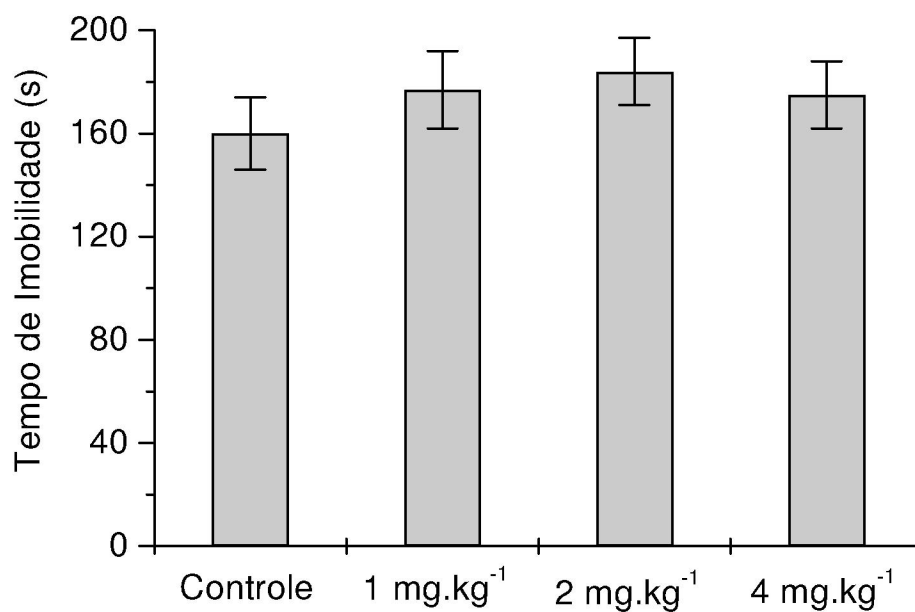


FIGURA 53 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA 1, 2 E 4 mg.kg⁻¹ SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

NOTA: O teste de natação forçada foi realizado como descrito no item 5.6.12.4 da seção Materiais e Métodos. O teste foi realizado na última semana do tratamento, após o teste do Campo Aberto. Os animais (n = 36; 9 por grupo) foram tratados com deltametrina por 63 dias. Os dados estão apresentados como a Média ± DP.

uma resposta adaptativa à situação de estresse (CRYAN et al., 2002).

Os dados da figura 53 mostram que no teste de natação forçada não houve diferença significativa no tempo de imobilidade dos animais tratados com deltametrina em relação aos animais controle [$F(3,33) = 0,50$; $p = 0,6837$]. Estes resultados contrastam com o descrito por LAZARINI et al. (2001), que relataram uma diminuição no tempo parado no teste de natação forçada, principalmente nos filhotes machos de mães que foram tratadas durante a gravidez (6º ao 15º dia) com $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de deltametrina.

6.17.6 Avaliação do comportamento no Campo Aberto

A figura 54 mostra resultados relacionados a atividade geral dos animais, obtidos após o tratamento diário com deltametrina 1, 2 e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, durante 63 dias. A análise de variância revelou ausência de efeito significativo da deltametrina sobre os parâmetros analisados: locomoção [$F_{(3,33)} = 0.8422$; $p = 0.4806$] (Figura 54a), levantar [$F_{(3,33)} = 2.047$; $p = 0.1263$] (Figura 54b) e duração do tempo parado [$F_{(3,33)} = 0.8047$; $p = 0.5003$] (Figura 54c). Em referência ao levantar nas patas traseiras os resultados do presente estudo contrastam com aqueles descritos por LAZARINI et al. (2001), que descreveram aumento na frequência de levantar de filhotes machos com 60 dias de idade de mães que foram tratadas diariamente do 6º dia ao 15º dia da gravidez como deltametrina $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Estes resultados demonstram que apesar dos animais serem submetidos a situações de estresse durante o tratamento e manipulação, a administração de deltametrina não prejudicou a atividade locomotora dos animais.

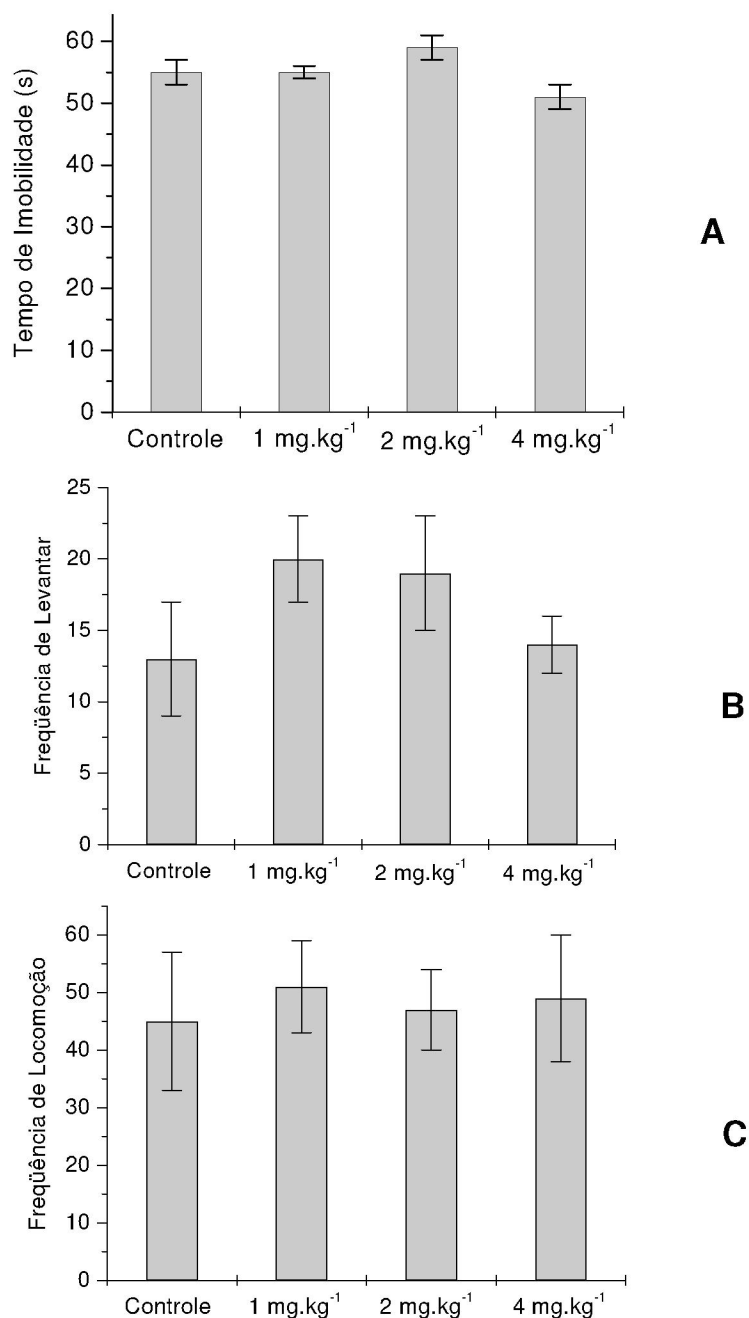


FIGURA 54 - EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM DELTAMETRINA 1, 2 E 4 mg.kg⁻¹ SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE (A), FREQUÊNCIA DE LEVANTAR (B) E FREQUÊNCIA DE LOCOMOÇÃO (C) DOS ANIMAIS NO TESTE DO CAMPO ABERTO

NOTA: O teste de campo aberto foi realizado como descrito no item 5.6.12.5 da seção Materiais e Métodos. O teste foi realizado na última semana do tratamento, após o teste do labirinto em cruz elevado. Os animais (n = 36; 9 por grupo) foram tratados com deltametrina por 63 dias. Os dados estão apresentados como a Média ± DP.

7 DISCUSSÃO FINAL

A susceptibilidade do organismo animal à toxicidade por agentes químicos tais como os praguicidas, ocorre em função do nível de exposição a estes compostos. A resposta da célula ou órgão à agressão pode ser muito complexa, porque pode ocorrer em diferentes tipos de células de um mesmo órgão ou em órgãos diferentes e assim determinar os efeitos no organismo (HODGSON & LEVI, 1994).

Como órgão principal de metabolização de xenobióticos, o tecido hepático pode ser submetido a concentrações mais elevadas dos praguicidas, em comparação com os demais tecidos e órgãos. De fato, alguns estudos têm evidenciado a toxicidade hepática dos praguicidas utilizados neste estudo (SETTLEMIRE et al., 1974; OLORUNSOGO et al., 1979, 1980; GHOSH et al., 1989; REDDY et al., 1992; TALBOT et al., 1991; GASSNER et al., 1997), com efeitos amplos e acentuados sobre o metabolismo celular (MAITI et al., 1995; GUPTA et al., 1999; KALE et al., 1999; GABBIANELLI et al., 2002). Entretanto não existiam na literatura científica dados sobre os efeitos da deltametrina sobre o metabolismo mitocondrial, enquanto para o glifosato apenas alguns relatos contraditórios associam os efeitos do glifosato em mitocôndrias de fígado de rato e de batata. Por estas razões, o presente estudo foi idealizado para investigar os efeitos do inseticida piretróide deltametrina e do herbicida glifosato sobre: o metabolismo energético mitocondrial, propriedades de membranas naturais e artificiais, bem como avaliar os efeitos sobre o comportamento de ratos submetidos ao tratamento subcrônico com deltametrina.

Entre os resultados alcançados na primeira etapa citam-se: 1) inibição parcial do estado 3 e do estado 4 da respiração mitocondrial; 2) inibição parcial de atividades enzimáticas da cadeia respiratória, notadamente a inibição sobre o complexo II e III; 3) ausência de efeito sobre a atividade ATPásica em todas as concentrações testadas; 4) inibição parcial do inchamento mitocondrial energizado; 5) inibição parcial do inchamento mitocondrial desenergizado; 6) decréscimo do potencial elétrico de membrana.

A deltametrina interfere nas funções mitocondriais inibindo parcialmente o transporte de elétrons entre os complexos II e III da cadeia respiratória. Essa restrição parcial no fluxo de elétrons foi a razão da redução do $\Delta\psi$ uma vez que: a)

nenhum efeito desacoplador foi encontrado para a deltametrina nas condições experimentais descritas neste estudo; e b) nenhum efeito sobre a ATPase foi também detectado. De fato, os efeitos da deltametrina estão intimamente relacionados com aqueles observados sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória, os quais foram parcialmente inibidos.

A inibição parcial no transporte de elétrons provocado pela deltametrina particularmente em concentrações mais elevadas ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$) poderia contribuir para um déficit de energia traduzido na diminuição de ATP produzido pela organela, além de afetar outros parâmetros como o inchamento de mitocôndrias energizadas, o que de fato ocorreu, com ambos os substratos (L-glutamato e succinato). Por outro lado, o piretróide interferiu no trânsito da valinomicina através da membrana, fortalecendo a proposição de que também ocorrem efeitos de membrana independentes da oxidação de substratos. Neste aspecto, alguns autores têm proposto que tal efeito sobre membranas contribuiria para a ação tóxica de um inseticida, a exemplo do que ocorre com o lindano e o paraquat (ANTUNES-MADEIRA et al., 1994).

Os experimentos realizados, utilizando como modelo de membranas lipossomas de DMPC e as sondas DPH e DPH-PA, mostraram que a deltametrina diminui a temperatura de transição de fase. Nas concentrações de 40 a $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de deltametrina observou-se uma diminuição na ordem lipídica, em temperaturas abaixo da temperatura média de transição de fase (T_m); acima da T_m e na concentração de deltametrina de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, o aumento nos valores da polarização de fluorescência indicou um aumento da rigidez de membrana, sendo este efeito de menor intensidade quando a sonda utilizada foi DPH-PA. Tais efeitos sobre bicamadas de DMPC diferem daqueles obtidos por MOYA-QUILES et al. (1996), pois estes autores não descreveram alterações na fase fluida da membrana. Entretanto, deve ser considerado que as condições experimentais utilizadas pelos autores foram distintas das empregadas neste trabalho. Nos experimentos aqui descritos, a deltametrina foi incorporada após o preparo dos lipossomas e da incorporação da sonda, enquanto que MOYA-QUILES et al. (1996), incluíram a deltametrina durante a preparação das membranas. Sendo assim, o tempo de exposição à deltametrina foi diferente em ambos os casos. Nos experimentos de polarização de fluorescência mostrados neste trabalho, as membranas foram

expostas por período não superior a duas horas. Com as membranas naturais que são ricas em ácidos graxos insaturados, foi observado que a deltametrina promoveu um aumento de rigidez das membranas como observado pelo aumento nos valores de polarização de fluorescência, sendo este efeito semelhante ao obtido por MOYA-QUILES et al. (1996), em membranas constituídas por fosfatidilcolina de ovo. Vale mencionar que as interações de compostos lipofílicos com diferentes componentes da membrana, também podem afetar o funcionamento da membrana (SIKKEMA, 1995). Estudos dos efeitos da fluidez de membrana sobre propriedades enzimáticas mostraram que pequenas mudanças na fluidez afetam o funcionamento de proteínas nela inseridas (GORDON et al., 1980; YULI et al., 1981; ZHENG et al., 1988), bem como resultam em modificações da função de barreira seletiva à entrada de espécies iônicas. Neste aspecto, os resultados sugeriram uma localização preferencial da deltametrina próximo a região central da bicamada lipídica, o que é compatível considerando o caráter lipofílico da molécula. Baseado nestes dados, seria possível especular que no caso de uma exposição aguda, onde os níveis de deltametrina fossem superiores aos aqui descritos, alterações mais drásticas na estrutura da bicamada lipídica poderiam ocorrer.

É interessante que um dos mecanismos de toxicidade aguda associado a deltametrina tem sido atribuído primariamente a um prolongamento da corrente de Na^+ durante a excitação da membrana, provocando uma despolarização localizada pós-potencial, seguindo-se o potencial de ação e assim uma tendência pronunciada a esta atividade repetitiva nas fibras nervosas e órgãos sensores (FORSHAW & BRADBURY, 1983). Tais efeitos poderiam estar relacionados a alterações da estrutura membranar, cuja fluidez é alterada pela presença do piretróide, como sugerido no presente estudo.

É também relevante a observação de que a deltametrina promove um estímulo da lipoperoxidação, em um sistema constituído por mitocôndrias funcionais oxidando α -cetoglutarato e na presença de ADP e FeCl_3 , onde o complexo $\text{ADP-Fe}^{3+}\text{-O}_2^{\bullet}$ parece ser o iniciador das reações de lipoperoxidação (SASSA et al., 1994). Em referência a este aspecto, o fenvalerato, um outro piretróide, foi também descrito por seus efeitos relacionados ao estresse oxidativo (MAITI et al., 1995). Além deste, um outro piretróide, a cipermetrina, é também conhecida por induzir a lipoperoxidação introduzindo significativos aumentos no estresse oxidativo no tecido

cerebral e hepático (GIRAY et al., 2001) e em eritrócitos de ratos tratados (GABBIANELLI et al., 2002), onde ocorre uma significativa correlação entre o estresse oxidativo e a atividade aumentada das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a concentração de glutathiona reduzida (GSH) (KALE et al., 1999).

Em relação a deltametrina, foi também demonstrada a liberação de ferro da ferritina, o que reforça o envolvimento de mecanismos associados ao estresse oxidativo. Isto porque a mobilização do ferro da ferritina *in vitro* poderia ocorrer por queação direta do Fe^{3+} ou pela redução via $\text{O}_2^{\bullet-}$ do Fe^{3+} a Fe^{2+} , que liberado da ferritina pode levar ao estresse oxidativo (OTEIZA et al., 1995; ROCHA et al., 2000). Neste aspecto é relevante que a liberação de ferro da ferritina, pela deltametrina, foi reduzida parcialmente quando a superóxido dismutase e a catalase estavam presentes no sistema; este decréscimo foi de 30-50% restando portanto uma quantidade de ferro liberado que não teria sido mobilizado por efeito de espécies reativas de oxigênio. Estudos complementares seriam necessários para se esclarecer qual propriedade da deltametrina seria responsável por este efeito, avaliando a hipótese de envolvimento de outra espécie radicalar no processo, pois não existe nenhum relato na literatura quanto à possibilidade da deltametrina vir a formar radicais. Contudo, para outro piretróide tipo II, o fenvalerato, foi descrito que o mesmo sofre degradação pela luz ultravioleta gerando radicais, cuja reatividade ainda não foi estudada, mas que podem estar envolvidos na geração dos seus efeitos biológicos (HOLMSTEAD & FULLMER, 1977). Ainda, são encontrados na literatura estudos relativos as características eletroquímicas da deltametrina que demonstraram que este piretróide sofre redução, verificado como um único pico bem definido ao redor de $-0,7\text{V}$ (SAMATHA & SREEDHAR, 1999).

Este trabalho mostrou também que a deltametrina nas condições experimentais utilizadas inibe completamente o inchamento dependente de Ca^{2+} . O efeito foi parcialmente reduzido na presença de agentes oxidantes de grupos sulfidrilas, diamida e mersalil, indicando que a deltametrina não evita a oxidação extensiva desses grupos.

O mecanismo pelo qual a deltametrina exerce efeito protetor não foi esclarecido, mas algumas considerações podem ser feitas. Este efeito a princípio parece surpreendente, face ao estímulo da lipoperoxidação causado pelo piretróide,

do qual se esperaria uma ação de indução da MPT e não o contrário. Entretanto, a deltametrina na concentração utilizada ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) aumentou a rigidez da membrana, o que implica em redução da sua elasticidade.

O mau funcionamento da organela responsável pela produção da maior parte da energia utilizada no organismo, apresenta um risco para a atividade da maioria das células. A produção insuficiente de energia é óbvia mas não a única consequência da toxicidade causada por praguicidas ao nível mitocondrial. Traumas celulares podem ser decorrentes de reações que envolvem a mitocôndria. Isto porque a diminuição do transporte de elétrons e parâmetros associados compromete o ganho em ATP, que por sua vez é necessário para manutenção do equilíbrio osmótico associados ao funcionamento da Na^+/K^+ ATPase e Ca^{2+} ATPase. Evidentemente a redução do nucleotídeo implicaria em diminuição da atividade destas bombas favorecendo então a entrada de H_2O e lise celular (WALLACE & STARKOV, 2000), podendo resultar em necrose.

Nos estudos desenvolvidos com xenobióticos como os praguicidas, um dos interesses é a correlação entre a faixa de concentração em que a toxicidade ocorre e aquela ambiental. Existem diferenças entre espécies animais no que diz respeito ao nível de exposição e a concentração absorvida, e no caso da deltametrina é relevante que as baixas concentrações ambientais podem ser suficientes para causar toxicidade em peixes, devido, principalmente, ao fato de estarem em contato direto com a água, e a deficiência em enzimas que hidrolizam piretróides nestes animais (HAYA, 1989). As concentrações de deltametrina mais baixas utilizadas neste trabalho ($10 - 20 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) são compatíveis com concentrações ambientais descritas na literatura (HAYA, 1989). Entretanto, as concentrações superiores ($50 - 200 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) parecem ser maiores, por exemplo, do que aquelas que causam toxicidade em peixes ($0,77 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $28,7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (MESTRES & MESTRES, 1992; GOLOW & GODZI, 1994).

Para ratos machos e fêmeas cujos valores de CL50 (concentração letal 50) são $188 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $172 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente (VARSHO, 1996), as concentrações utilizadas neste trabalho também parecem ser compatíveis. A administração de uma única dose oral de deltametrina ($26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} = \sim 51,5 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) em ratos, alcança níveis plasmáticos de $\sim 0,46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\sim 910 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 horas após

a administração (ANADÓN et al., 1996). No presente trabalho, as concentrações foram inferiores a este valor, de maneira que os efeitos descritos aqui parecem ocorrer quando o animal está sob exposição aguda. Pessoas que vivem próximas a áreas agrícolas com grande volume de aplicação deste piretróide estariam sujeitas a condições de exposição a deltametrina, a qual devido sua alta hidrofobicidade se acumula nos tecidos (SAYEED et al., 2003). A quantificação urinária do metabólido da deltametrina (ácido 3-fenóxibenzóico) em aplicadores de praguicidas e em crianças expostas a aplicação, mostrou que as crianças têm altos níveis comparados com dos aplicadores (YÁÑEZ et al., 2002).

Com o objetivo de investigar possíveis efeitos comportamentais, doses de 1, 2 e 4 mg·kg⁻¹ foram administradas por 63 dias consecutivos aos animais. Estas doses foram escolhidas por serem duas abaixo e uma acima da dose NOEL (No Observed Effect Level) de 3,3 mg·kg⁻¹ para toxicidade materna, ou seja, a maior dose de deltametrina que não causa nenhum efeito adverso. A administração foi feita por via oral (*gavage*) e portanto não se pode excluir que esta via de administração permita que uma parte da deltametrina seja degradada antes mesmo de atingir a circulação sistêmica e conseqüentemente, os órgãos e o sistema nervoso central. Mesmo assim, para um estudo desta natureza com um praguicida, esta via de administração parece ser mais relevante que a administração intravenosa. Entretanto, nas condições experimentais utilizadas, o comportamento dos animais que receberam deltametrina, não apresentou diferenças significativas em relação aos animais do grupo controle.

A ausência de efeitos nos parâmetros comportamentais avaliados em rato machos tratados poderia estar relacionada a uma baixa concentração de deltametrina circulante atingida *in vivo* pelo tratamento devido a uma rápida metabolização, evitando o aparecimento durante o tratamento, de qualquer alteração detectável nos experimentos realizados.

Portanto, nas doses NOEL para efeitos teratogênicos, também não se observa alterações comportamentais em ratos. Entretanto, estes dados não excluem o papel desta substância na manifestação da depressão em agricultores expostos, e fatores adicionais podem estar envolvidos, tais como, a vulnerabilidade genética, eventos estressantes maiores, maior tempo de exposição, doses maiores e associação com outros praguicidas. Vale destacar que alguns autores (LAZARINI et

al., 2001) relatam alterações comportamentais como diminuição no levantar nas patas traseiras de filhotes machos com 60 dias de idade como alteração associada à administração de deltametrina as mães do 6º ao 15º dia da gravidez (os filhotes não foram tratados). Esta alteração não foi observada no presente estudo onde as doses utilizadas foram 1, 2 e 4 mg·kg⁻¹.d⁻¹, portanto doses maiores do que aquela utilizada por LAZARINI et al. (2001). No entanto, cabe ressaltar que LAZARINI et al. (2001) utilizaram o produto formulado, não descrevendo quais e em qual concentração outras substâncias além da deltametrina estariam contidas na formulação.

Outro praguicida estudado foi o glifosato. Os resultados polarográficos obtidos para o glifosato mostraram que este herbicida nas concentrações utilizadas não altera a velocidade de consumo de oxigênio de mitocôndrias de fígado de rato e também não interfere em complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Os resultados são contrastantes aos descritos por OLORUNSOGO et al. (1979) relatando que mitocôndrias isoladas de fígado de ratos tratados 5 horas antes do sacrifício com glifosato 120 mg·kg⁻¹ intraperitoneal, e energizadas com succinato de sódio, sofreram inibição na velocidade respiratória do estado 3, aumento na velocidade respiratória do estado 4, e diminuição do coeficiente de controle respiratório e da razão ADP/O, além de promover um aumento na atividade ATPásica. Baseado nestes resultados estes autores sugeriram que estes efeitos toxicológicos podem ser, primariamente, devido ao desacoplamento da fosforilação oxidativa. Em outro estudo, OLORUNSOGO et al. (1990) sugerem ainda que o efeito desacoplador pode ser devido a característica do glifosato de agir com quelante de íons e ser um protonóforo fraco. Contudo nestes trabalhos OLORUNSOGO et al. utilizaram glifosato na forma de sal de isopropilamina. Por outro lado, a ausência de efeitos observada no presente estudo vai de encontro aos resultados obtidos para mitocôndrias de batata (ARNAUD et al., 1993), quando foi sugerido que o glifosato não é capaz de atravessar a membrana mitocondrial interna em concentração suficiente para afetar a respiração mitocondrial.

Diante da ausência de efeitos sobre a cadeia respiratória, foi surpreendente que este herbicida inibisse a velocidade e a amplitude do inchamento mitocondrial na presença de valinomicina-K⁺. Considerando que experimentos de polarização de fluorescência com membranas naturais e artificiais, mostraram que o glifosato nas concentrações utilizadas não é capaz de alterar a fluidez e a

temperatura média de transição de fase (T_m), o efeito sobre o inchamento mitocondrial desencadeado por valinomicina- K^+ foi atribuído a uma habilidade do glifosato quelar íons fortemente, (SUBRAMANIAM & HOGGARD, 1988) diminuindo a disponibilidade de íons K^+ necessários para o processo. De fato, dados da literatura sugerem que a própria disponibilidade do glifosato seria dependente da presença ou não de certos íons metálicos (SMITH & RAYMOND, 1988; CLARCKE et al., 1989; HEINECKE et al., 1994; BARJA et al., 2001). Suas características estruturais o caracterizam como ácido fraco com capacidade quelante. Porém, sendo hidrossolúvel este composto tem pouca afinidade pela membrana mitocondrial interna, fato que se contrapõem ao efeito desacoplador proposto por OLORUNSOGO (1979, 1990). Porém, deve-se destacar que o fato do herbicida não promover alterações significativas sobre a bioenergética mitocondrial nas condições experimentais aqui descritas, não se exclui a possibilidade de efeitos sobre outros modelos experimentais não avaliados.

Finalmente, embora experimentos *in vivo* realizados com a deltametrina nas doses utilizadas não resultaram na visualização de efeitos na atividade geral dos animais, a possibilidade de que isto ocorra em doses mais elevadas não é descartada. Isto porque a toxicidade aguda promovida por inibidores do transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial causa sintomas tais como fraqueza muscular, fadiga, hipotensão, dores de cabeça, rubor facial, náusea, confusão, e agravamento de doenças do miocárdio (WALLACE & STARKOV, 2000) entre outras. Estes sintomas muitas vezes são encontrados em casos de intoxicação por praguicidas (TRAPÉ, 1993; NUNES & TAJARA, 1998), e os efeitos observados neste trabalho podem de fato representar efeitos moleculares precoces envolvidos na ação de piretróides.

8 CONCLUSÕES

1) A deltametrina afeta o metabolismo oxidativo mitocondrial inibindo os complexos II e III da cadeia respiratória mitocondrial, o inchamento mitocondrial energizado e desenergizado, e o potencial elétrico de membrana mitocondrial.

2) A deltametrina promove alterações na fluidez de membranas artificiais (DMPC) e naturais (mitocondrial), aumentando a sua rigidez, principalmente sobre a região mais hidrofóbica da membrana.

3) A deltametrina estimula a liberação de ferro da ferritina, e a lipoperoxidação na presença de Fe^{2+} e ADP.

4) Inibe a transição de permeabilidade mitocondrial sendo o efeito anulado parcialmente por diamida, mersalil, FeCl_3 e H_2O_2 ;

5) Nas doses utilizadas nos experimentos *in vivo*, a deltametrina não promoveu alterações comportamentais no modelo experimental utilizado.

6) Nas condições utilizadas neste trabalho o glifosato não interferiu no metabolismo energético mitocondrial, e nas propriedades de membranas, sendo os seus efeitos compatíveis com atividade quelante de metais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A.; MARZUKI, A.; RAHMAN, H. A.; AZIZ, M. A. The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. **Vet. Human Toxicol.**, Manhattan, v.39, nº 3, p. 147-151, 1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/tox/manual/anexo_03.htm. Capturado em 26 set. 2003.

ÅKERMAN, K.; WIKSTRÖM, M. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, p. 191-197, 1976.

ALDRIDGE, W.N. An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 21, p. 89-104, 1990.

ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M. R.; FERNANDEZ-CRUZ, M. I.; DIAZ, M. I.; FERNANDEZ, M. C.; MARTINEZ, M. A. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 141, p. 8-16, 1996.

ANDRADE, A. J. M.; ARAÚJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENTER, P. R. Reproductive Effects of Deltamethrin on Male Offspring of Rats Exposed during Pregnancy and Lactation. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v. 36, p. 310-317, 2002.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. DTT-membrane interactions studied with two fluorescent probes. **Pest. Sci.**, Chichester, v. 33, p. 347-357, 1991.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; MADEIRA, V. M. C. Membrane fluidity as affected by the organochlorine insecticide DTT. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1023, p. 469-474, 1990.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; MADEIRA, V. M. C. Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 982, p. 161-166, 1989.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; VIDEIRA, R. A.; KLÜPPEL, M. L.; MADEIRA, V. M. C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.

ANTUNES-MADEIRA, M. C.; VIDEIRA, R. A.; MADEIRA, V. M. C. Effects of parathion on membrane organization and its implications for the mechanisms of toxicity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1190, p. 149-154, 1994.

ANTUNES-MADEIRA, M.C.; CARVALHO, A.P.; MADEIRA, V.M.C. Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 14, p. 161-169, 1980.

ARNAUD, L.; RAVANEL, P.; ANDING, C.; TISSUT, M. Penetration and Effects of Glyphosate in Isolated Potato Mitochondria. **Phytochemistry**, Oxon, v.32, p. 9-14, 1993.

AUST, S. D.; MILLER, D. M.; SAMOKYSZYN, V. M. Iron redox reactions and lipid peroxidation. In: **Methos in Enzymology**, 186. Packer, L. & Glazer, A. N., (Eds.). Academic Press: San Diego, p. 457-463, 1990.

BACON, B. R.; O'NEILL, R.; PARK, C. H. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 2, p. 339-347, 1986.

BACON, R. R.; O'NEILL, R.; BRITTON, R. S. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 105, p. 1134-1140, 1993.

BARJA, B. C.; HERSZAGE, M.; AFONSO, M. S. Iron(III) - phosphonate complexes. **Polyhedron**, Oxon, v. 20, p. 1821-1830, 2001.

BARNES, J.M., VERSCHOYLE, R.D., 1974. Toxicity of new pyrethroid insecticide. **Nature**, London, v. 248, p. 711, 1974.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 234, p. 466-468, 1959.

BEAVIS, A. D.; BRANNAN, R. D. ; GARLID, K. D. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix: I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, V. 260, p. 13424-13433, 1985.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. , p. , 2004.

BERNARDES, C. F.; MEYER-FERNANDES, J. R.; BASSERES, D. S.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. E. Ca²⁺-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1188, p. 93-100, 1994.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 8834-8839, 1992.

BERNARDI, P. The permeability transition pore: control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1275, p. 5-9, 1996.

BOER, S. F. de; van der GUGTEN, J.; SLANGEN, J. L.; HIJZEN, T. H. Changes in plasma corticosterone and catecholamine contents induced by low doses of deltamethrin in rats. **Toxicology**, Shannon, v. 49, p. 263-270, 1988.

BOND, S. C.; LEBEL, C. P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 14, p. 633-642, 1993.

BORSINI, F.; MELI, A.; Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, Berlin, v. 94, p. 147-160, 1988.

BROADHURST, P.L. Experiments in psychogenetics. In: EISENK, H.J. (Ed.). **Experiments in personality**. London: Routledge & Kegan Paul, 1960. p. 31-71.

BROEKMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E.; PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 264, p. 7826-7830, 1989.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleischer, S.; Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology*, v. 52. Academic Press, San Diego, p. 302-310, 1978.

CADENA, S. M. S. C., CARNIERI, E. G. S., ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M. B. M. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 20, p. 31-377, 2002.

CARDOSO, C. M. P.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. **Chem.-Biol. Interact.**, Shannon, v. 148, p. 149-161, 2004.

CASIDA, J. E. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: *Pyrethrum: The natural insecticide*. Casida, J. E., Academic Press: New York. 329 p., 1973.

CASIDA, J. E.; GAMMON, D. W.; GLICKMAN, A. H. AND LAWRENCE, L. J., Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 23, p. 413-438, 1983.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. R. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.18, p. 479-486, 1995.

CECCARELLI, D.; GALLESII, D.; GIOVANNINI, F.; FERRARI, M.; MASINI, A. Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 209, p. 53-59, 1995.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 217, p. 383-393, 1955.

CLARK, J.M., BROOKS, M.W. Neurotoxicology of pyrethroids: single or multiple mechanisms of action? **J. Environ. Toxicol. Chem.**, v. 8, p. 361-372, 1989.

CLARKE, E.; RUDOLF, A.; MARTELL, A.; CLEARFIELD, A. Structural investigation of the Cu(II) chelate of *N*-phosphonomethylglycine. X-ray crystal structure of Cu(II) $[\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NHCH}_2\text{PO}_3]\cdot\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. **Inorg. Chim. Acta**, New York, v. 164, p. 59, 1989.

COX, C. Glyphosate (Roundup) - Herbicide Factsheet. **J. Pest. Ref.**, v. 18, p. 3-17, 1998.

CREMER, J.E.; CUNNINGHAM, V.J.; SEVILLE, M.P. Relationships between extraction and metabolism of glucose, blood flow, and tissue blood volume in regions of rat brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, Hagerstown, v. 3, p. 291-302, 1983.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, Chichester, v. 341, p. 233-249, 1999.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, Kidlington, v. 23, n° 5, p. 238-245, 2002.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D. G.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D. G.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. **Online J. Vet. Res.**, v. 1, p. 29-36, 2002.

DALSENTER, P. R.; DALLEGRAVE, E.; MELLO, J. R. B.; LANGELOH, A.; OLIVEIRA, R. T.; FAQUI, A. S. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Human Exp. Toxicol.**, Basingstoke, v. 18, n° 9, p. 310-307, 1999.

DATTA, M.; KAVIRAJ, A. Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induced stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*. **Chemosphere**, Kidlington, v. 53, p. 883-888, 2003.

DAVIES, J. H. The pyrethroids: an historical introduction. In: **The pyrethroid insecticides**. P. 1-31. Leahey, J. P., Taylor & Francis (Eds.), London, 1985

DAYAL, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A.; DWIVEDI, U. N.; DOEHMER, J.; SETH, P. K. Induction of rat brain and liver cytochrome P450 1A1/1A2 and 2B1/2B2 isoenzymes by deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 7, p. 169-178, 1999.

ECOBICHON, D. J. **Toxic effects of pesticides**. In KLASSEN, C. D., ed. - Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, p. 643-690, 5th ed. McGraw-Hill Inc., New York, 1996.

EL-AZIZ, A.; SAHLAB, A. M.; EL KHALIL, A. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. **Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.**, Leine, v. 101, p. 230-232, 1994.

ELLIOT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAM, P. H.; PULMAN, D. A.; STEVENSON, J. H. A phosphotable pyrethroid. **Nature**, London, v. 246, p. 169-170, 1973.

ELLIOT, M.; FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; NEEDHAM, P.H.; PULMAN, D.A. Synthetic insecticide with a new order of activity. **Nature**, London, v. 248, p. 710-711, 1974.

ELLIOT, T. Established pyrethroid insecticides. **Pestic. Sci.**, Chichester, v. 11, p. 119-128, 1980.

ERIKSSON, P.; NORDBERG, A. Effects of two pirethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulation of muscarinic receptors in the neonatal mouse brain. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 102, p. 456-463, 1990.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. In: **Methods and Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1967. V. 10, p. 41-47.

FAGIAN, M. M.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, L. S.; VERCESI, A. R. Membrane protein cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 19955-19960, 1990.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, nº 4, p. 391-400, 1999.

FIOCRUZ (**Fundação Oswaldo Cruz**). Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) [on line]. Disponível: <http://www.fiocruz.br/cict/sinitox/tabela301999.html>. [capturado em 23 set. 2001].

FORSHAW, P. J.; BRADBURY, J. E. Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 91, p. 207-213, 1983.

FRANZ, J.; MAO, M.; SIROKI, J. **A Unique Global Herbicide**. Washington, DC, 1997. *Número de folhas*. Monograph 189 (ACS) - ACS.

FUNK, F.; LENDERS, J.P.; CRICHTON, R.R. and Schneider, W. Reductive mobilization of ferritin iron. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 152, p. 167-172, 1985.

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.

GARCIA, E. G. Pesticide control experiences in Brazil. **Pest. Saf.**, Chichester, v. 2, p. 5, 1997.

GARLID, K. D.; BEAVIS, A. D. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix: II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 260, p. 13434-13441, 1985.

GASSNER B.; WÜTHRICH A.; SCHOLTYSIK G.; SOLIOZ M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 281, p. 855-60, 1997.

GAZETA MERCANTIL. **Defensivos**. (Suplemento Projetos de Mercado: Agronegócios, pág. 7 de 05/08/2004). In: Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola (SINDAG). Capturado em 22 de novembro de 2004 <http://www.sindag.com.br/new/noticias/interna.php?cod=585>.

GHOSH, T. K. Influence of cypermethrin on the oxidative metabolism of *Labeo rohita*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 55, p. 115-120, 1989.

GIRAY, B.; GÜRBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 118, p. 139-146, 2001.

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

- GOLDSTEIN, D. B.. The effects of drugs on membrane fluidity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 24, p. 43-64, 1984.
- GOLOW, A. A.; GODZI, T. A. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis* (LIN). **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, New York, v. 52, p. 351-354, 1994.
- GORDON, L. M.; SAUERHEBER, R. D.; ESGATE, J. A.; DIPPLE, R. J.; MARCHMONT, R. J.; HOUSLAY, M. D. The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 255, p. 4519-4527, 1980.
- GOSDVADZE, V.; WALTER, P. B.; AMES, B. N. The role of Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 414, p.255-260, 2003.
- GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. C755-C786, 1990.
- GUNTER, T. E.; YULE, D. I.; GUNTER, K. K.; ELISEEV, R. A.; SALTER, J. D. Calcium and mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 567, p. 96-102, 2004.
- 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.
- HALESTRAP, A. P.; BRENNER, C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition and key player in cell death. **Curr. Med. Chem.**, Hilversum, v. 10, p. 1507-1525, 2003.
- HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; JAVADOV, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. **Cardiovasc. Res.**, Amsterdam, v. 61, p. 372-385, 2004.
- HALESTRAP, A. P.; CONNERN, C. P.; GRIFFITHS, E. J.; KERR, P. M. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. **Mol. Cell Biochem.**, Dordrecht, v. 174, p. 167-172, 1997.
- HALESTRAP, A. P.; McSTAY, G. P.; CLARKE, S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, Paris, v. 84, p. 153-166, 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Third edition. Oxford University Press, Inc. Oxford. 936 p., 1999.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of α_2 -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn Schiedeborgs. Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1275, p. 161-203, 1996.

- HAYA, G. Toxicity of pyrethroid insecticide to fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 8, p. 381-391, 1989.
- HE, F., WANG, S., LIU, L., CHEN, S., ZANG, Z.; SUN, J. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 63, p. 54-58, 1989.
- HEINEKE, D.; FRANKLIN, S. J.; RAYMOND, K. N. Coordination chemistry of glyphosate: structural and spectroscopic characterization of bis(glyphosate)metal(III) complexes. **Inorg. Chem.**, London, v.33, p. 2413-2421, 1994.
- 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.
- HIETANEN, E.; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 53, nº 2, p. 103-112, 1983.
- HINCAL, F.; GÜRBAY, A.; GIRAY, B. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. **Biol. Trace Elem. Res.**, Totowa, v. 47, p. 321-326, 1995.
- HODGSON, E.; LEVI, P. E. Introduction to Biochemical Toxicology. Hodgson, E.; Levi, P. E. (Eds). Second Edition. Appleton & Lange: Norwalk, Connecticut. 588 p., 1994.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v. 54, p. 21-30, 1996.
- 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.
- HOLMSTEAD, R.L.; FULLMER, D.G. Photodecarboxylation of cyanohydrine esters. Models for pyrethroid photodecomposition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, p. 56-58, 1977.
- HUSAIN, R.; HUSAIN, R.; ADHAMI, V. M.; SETH, P. K. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. **J. Toxicol. Environ. Health**, London, v. 48, p. 515-526, 1996.
- HUSAIN, R.; MALAVIYA, M.; SETH, P. K.; HUSAIN, R. Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behavior in young rats. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 74, p. 211-215, 1994.
- IBGE. **Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná - Safra 1998/1999**. In: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – PNAD. Rio de Janeiro: 2001.
- JAIN, M. K.; WU, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III phase transition in lipid bilayer. **J. Membr. Biol.**, New York, v. 34, p. 157-201, 1977.
- 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.

KAMRIN, M. A. Glyphosate. In: Pesticide Profiles: Toxicity, environmental impact, and fate. Kamrin, M. A. (Ed.). CRC Lewis Publishers: Boca Raton. 676 p., 1997.

KANEKO, H.; OHKAWA, H.; MIYAMOTO, J. Comparative metabolism of fenvalerate and the (2*S*, α *S*)-isomer in rats and mice. **J. Pestic. Sci.**, Toshima-ku, v.6, p. 317-326, 1981.

KATZ, R. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v. 16, p. 965-968, 1982.

KLAUSTERMEYER, W. B.; KRASKE, G. K.; LEE, K. G.; KUROHARA, M. L. Allergic and immunologic profile of symptomatic Persian Gulf War veterans. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, McLean, v. 80, p. 269-273, 1998.

KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M.; WERTHEIM, B. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. **Biochem Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v. 37, p. 593-596, 1969.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, New York, v. 6, p. 513-519, 2000.

LAWRENCE; L. J.; CASIDA, J. E. Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 18, p. 9-14, 1982.

LAZARINI, C. A.; FLORIO, J. C.; LEMONICA, I. P.; BERNARDI, M. M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, New York, v. 23, p. 665-673, 2001.

LE QUOC, D.; LE QUOC, K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 273, p. 466-478, 1989.

LENG, G.; LEWALTER, J.; RÖHRIG, B.; IDEL, H. The influence of individual susceptibility in pyrethroid exposure. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 107, p. 123-130, 1999.

LENTZ, B.R.; BARENHOLTZ, Y. and THOMPSON, T.E. Fluorescence depolarization studies of phase transition and fluidity in phospholipid bilayers. 1 - Single component phosphatidylcholine liposomes. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 4521-4528, 1976.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant

state in human lymphocyte exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine and DPX-E9636. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v. 32, n° 1, p. 39-46, 1998.

LITMAN, B.J. and BARENHOLZ, Y. Fluorescent probe: diphenyl hexatriene. In: **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1982. V. 81, p. 678-685.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, n° 1, p. 265-275, 1951.

MACIEL, E. N.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **J. Neurochem.**, Hagerstown, v. 79, p. 1237-1245, 2001.

MADSEN, H. L.; CHRISTENSEN, H.; GOTTLIEB-PETERSEN, C. Stability Constants of Copper(II), Zinc, Manganese(II), Calcium, and Magnesium Complexes of N-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate). **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 32, p. 79-83, 1978.

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.

MALAVIYA, M.; HUSSAIN, R.; SETH, P. K.; HUSSAIN, R. Perinatal effects of two pyrethroid insecticides on brain neurotransmitter function in the neonatal rat. **Vet. Hum. Toxicol.**, Manhattan, v. 35, p. 119-122, 1993.

MARGOLIASH, E. The chromatographic behavior of cytochrome *c* on cation exchangers. **Biochem. J.**, Chichester, v. 56, p. 535-543, 1954.

MARTINEZ, T. T.; BROWN, K. Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, Tucson, v. 34, p. 43-46, 1991.

MASINI, A.; CECCARELLI, D.; TRENTI, T.; CORONGIU, F. P.; MUSCATELLO, U. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1014, p. 133-140, 1989.

MASINI, A.; TRENTI, T.; CECCARELLI-STANZANI, D.; VENTURA, E. The effect of ferric iron complex on isolated rat liver mitochondria. I. Respiratory and electrochemical responses. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 810, p.20-26, 1985.

MASON, T. L.; POYTON, R. O.; WHARTON, D. C.; SCHATZ, G. Cytochrome *c* oxidase from bakers yeast. I- Isolation and Properties. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, p. 1346-1354, 1973.

McCONNEL, J. S.; HOSSNER, L. R. X-ray diffraction and infrared spectroscopic studies of adsorbed glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 37, p. 555-560, 1989.

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

MERVOSH, T. L.; BALKE, N. E. Effect of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Sci.**, Lawrence, v. 39, p. 347, 1991.

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

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos a ação de desruptores endócrinos? **Cad. Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, p. 845-850, 1999.

MICHELANGELI, F.; ROBSON, M. J.; LEE, A. G. The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 49-57, 1990.

MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO PARANÁ (MPEP). Centro de Apoio Operacional às Promotorias de Proteção ao Meio Ambiente. Agricultura no Estado do Paraná – **Dados Demográficos e Sócio-Econômicos**. In: Fórum Estadual de Combate aos Agrotóxicos do Paraná. Capturado em 02 de novembro de 2004. <http://www.mp.pr.gov.br/cpmeio/feca.html>.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961.

MIYAMOTO, J. A risk assessment of household insecticides. **Sumitomo Pyrethroid World**, Kita-ku, v. 20, p. 14-19, 1993.

MIYAMOTO, J.; KANEKO, H.; TSUJI, R.; OKUNO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 82-83, p. 933-940, 1995.

MONTEIRO, H.P.; ABDALLA, D.S.P.; AUGUSTO, O.; BECHARA, E.J.H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connection with porphyriopathies. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 271, p. 206-216, 1988.

MORENO, A. J.; MADEIRA, V. M. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, p. 361-367, 1990.

MOTEKAITIS, R.; MARTELL, A. E. Metal chelate formation by *N*-phosphonomethylglycine and related ligands. **J. Coord. Chem.**, New York, v. 14, p. 139-149, 1985.

MOYA-QUILES, M. R.; MUÑOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C. J. The pyrethroid insecticide deltamethrin modifies the thermotropic properties and lipid packing order of model membranes. **Chem. Phys. Lipids**, Shannon, v. 83, p. 61-69, 1996.

MÜLLER-MOHNSEN, H. Chronic sequelae and irreversible injuries following acute pyrethroid intoxication. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 107, p. 161-176, 1999.

MURPHY, F. M.; KANG, H.; DALAGER, N. A.; LEE, K. Y.; ALLEN, R. E.; MATHER, S. H.; KIZER, K. W. The health status of Gulf War veterans: lessons learned from the Department of Veterans Affairs Health Registry. **Mil. Med.**, Kensington, v. 164, p. 327-331, 1999.

MUSCARI, C.; FRASCARO, M.; GUARNIERI, C.; CALDARERA, C. M. Mitochondrial function and superoxide generation from submitochondrial particles of aged rat hearts. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, p. 200-204, 1990.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damper oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 24, p. 381-385, 1966.

NARAHASHI, T. Cellular and molecular mechanisms of action of insecticides: neurophysiological approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, v. 4, p. 753, 1982.

NARAHASHI, T. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 6, p. 3-22, 1985.

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

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, Shannon, v. 191, p. 233-244, 2003.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Technical report on toxicity studies of glyphosate (case #1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. USA - NIH Publication 92-3135, 1992.

NEPOMUCENO, M. F.; MACEDO, D. V.; PEREIRA da SILVA, L. Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of Ca^{2+} . **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 833-836, 1991.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**. 3ª edição. San Diego: Academic Press, 255 p., 2002.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, nº 4, v. 32, p. 372-382, 1998.

OGA, S. **Fundamentos de toxicología**. 2ª edição. São Paulo: Seizi Oga (Ed). Atheneu Editora, 474 pp., 2003.

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.

OLORUNSOGO, O. O. Inhibition of succinate-linking reduction of pyridine nucleotide in rat liver mitochondria "in vivo" by N-(phosphonomethyl) glycine. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 7, p. 149-52, 1980.

OLORUNSOGO, O. O. Inhibition of energy-dependent transhydrogenase reaction by N-(phosphonomethyl) glycine in isolated rat liver mitochondria. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 10, p. 91-95, 1982.

OLORUNSOGO, O. O. Modification of the transport of protons and Ca^{2+} ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl) glycine. **Toxicol.**, Shannon, v. 61, p. 205-209, 1990.

OLORUNSOGO, O. O.; BABABUNMI, E. A. e BASSIR, O. Effect of Glyphosate Liver Mitochondria In Vivo. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 22, p. 357-364, 1979.

OPAS (**Organização Pan-americana de Saúde**). Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. 69 p., 1997.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 316, p. 607-611, 1995.

PEARSON, R. G. Hard and Soft acids and bases. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

PEDERSEN, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 31, p. 291-304, 1999.

PELLOW, S., CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, n^o 3, p. 149-167, 1985.

PELUSO, M.; MUNNIA, A.; BOLOGNESI, C.; PARODI, S. 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v. 31, n^o 1, p. 55-59, 1998.

PENIN, F.; GODINOT, C.; COMTE, J.; GAUTHERON, D. C. Vesicular Preparation of a Highly Coupled ATPase-ATP Synthase Complex from Pig Heart Mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 679, p. 198-209, 1982.

PETRESCU, I; TARBA, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1318, p. 385-394, 1997.

PETRONILI, V.; CONSTANTINI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 16638-16642, 1994.

PHILIP, G. H.; REDDY, P. M.; SRIDEVI, G. Cypermethrin-Induced *in vivo* alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Orlando, v. 31, n^o 2, p. 173-178, 1995

PICCOLO, A.; CELANO, G. **J. Environ. Sci. Health**, Monticello, v. 28 p. 447-555, 1993.

PIENIAZEK, D; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. **Pest. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 79, p. 58-63, 2004.

POOLMAN, B. Precursor/product antiport in bacteria. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 4, p. 1629-1636, 1992.

POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Secondary solute transport in bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1183, p. 5-39, 1993.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, v. 266, p. 730-732, 1977.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.

PROCTOR, S. P.; HEEREN, T.; WHITE, R. F.; WOLFE, J.; BORGOS, M. S.; DAVIS, J. D.; PEPPER, L.; CLAPP, R.; SUTKER, P. B.; VASTERLING, J. J.; OZONOFF, D. Health status of Persian Gulf War veterans: self-reported symptoms, environmental exposures and the effect of stress. **Int. J. Epidemiol.**, Oxford, v. 27, p. 1000-1010, 1998.

PULLMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I- Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosina triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 235, n° 11, p. 3322-3329, 1960.

REDDY, P. M., PHILIP, G. H., BASHAMOHIDEEN, M. Regulation of AChE system of freshwater fish, *Cyprinus carpio*, under fenvalerate toxicity. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 48, p. 18-22, 1992.

REDDY, P. M.; PHILLIP, G. H. Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, *Labeo rohita* under fenvalerate stress. **Chemosphere**, Kidlington, v. 25, p. 843-852, 1992.

RITTER, L. Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer. **Cancer**, New York, v. 80, p. 2019-2033, 1997.

ROCHA, M. E. M.; FERREIRA, A. M. D. C.; BECHARA, E. J. H. Roles of PhosphAte and na Enoyl Radical in Ferritin Iron Mobilization by 5-aminolevulinic Acid. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 29, n° 12, p. 1272-1279, 2000.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Eds.). **Ethology and Psychopharmacology**. London: John Wiley & Sons, p. 9-44, 1993..

ROSENSTOCK, L.; KEIFER, M.; DANIELL, W. E.; McCONNELL, R.; CLAYPOLE, K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. **Lancet**, Boston, v. 338, p. 223-227, 1991.

ROSSI, A.; AZZONI, G. F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K⁺ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 7, p. 418-426, 1969.

RUZO, L. O.; ENGEL, J. L.; CASIDA, J. E. Decamethrin metabolism in rats. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 26, p. 918-925, 1978.

SALVI, R. M.; LARA, D. R.; GHISOLFI, E. S.; PORTELA, L. V.; DIAS, R. D.; Souza, D. O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol. Sci.**, Cary, v. 72, p. 267-271, 2003.

SAMATHA, K.; SREEDHAR, N. Y. Polarographic determination of deltamethrin. **Talanta**, Seattle, v. 49, n° 1, p. 53-58, 1999.

SASSA, H.; KOGURE, K.; TAKAISHI, Y.; TERADA, H. Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 17, p. 201-207, 1994.

SAVAGE, M. K.; JONES, D. P.; REED, D. J. Calcium- and phosphate-dependent release and loading of glutathione by liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Palo alto, v. 290, p. 51-56, 1991.

- 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. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Orlando, v. 56, p. 295-301, 2003.
- SEPALLA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propanolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSH, A. K.; HESS, B. (eds). **Biol. Biochem. Osc**, New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.
- SETTLEMIRE, C. T.; HUSTON, A. S.; JACOBS, L. S.; HAVEY, J. C.; HOWLAND, J. L. Action of some insecticides on membranes of mouse liver mitochondria. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 11, p. 169-173, 1974.
- SHAN, G.; HAMMOCK, B. D. Development fo sensitive assays based on α -cyano-containing esters. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 299, p. 54-62, 2001.
- SHARP, D. S. Delayed health hazards of pesticide exposure. **Ann. Rev. Public Health**, Palo Alto, v. 7, p. 441-471, 1986.
- SHINITZKY, M.; BARENHOLZ, Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 515, p. 367-394, 1978.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 59, n^o 2, p. 201-222, 1995.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. **Meth. Biochem. Anal.**, New York, v. 22, p. 125-175, 1974.
- SMITH, E. A.; OHEME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet. Human Toxicol.**, Manhattan, v. 34, n^o 6, p. 531-543, 1992.
- SMITH, P. H.; RAYMOND, K. N. Solid-state and solution chemistry of calcium *N*-(phosphonomethyl)glycinate. **Inorg. Chem.**, v. 27, p. 1056-1061, 1988.
- 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.
- SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, n^o 97, p. 183-201, 1965.
- STALLONES, L., C. BESELER. Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. **Environ. Res.**, Orlando, v. 90, n^o 2, p. 89-97, 2002.
- SUBRAMANIAM, V.; HOGGARD, P. E. Metal complexes of glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 1326-1329, 1988.

SUMNER, J. B. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 413-414, 1944.

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.

TALBOT, A.R.; SHIAW, M.H.; HUANG, J.S.; YANG, S.F.; GOO, T.S. WANG, S.H., CHEN, C.L. and SANFORD, T.R. Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ("Roundup"): a review of 93 cases. **Hum. Exp. Toxicol.**, Basingstoke, v. 10, n° 1, p. 1-8, 1991.

THOMAS, C. E.; MOREHOUSE, L. A.; AUST, S. D. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 260, p. 3275-3280, 1985.

TOMLIN, C. **The pesticide manual**. Surrey: The Royal Society of Chemistry, Suffolk, UK, 1995. 1341 p.

TOPLACK, H.; BATCHIULIS, V.; HERMETTER, A.; HUNZINKER, T.; HONEGGER, U. E.; WIESMANN, U. N. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of culture cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 67-72, 1990.

TRAPÉ, A. Z. O caso dos agrotóxicos. In: Rocha *et al.* Isto é trabalho de gente?: vida, doença e trabalho no Brasil. Petrópolis, Ed. Vozes, 1993, p. 568-593.

TREIT, D.; PESOLD, C.; ROTZINGER, S. Noninteractive effects of diazepam and amygdaloid lesions in two animal models of anxiety. **Behav. Neurosci.**, Washington, v. 107, n° 6, p. 1099-1105, 1993.

TUCKER, S. B.; FLANNIGAN, S. A.; ROSS, C. E. Inhibition of cutaneous paresthesia resulting from synthetic pyrethroid exposure. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v. 23, p. 686-689, 1984.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for certain pesticide chemicals in or on food. Federal Register Document 65, p. 8143-8149, 2000.

UNWIN, C.; BLATCHLEY, N.; COKER, W.; FERRY, S.; HOTOPF, M.; HULL, L.; ISMAIL, K.; PALMER, I.; DAVID, A.; WESSELY, S. Health of UK servicemen who served in Persian Gulf War. **Lancet**, Boston, n° 9148, v. 353, p. 169-178, 1999.

VAINIO, H.; LINNAINMAA, K.; KAHONEN, M. L.; NICKELS, J.; HIETANEN, E.; MANIERMI, J.; PELTONEN, P. Hypolipidemia and peroxisome proliferation induced by phenoxyacetic acid herbicides in rats. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 32, n° 18, p. 2775-2779, 1983.

VARSHO, B. J. Acute oral toxicity study of deltamethrin in albino rats. AgrEvo USA Company Study n° WIL-274001, 1996.

VERSCHOYLE, R. D.; BARNES, J. M. Toxicity of natural and synthetic pyrethrins to rats. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 2, p. 308-311, 1972.

- VERSCHOYLE, R.D., ALDRIDGE, W.N. Structure–activity relationships of some pyrethroids in rats. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 45, p. 325-329, 1980.
- 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.
- 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.
- VLADIMIROV, Y. A.; OLENEV, V. I.; SUSLOVA, T. B.; CHEREMISINA, Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv. Lipid Res.**, San Diego, v. 17, p. 173-249, 1980.
- VOSS, D. O.; CAMPELO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 4, p. 48-51, 1961.
- WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 40, p. 353-388, 2000.
- WATT, G. D.; FRANKEL, R. B.; PAPAETHYMIIOU, G. C. Reduction of mammalian ferritin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.82, p. 3640-3643, 1985.
- WEICKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 423, p. 339-42, 1998.
- WHO (**World Health Organization**). Deltamethrin. Environmental health Criteria 97. International Program on Chemical Safety. Geneva. 1990.
- WHO (**World Health Organization**). Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. Environmental Health Criteria. 225, p. 1-187, 2001.
- WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v. 31, p. 117-165, 2000.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; MUSCAT, R.; SOPHOKLEOUS, S. Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 39, p. 358-364, 1987.
- WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends Pharmacol. Sci.**, Kidlington, v. 12, p. 131-136, 1991.
- WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 134, p. 319-329, 1997.
- WISWEDEL, I.; TRUMPER, L.; SCHILD, L.; AUGUSTIN, W. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 934, p. 80-86, 1988.

WORLD RESOURCES INSTITUTE (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.

YÁÑEZ, L.; ORTIZ-PÉREZ, D.; BATRES, L. E.; BORJA-ABURTO, V. H.; DÍAZ-BARRIGA, F. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico. **Environ. Res.**, Orlando, v. 88, p. 174-181, 2002.

YANG, Z. P.; MORROW, J.; WU, A.; ROBETS, L. J.; DETTBARN, W. D. Diisopropyl phosphofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation *in vivo*. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 52, p. 357-361, 1996.

YONETANI, T.; RAY, G. S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome C oxidase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 240, nº 7, p. 3392-3398, 1965.

YOUSEF, M. I.; SALEM, M. H.; IBRAHIM, H. Z.; HELMI, S.; SEEHY, M. A.; BERTHEUSSEN, K. toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **J. Environ. Sci. Health**, Monticello, v. 30, p. 513-534, 1995.

YULI, L.; WILBRANDT, W.; SHINISTKY, M. Glucose transport through cell membranes of modified lipid fluidity. **Biochemistry**, Washington, v.20, p. 4250-4256, 1981.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 201, p. 255-265, 1980.

ZHENG, T.; DRIESSEN, A. J. M.; KONINGS, W. N. Effect of cholesterol on the branched-chain amino acid transport system of *Streptococcus cremoris*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 3194-3198, 1988.

ZORATTI, M.; SZABÓ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1241, p. 139-176, 1995.

ZURITA, A.; MOLINA, V. A. Morphine pretreatment facilitates the occurrence of immobility and anhedonia in response to stress. **Physiol. Behav.**, New York, v. 65, p. 833-837, 1999.

ANEXO I



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

Nº 075

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 12309/04-81 Data de Aprovação: 03/05/04 12ª RO
 Projeto de Pesquisa Título: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INSETICIDA PIRETRÓIDE DO TIPO II - DELTAMETRINA, E DO HERBICIDA GLIFOSATO, SOBRE PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO, ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL E SOBRE MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATURAIS.
 Autores: Maria Benigna M. de Oliveira (resp.); Welligton Luciano Braguini (acadêmico); Maria Eliane Merlin Rocha e Roberto Andreatini - colaboradores
 Departamento : Bioquímica

Curitiba, 03 de maio de 2004.

Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA
 Secretário

Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
 Presidente

ANEXO II

Trabalho científico resultante desta tese:

BRAGUINI, W. L.; CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ROCHA, M. E. M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of deltamethrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 191-202, 2004.



Effects of deltamethrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes

Wellington L. Braguini, Silvia M.S.C. Cadena, Eva G.S. Carnieri,
Maria Eliane M. Rocha, Maria Benigna M. de Oliveira*

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná,
C.P. 19046, C.E.P. 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil*

Received 10 February 2004; received in revised form 29 March 2004; accepted 29 March 2004

Available online 31 July 2004

Abstract

Deltamethrin (DTM) is a synthetic pyrethroid insecticide used worldwide in agriculture, home pest control, protection of foodstuff, and disease vector control. It has widespread applications in Brazilian agriculture. The effects of DTM on mitochondrial respiratory parameters and on the organization of artificial and native membranes are described. DTM (200 nmol mg⁻¹ protein) on isolated liver mitochondria decreased oxygen consumption of both, state III and state IV, as well as the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$). Analysis of segments of the respiratory chain suggested that the DTM inhibition site is located between complex II and complex III. Mitochondrial swelling, energized or driven by the K⁺ diffusion potential using valinomycin, were partially inhibited by DTM (200 nmol mg⁻¹ protein). Fluorescence polarization of DPH and DPH-PA, probing the core and outer regions, respectively, of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and native mitochondrial membranes, indicated that DTM shifts the midpoint phase transition to lower values, besides broadening the phase transition. DTM decreased the lipid order of DMPC bilayers, at temperatures lower than the transition temperature and also caused a disordering effect on native membranes. However at temperatures above the transition temperature, the pesticide increased the rigidity of the membrane. These results suggest that DTM causes perturbations in lipid-lipid and lipid-protein interactions, interferes in transport mechanisms operating at the membrane level, and causes alterations of membrane permeability and mitochondrial enzyme activities. These effects could be associated with the toxicity of deltamethrin.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Deltamethrin; Pyrethroid insecticides; Mitochondria; Swelling; Liposomes; Respiratory chain enzymes

1. Introduction

Synthetic pyrethroid insecticides have widespread applications in agriculture, home pest control, and

disease vector control. Their use, high and non-selective potency, and their considerable stability in the environment make them potentially harmful (Gassner et al., 1997). Pyrethroids have been subdivided into two classes based on their structural characteristics, and toxicological and pharmacological effects (Soderlund et al., 2002). Structurally, type

* Corresponding author. Fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: mbmo@ufpr.br (M.B.M. de Oliveira).

I pyrethroids such as allethrin and permethrin do not contain a cyano group, which is present in type II pyrethroids such as deltamethrin, cypermethrin and fenvalerate (Moya-Quiles et al., 1994). The lipophilicity of pyrethroids favors absorption through the gastrointestinal and respiratory tracts and also confers preferential distribution into lipid-rich internal tissues, including body fat and elements of the central and peripheral nervous system (Soderlund et al., 2002).

Pyrethroids are toxic to the central nervous system (CNS) of both insects and mammals (Soderlund and Bloomquist, 1989; Bloomquist, 1993; Husain et al., 1994, 1996; Ecobichon, 1995). Transient paraesthesia is an effect associated with skin contact with type I pyrethroids (Le Quesne and Maxwell, 1980; Knox et al., 1984), while muscle fasciculations, choreoathetosis, salivation and convulsion, which have led to death in a few cases, are effects associated to systemic poisoning following ingestion of type II pyrethroids (He et al., 1989). The liver was found to accumulate a greater concentration of metabolites since it is the major site of pyrethroid metabolism (Rickard and Brodie, 1985). As observed in deltamethrin metabolism, pesticides of the pyrethroid group have been shown to interact with hepatic xenobiotic metabolizing enzymes, cytochrome P450 monooxygenases being involved (Catinot et al., 1989; Anadón et al., 1991, 1995). Exposure of rats to a single dose of the pyrethroids cypermethrin ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) and fenvalerate ($4.5 \mu\text{g kg}^{-1}$), lowered the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, resulting in both lipid peroxidation and decreased levels of reduced glutathione (GSH) in erythrocytes (Kale et al., 1999).

The hydrophobic ester deltamethrin (DTM, Fig. 1), whose structure is based on natural pyrethrins, is found in flowers of *Chrysanthemum* spp (Michelangeli et al., 1990) is one of eight possible stereoisomers (Madsen et al., 1996). It has been reported that its primary target is the neuronal voltage-dependent sodium

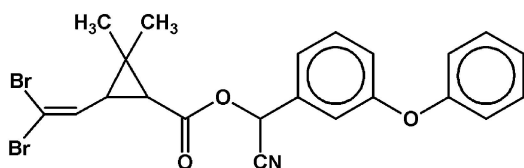


Fig. 1. Structure of deltamethrin.

channel (Soderlund, 1985), which combined with its interaction with the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor–ionophore complex, results in disturbed synaptic transmission and neuroexcitation, which in turn, leads to behavioral anomalies (Crofton and Reiter, 1987; Aziz et al., 2001). However, many of the effects of DTM remain to be clarified, especially those related to energy metabolism and interaction with membranes.

Deltamethrin, due to its high hydrophobicity, could exert effects on biological membranes (Michelangeli et al., 1990) at sites other than the voltage-dependent sodium channel (Chinn and Narahashi, 1986). In addition, in spite of a description of effects of some pyrethroids on energy metabolism in fish (Ghosh, 1989; Reddy and Phillip, 1992) and mammalian (Gassner et al., 1997) mitochondria, it was unfortunately limited to evaluations of oxygen consumption and some respiratory chain enzyme activities. Since the liver is the main site of DTM metabolism, the present research describes a systematic study with the objective of clarifying the effect of DTM on mitochondrial metabolism, as well as its effects on osmotic volume changes of liver mitochondria. In addition, the effect of the pesticide on the fluidity of well-defined artificial model and native membranes, by means of fluorescence polarization of the probes 1,6-diphenylhexatriene (DPH) and 1,6-diphenylhexatriene-propionic acid (DPH-PA), was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Deltamethrin [(*S*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl-(1*R*)-*cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate] was purchased from Aventis Crop-Science (Brazil), and was 99.2% pure. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and dimethylsulphoxide (Me₂SO) were from Merck (Darmstadt, Germany). Glutamic acid, succinic acid, rotenone, sucrose, NADH, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF) and dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) were from Sigma (St Louis, MO, USA). 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 3-[*p*-(6-phenyl)-1,3,5-hex-

atrienyl] phenylpropionic acid (DPH-PA) were purchased from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

2.2. Animals

These were male albino rats (Wistar strain, 220–300 g), which received a standard laboratory diet (Purina). All animals were starved 12 h prior to the experiments, and then killed by decapitation. All recommendations of the Brazilian National Law (no. 6638, November 5, 1979) for Scientific Management of Animals were respected.

2.3. Preparation of mitochondria

Mitochondria to be used in O₂ consumption and ATPase determinations were isolated by differential centrifugation, according to Voss et al. (1961), using an extraction medium consisting of 250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, and 0.1 g% BSA. When destined for swelling experiments, mitochondria were isolated according to the procedures described by Mustafa et al. (1966), using an extraction medium consisting of 330 mM sucrose, 1 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA. In all cases, the centrifuged mitochondrial pellet was washed twice with the extraction medium, the final one being washed and suspended in the same medium without EDTA. The final protein concentration was adjusted to 15–20 mg ml⁻¹ of mitochondrial suspension. For fluorescence polarization experiments using native membranes, the mitochondrial suspension was obtained as already described (Voss et al., 1961) using an extraction medium consisting of 250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Hogeboom, 1955). Mitochondrial protein was assayed by the method of Lowry et al. (1951) calibrated with bovine serum albumin.

2.4. Oxygen uptake

Oxygen uptake was evaluated in a 1.3 ml water-jacketed closed chamber with magnetic stirring, at 28 °C. O₂ consumption was measured polarographically with a Clark oxygen electrode with a Gilson oxygraph (Chance and Williams, 1955; Voss et al., 1961). The standard respiratory medium contained 175 mM sucrose, 50 mM KCl, 10 mM potassium

phosphate, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, and 2 mM MgSO₄ (Petrescu and Tarba, 1997). The medium was supplemented with 1 μM rotenone, 10 mM potassium succinate, 0.1 mM ADP, and 1 mg of mitochondrial protein or 10 mM potassium glutamate, 0.2 mM ADP, and 2 mg of mitochondrial protein. The respiratory rate is expressed as nmol of oxygen consumed min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein (Estabrook, 1967).

2.5. Enzymatic activities

All enzymatic assays were performed using 1 ml of the required medium. NADH oxidase and succinate oxidase activities were determined polarographically (Singer, 1974). NADH dehydrogenase (EC 1.6.5.3 NADH:ubiquinone oxidoreductase) and succinate dehydrogenase (EC 1.3.5.1 succinate:ubiquinone oxidoreductase) activities were assayed spectrophotometrically (Singer, 1974). NADH-cytochrome *c* reductase (EC 1.6.99.3 NADH: cytochrome *c* oxidoreductase) and succinate cytochrome *c* reductase (EC 1.3.99.1 succinate:cytochrome *c* oxidoreductase) activities were measured by reduction of cytochrome *c* at 550 nm, as described by Somlo (1965). The activity of cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1 ferrocyanochrome-*c*:oxygen oxidoreductase) was evaluated according to Mason et al. (1973).

2.6. Determination of ATPase activity in intact mitochondria and submitochondrial particles (SMPs)

Rat liver SMPs were prepared essentially as described by Lee and Ernster (1968), except that EDTA was omitted from the sonication medium. ATPase activities were determined at 30 °C in the presence or absence of 1 μM FCCP, the reaction medium consisting of 50 mM sucrose, 120 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 3.0 mM ATP, and 2 mg of mitochondrial protein. Liberated orthophosphate was measured according to Summer (1944) and the results are expressed as nmol of Pi liberated per min per mg.

2.7. Mitochondrial swelling experiments

Swelling in energized (Sepalla et al., 1973) or deenergized (Moreno and Madeira, 1990) mitochondria was measured by absorbance changes at 546 nm

with a HITACHI (mod. U-2001 UV-Vis) spectrophotometer. The reactions were carried out at 28 °C in a final volume of 3 ml of the required medium in the presence of sodium acetate or potassium nitrate and valinomycin. Swelling supported by the electron and energy transfer system, was carried out in a standard reaction mixture containing: mitochondrial suspension (1 mg protein), 100 mM sucrose, 30 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 50 mM sodium acetate, and deltamethrin in varying concentrations (10–200 nmol mg⁻¹ of protein). Swelling was induced on addition of glutamate (15 mM) and shrinkage was observed by addition of rotenone (4 μM). Swelling in de-energized mitochondria was carried out in a reaction mixture containing: mitochondrial suspension (1 mg protein), 135 mM KNO₃, 5 mM HEPES buffer, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 4 μM rotenone, 2 μg ml⁻¹ antimycin A and 4 μg ml⁻¹ valinomycin. DTM was added in varying concentrations up to 200 nmol mg⁻¹ of protein.

2.8. Mitochondrial membrane potential

The transmembrane potential ($\Delta\psi$) was evaluated with safranin *O* (Åkerman and Wikström, 1976). The standard reaction medium, containing 250 mM sucrose, 20 mM MOPS buffer, pH 7.2, 3 mM succinate, 2 mM NaH₂PO₄, and 1 μM rotenone, was supplemented with mitochondria (0.5 mg protein ml⁻¹) and safranin *O* (5 μM). Fluorescence was measured in a RF-5031PC spectrofluorophotometer (Shimadzu Scientific Instruments Inc.), the excitation and emission wavelengths being 495 and 586 nm, respectively (Weickowski and Wojtczak, 1998), with a slit width of 3.0 for excitation and emission wavelengths.

2.9. Preparation of membranes

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) membranes were prepared as described elsewhere (Antunes-Madeira and Madeira, 1984; Cadena et al., 2001). All procedures were performed under a N₂ atmosphere by manual shaking in a water bath set at 7–10 °C above the transition temperature of the phospholipids. Native mitochondrial membranes were prepared as described by Antunes-Madeira and Madeira (1989) in 10 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) con-

taining 50 mM KCl and 10 μM PMSF. The final concentration of membrane lipids was 345 μM. Synthetic and native membranes were vigorously homogenized using a vortex vibrator for 1 min and then submitted to mild sonication in a Thorton T7 sonication bath. The time of sonication was controlled by the turbidity of the suspension, as evaluated at 600 nm, and sonication was interrupted when an absorbance value of 0.2 was reached.

2.10. Incorporation of probes and DTM into membranes

Aliquots of DPH or DPH-PA, dissolved in tetrahydrofuran or dimethylformamide, respectively, were injected (1.73 μM), while homogenizing into membrane suspensions (345 μM as total lipid), to give a final phospholipid/probe molar ratio of about 200. The mixture was then incubated in the dark for 18 h at 30 °C. Deltamethrin from a 50 mM Me₂SO solution was then added and incubated for 2 h. Control samples received equivalent volumes of solvent and had negligible effects on the measurements.

2.11. Fluorescence polarization measurements

Fluorescence measurements were performed with a RF-5301PC spectrofluorophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.), equipped with a thermostated cell holder with magnetic stirring. The excitation was set at 365 nm and the emission was 450 nm, the excitation and emission slit width being 3. The temperature of the thermostated holder and sample were checked to an accuracy of ±0.1 °C using a thermistor thermometer (Sarkar et al., 1993). The degree of fluorescence polarization (*P*) was calculated according to the equation of Shinitzky and Barenholz (1978):

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}}$$

where I_{\parallel} and I_{\perp} are the intensities of emitted light oriented parallel and perpendicular to the plane of the excitation beam, respectively, and *G* is the correction factor for instrument polarization. A high degree of polarization (*P*) represents a high structural order or low membrane fluidity and vice versa (Antunes-Madeira and Madeira, 1989).

2.12. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.D. Differences between control and incubations containing deltamethrin were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements. Tukey's test was used to localize differences obtained by the ANOVA. The level of significance was set at $P < 0.05$. Statistical analysis of the fluorescence polarization experiments using native membranes was carried out by linear regression using the method of least squares of the means and analysis of the correlation coefficients.

3. Results

3.1. Effect of DTM on mitochondrial parameters

Fig. 2 shows the effect of previous incubation of DTM (2 min) on the respiratory parameters of functionally intact mitochondria. ADP-stimulated respiration (state III) was inhibited by DTM in mitochondria oxidizing glutamate or succinate (Fig. 2A). The effect was dose-dependent and at 200 nmol mg⁻¹ protein, the pesticide decreased glutamate and succinate utilization by ~30% and ~45%, respectively. At the same concentration, DTM decreased the rate of oxygen consumption after ADP exhaustion (state IV) by ~20% and ~25% during oxidation of glutamate and succinate, respectively (Fig. 2B). The RCC values were lowered by ~20 and 30% when glutamate or succinate were respective substrates (Fig. 2C), while the ADP/O ratio showed no alteration (Fig. 2D).

Fig. 3 shows that DTM impairs the development of $\Delta\psi$ by mitochondria energized with succinate; previous incubation of mitochondria (2 min) with DTM gave rise to a progressively lower $\Delta\psi$, and at 200 nmol mg⁻¹ protein the decrease was ~40%, when compared with the control.

In order to clarify if decreased O₂ consumption and $\Delta\psi$ would involve enzymatic activities of the respiratory chain, the effect of DTM was also evaluated on broken mitochondria, a condition that minimizes interference of the barrier membrane as well as processes dependent on the inner membrane electric potential. The results of such experiments are shown in Table 1. The following enzymatic activities were inhibited by deltamethrin (200 nmol mg⁻¹ protein):

NADH oxidase (~36%), succinate oxidase (~37%), succinate dehydrogenase (Complex II) (~21%), and succinate cytochrome *c* reductase (38%). No significant effect was observed on the activity of NADH dehydrogenase (Complex I) and cytochrome oxidase (Complex IV) while NADH cytochrome *c* reductase was inhibited by ~30%. Since DTM did not affect the ATPase of coupled or FCCP-uncoupled mitochondria, nor SMPs or SMPs in the presence of FCCP (Table 2), the results obtained thus suggest that the site of effects of DTM is between Complexes II and III.

Fig. 4A and B shows the effect of deltamethrin (10–200 nmol mg⁻¹ protein) on energy-dependent mitochondrial swelling. The experiments were carried out in the presence of sodium acetate, and sodium glutamate or succinate was the oxidizable substrate. DTM (200 nmol mg⁻¹ of protein) inhibited by ~30% and ~52% the swelling amplitude in the presence of substrate, glutamate (Fig. 4A), or succinate (Fig. 4B), respectively. In addition, the rate of swelling was also decreased by DTM when succinate was the substrate (Fig. 4B). However, in spite of the velocity of shrinkage being slightly decreased, shrinkage in general was not affected under the present experimental conditions. Since DTM exerted inhibitory effects on substrate oxidation (Fig. 2, Table 1), which in turn could restrain swelling in energized mitochondria and mask other effects on the membrane, intact mitochondria where neither the respiratory chain nor ATP synthase were functional, were then used in swelling experiments. Under this condition, deltamethrin reduced both the rate and swelling amplitude in a concentration-dependent manner; at 200 nmol mg⁻¹ protein, DTM inhibited these parameters by ~75% and ~25%, respectively (Fig. 5). Since transit of the valinomycin-K⁺ complex depends on membrane fluidity, it is reasonable to suggest that deltamethrin influences this important property of membranes.

3.2. Effect of DTM on synthetic model and native membranes

In order to clarify the apparent perturbation induced by the pesticide on the membrane fluidity, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) liposome was used as a model, in addition to those represented by the native mitochondrial membranes. The probes DPH and DPH-PA, whose localization in lipid bilayers is well

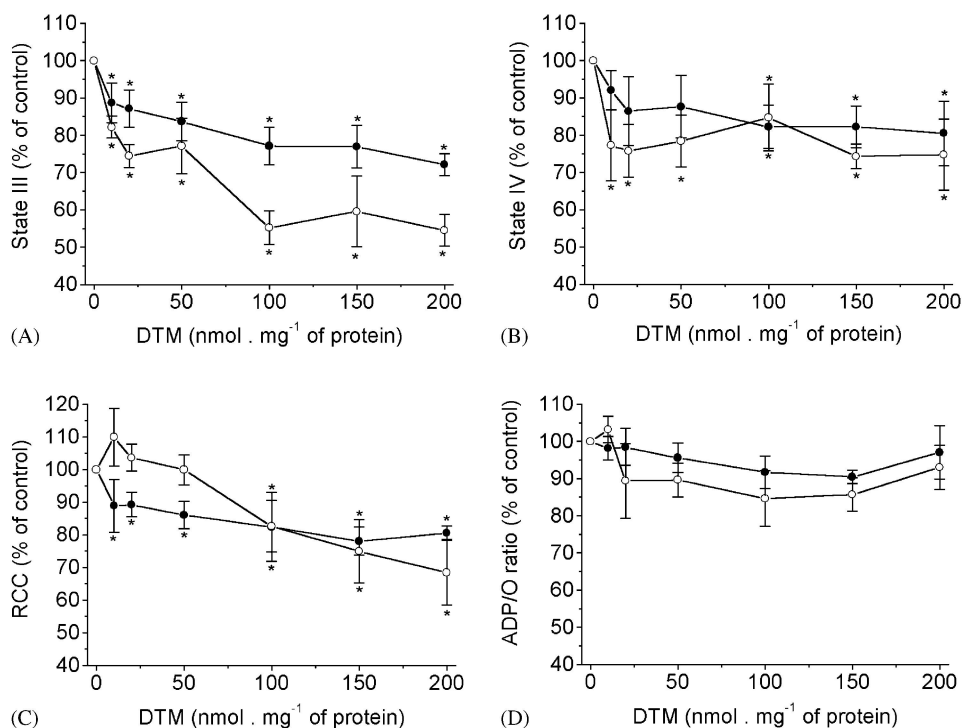


Fig. 2. Effect of deltamethrin on mitochondrial respiration with sodium glutamate (●) or sodium succinate (○) as substrate. Conditions for oxygen uptake measurements are described in Section 2. DTM was incubated for 2 min with the mitochondria, prior to initiation of state III of mitochondrial respiration, on addition of the substrate. (A) State III, mitochondrial oxygen uptake in the presence of ADP and substrate. Hundred percent corresponds to 44.3 ± 6 and 110.8 ± 4 nmol of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein for glutamate and succinate respectively. (B) State IV, mitochondrial oxygen uptake after exhaustion of ADP. Hundred percent corresponds to 8.5 ± 4 and 19.5 ± 4 nmol of oxygen consumed per min per mg of protein for glutamate and succinate, respectively. (C) RCC, respiratory control coefficient. Hundred percent corresponds to 5.7 ± 1 and 5.2 ± 0.6 for glutamate and succinate, respectively. (D) ADP/O, ADP concentration/oxygen consumption. Hundred percent corresponds to values of 3.5 ± 0.3 and 1.7 ± 0.5 for glutamate and succinate, respectively. Each value represents the mean \pm S.D. of five different experiments. Significantly different from control (* $P < 0.05$).

known (Shinitzky and Barenholz, 1978; Trotter and Storch, 1989), were chosen as tools to obtain information concerning the hydrophobic core and outer regions of the bilayers, respectively. Increased P values have been related with decreases in membrane fluidity (Antunes-Madeira et al., 1994). Fig. 6 shows the effects of DTM on the cooperative phase transition of DMPC. When using DPH (Fig. 6A), DTM (40–120 μ M) lowered P values in the gel phase while those from a fluid phase were not affected at 40 μ M, but at 60 and 120 μ M DTM unequivocally promoted an increase in P values, suggesting a lowering of fluidity in the liquid crystalline phase. The pesticide shifted the phase transition midpoint T_m from 23.5 to 21.5 $^{\circ}$ C, thus indicating an interaction of DTM with the C1–C9

carbon atoms of the acyl chains, which modulate the sharpness of the transition (Jain and Wu, 1977). When using DPH-PA (Fig. 6B), DTM (120 μ M) lowered P values in the gel phase while increased those from the fluid phase suggesting membrane disorganization, characterized by fluidity in the gel phase and increasing rigidity in the fluid phase. In addition, a decrease in T_m values, going from 23.5 to 21.5 $^{\circ}$ C, was observed. These results concerning DMPC membranes suggest a preference of DTM to accommodate itself in the membrane core, because of the greater effects observed with DPH as probe, compared with DPH-PA.

DTM increased the fluorescence polarization of DPH and DPH-PA in native membranes (Fig. 7), these effects being dose-dependent and occurring

Table 1
Effect of deltamethrin on enzymatic activities related to the respiratory chain

DTM (nmol mg ⁻¹ protein)	Values in % compared with control (100%)						
	NADH oxidase	NADH dehydrogenase	NADH cytochrome <i>c</i> reductase	Succinate oxidase	Succinate dehydrogenase	Succinate cytochrome <i>c</i> reductase	Cytochrome <i>c</i> oxidase
10	89 ± 7 ^a	96 ± 3	96 ± 4	93 ± 10	102 ± 7	97 ± 8	97 ± 3
20	82 ± 5 ^a	94 ± 3	92 ± 4	85 ± 9 ^a	90 ± 4	82 ± 5 ^a	96 ± 6
50	81 ± 6 ^a	97 ± 8	88 ± 3 ^a	79 ± 8 ^a	90 ± 9	76 ± 6 ^a	97 ± 3
100	74 ± 5 ^a	95 ± 2	74 ± 6 ^a	73 ± 11 ^a	91 ± 9	68 ± 9 ^a	98 ± 2
150	65 ± 8 ^a	89 ± 4	75 ± 11 ^a	72 ± 12 ^a	90 ± 5	64 ± 5 ^a	98 ± 5
200	64 ± 5 ^a	93 ± 9	70 ± 4 ^a	63 ± 6 ^a	79 ± 7 ^a	62 ± 3 ^a	96 ± 6

Experimental conditions are described in Section 2. Control values (100%) were: NADH oxidase: 174.36 nmol of O₂ consumed min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; NADH dehydrogenase: 1.9 nmol of ferricyanide reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; NADH cytochrome *c* reductase: 328.42 nmol of cytochrome *c* reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate oxidase: 117.41 nmol of O₂ consumed min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate dehydrogenase: 139.40 μmol of PMS reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein; succinate cytochrome *c* reductase: 104.61 nmol cytochrome *c* reduced min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein. Results (mean ± S.D. of three independent experiments) are expressed as % of control activities (100%).

^a Significantly different from controls (100%), *P* < 0.05.

Table 2
Effects of deltamethrin on ATPase activity of rat liver mitochondria and of submitochondrial particles

DTM (nmol mg ⁻¹ protein)	ATPase (% of control)			
	Intact	FCCP treated	SMP	SMP + FCCP
10	104 ± 7	111 ± 7	93 ± 7	99 ± 2
20	103 ± 9	109 ± 3	87 ± 6	104 ± 3
50	103 ± 8	110 ± 3	93 ± 9	101 ± 1
100	105 ± 11	111 ± 7	92 ± 6	103 ± 3
150	113 ± 8	116 ± 8	96 ± 7	106 ± 3
200	104 ± 10	111 ± 3	96 ± 6	107 ± 2

Experimental conditions are as described in Section 2. The control activity was determined to be 16.3 ± 1.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ and 44.1 ± 0.2 nmol min⁻¹ mg⁻¹ to intact and FCCP treated mitochondria, respectively. To submitochondrial particles, the control activities were 142 ± 3.7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ and 274 ± 3.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ without and with FCCP, respectively. Results (mean ± S.D. of three independent experiments) are expressed as % of control activities (100%).

over all of the range the studied temperatures, from 10.5 to 40.5 °C. However, with DPH-PA, no expressive change on membrane fluidity was observed with 40 μM DTM, the effect being detected only at a higher concentration (60 μM). This suggests that in spite of high pesticide concentrations interfering with both the outer and inner membrane regions, the inner core of the native membrane would be more affected at low pesticide concentrations.

Although both the hydrophobic core and the surface membrane organization are disturbed on addition of DTM, the pyrethroid is preferentially located in the hydrophobic region of the membrane, in agreement with its extremely low solubility in aqueous solutions.

4. Discussion

We now have investigated the effects of the pyrethroid pesticide deltamethrin (DTM) on mitochondrial functions and membrane properties. A matter of interest is the concentration range that causes environmental toxicity and the concentrations used in the present study. This differs between animal species, being very low for fish because they are deficient in enzymes that hydrolyze pyrethroids (Haya, 1989) and higher for mammals where it is influenced by the solvent, administration route and sex of the animal (Crofton et al., 1995). The lowest doses of DTM used herein (10–20 nmol mg⁻¹ protein) are compatible

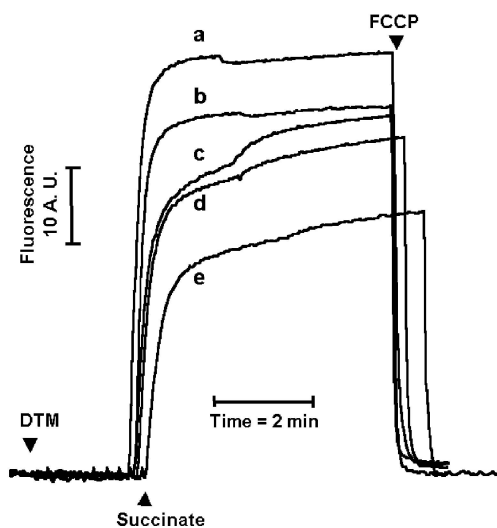


Fig. 3. Effect of deltamethrin on $\Delta\psi$. The membrane potential ($\Delta\psi$) of mitochondrial preparations (0.5 mg ml^{-1}) was estimated by fluorescence changes of safranin *O* ($5 \mu\text{M}$) in a standard medium, as described in Section 2.8 and energized with sodium succinate. DTM was added 2 min before adding succinate to the mitochondria. FCCP was added as indicated to collapse $\Delta\psi$. $\Delta\psi$ was calculated using a suitable calibration curve. The traces are the representative of three independent experiments: (a) Control; (b) 20 nmol mg^{-1} ; (c) 100 nmol mg^{-1} ; (d) 150 nmol mg^{-1} ; (e) 200 nmol mg^{-1} .

with those of the environmental concentrations. However, the highest ones ($50\text{--}200 \text{ nmol mg}^{-1}$ mitochondrial protein) seem to be greater than those causing toxicity in fish ($0.77\text{--}28.7 \text{ nM}$) (Mestres and Mestres, 1992; Golow and Godzi, 1994).

For male and female rats whose LC_{50} values are 188 and $172 \mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively (Varsho, 1996), the concentrations used in the present research also seem to be compatible. Administration of a single oral dose of DTM of 26 mg kg^{-1} ($\sim 51.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$) in rats gave rise to plasmatic levels of $\sim 0.46 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($\sim 910 \text{ nM}$) 2 h after treatment (Anadón et al., 1996). In the present study, the concentrations were lower than this value so that the effects now described seem to occur when the animal is under acute exposure. Humans living next to areas governed by agricultural and pest control would be subject to a continuous exposure to DTM, which due to its high lipophilicity accumulates in tissues (Sayeed et al., 2003). It is meaningful that the urinary quantification of a DTM metabolite (3-phenoxybenzoic acid) in children and in

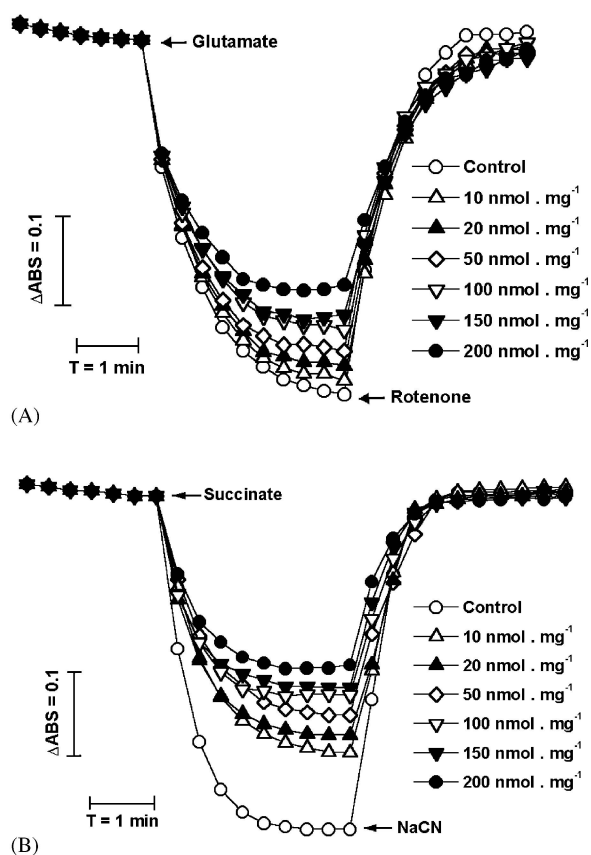


Fig. 4. Effect of deltamethrin on the amplitude and rate of swelling of liver mitochondria energized with glutamate (A) and succinate (B). Mitochondria (3.0 mg) were suspended in a medium containing 100 mM sucrose, 30 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.5 mM EDTA, 50 mM sodium acetate and DTM in the concentrations indicated in the legend in nmol mg^{-1} protein. DTM was incubated 2 min to the mitochondria before additions of the substrate. Swelling was induced by addition of 15 mM glutamate and shrinkage by $4 \mu\text{M}$ rotenone or 5 mM succinate and shrinkage by 1.7 mM NaCN, as indicated, in a final volume of 3.0 ml . The traces are representative of recordings of four experiments. Swelling is indicated by a downward and shrinkage by an upward deflection of the spectrophotometric trace.

human sprayer showed that children had high levels comparable to those found in human sprayer (Yáñez et al., 2002).

The results of the present study demonstrate that DTM is able to modify the energy-linked functions of the organelle. No effect as an uncoupler was detected, as observed by the absence of stimulation on ATPase activity (Table 2). However, the pesticide inhibited the mitochondrial respiratory parameters, namely

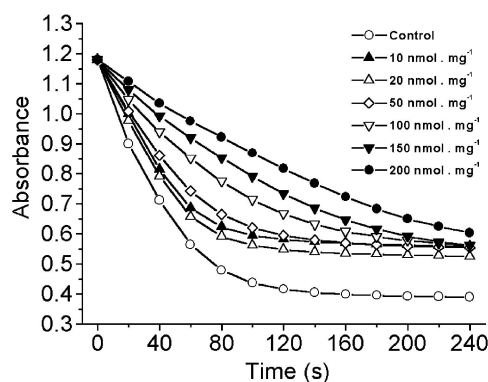


Fig. 5. Effect of deltamethrin on the amplitude and rate of valinomycin-induced swelling of liver mitochondria. Mitochondria (1.0 mg of protein) were suspended in a medium containing 135 mM KNO_3 , 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 1 μM rotenone, 0.1 mM EDTA, and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A to a final volume of 3.0 ml. DTM was incubated 2 min with the mitochondria and the reaction then initiated by addition of 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ valinomycin. DTM concentrations are as indicated. The traces are one representative of typical recordings of four independent experiments.

states III and IV (Fig. 2), as well as $\Delta\psi$ (Fig. 3). These effects are closely related with those observed on respiratory chain enzyme complexes, which were partially inhibited (Table 1). The following enzymatic complexes, namely NADH oxidase, succinate oxidase, succinate dehydrogenase, NADH cytochrome *c* reductase, and succinate cytochrome *c* reductase, had their activities decreased by the presence of DTM. Since the activities of NADH dehydrogenase and cytochrome oxidases were not affected, DTM has a major inhibition site, located between Complexes II and III. This partial inhibition of electron transport could decrease the mitochondrial energetic gain as ATP and, in addition, impose a restraint on swelling in energized mitochondria, as was observed (Fig. 4). DTM also interfered in the transit of valinomycin- K^+ (Fig. 5) under a condition independent of substrate oxidation, so that effects on the membrane could also be inferred and, in fact, was demonstrated in model DMPC and native membranes. This corroborates suggestions made by others that for some pesticides, such an effect on the membrane would contribute to the toxic action of insecticides (Antunes-Madeira et al., 1994). Present experiments, using DMPC membranes as a model and DPH or DPH-PA probes showed that DTM lowered the temperature of phase transition as well as widening it (Figs. 6 and 7). In addition, DTM (40 μM –120 μM)

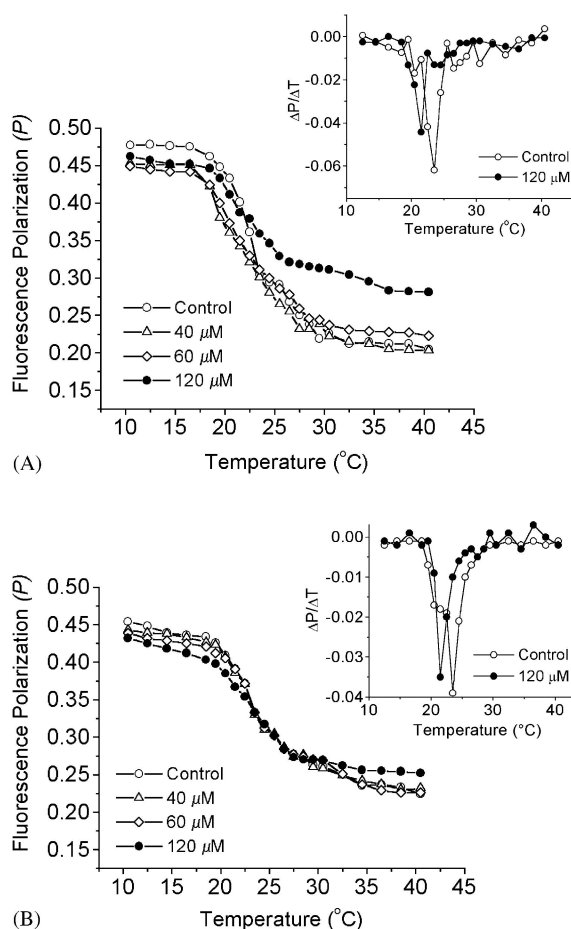


Fig. 6. Fluorescence polarization of (A) DPH and (B) DPH-PA in DMPC bilayers as a function of temperature. The experiments were carried in the absence or presence of increasing concentrations of deltamethrin (40, 60, 120 μM) as indicated. The inserts represent differential plots of the data of control and 120 μM in the main plots.

decreased the lipid order, at temperatures lower than the transition temperature and increased the lipid order at temperatures higher than the transition temperature. Above the transition temperature and at 120 μM , DTM promoted an increase in *P* values, thus far indicating an increase of the rigidity parameter, the effect being of a lower intensity for the DPH-PA probe. These effects on DMPC bilayers are somewhat different when compared to the description of Moya-Quiles et al. (1996), since they did not observe alteration in the fluid phase. However, it must be considered that their experimental conditions were different from ours. Under the present

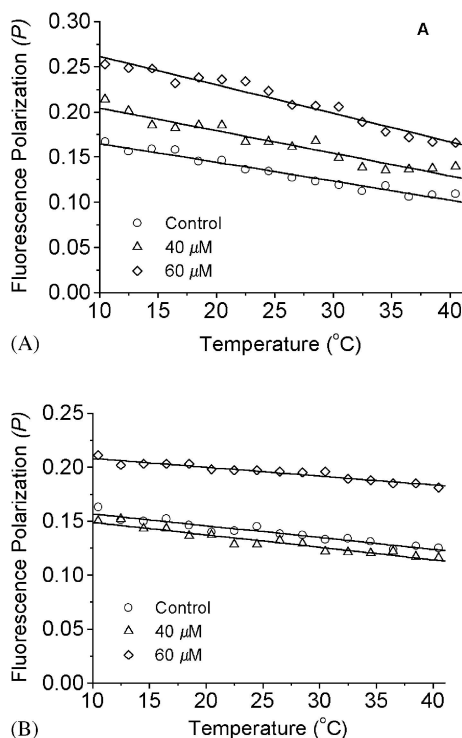


Fig. 7. Fluorescence polarization of (A) DPH and (B) DPH-PA in native mitochondrial membranes as a function of temperature. The experiments were carried out in the absence or presence of increasing concentrations of deltamethrin (40 and 60 μM) as indicated. Regression lines were calculated by means of the least-squares method. Correlation coefficients vary from 0.919 to 0.959.

conditions, DTM was incorporated after liposome preparation and incorporation of the probe, while they included DTM during the membrane preparation. Therefore, the time of membrane exposure to DTM was different; in the present research membranes were exposed for no longer than 2 h. Another factor is the different molar concentration used. However, with mitochondrial native membranes (Fig. 7), we observed that deltamethrin promoted an increase of membrane rigidity, as observed by an increase of P values. This effect is similar to that described by Moya-Quiles et al. (1996), who used egg yolk phosphatidylcholine.

The disordering effects in the fluid phase in DMPC membranes (Fig. 6) are comparable to those observed in native membranes (Fig. 7). Since the DPH-PA probe monitors the peripheral region of the membrane and DPH the core, the results suggest that incorporation of DTM preferentially affects the hydrophobic core

of membranes. This certainly is related to the chemical structure of DTM, since its two methylene groups would render it more hydrophobic and consequently lead to a higher partition in the lipid environment.

Fluidity alterations of the membrane result in modifications of the membrane functions, both as a selective barrier and as a matrix for proteins. Therefore, the alterations in the energetic metabolism, as evaluated by the respiratory parameters, could also be related with those in the membrane, induced by the insecticide. If so, the mitochondrial redox complexes would be also affected, contributing to decreased respiratory chain activity, as now observed. These effects could reduce the cellular levels of ATP and in such a case, interference in the activity of membrane ATPase would be expected, so that the ionic equilibrium would be prejudiced giving rise to cell death. In addition, the location of the pesticide near to the hydrophobic core of the lipid acyl chain, from where it would perturb the lipid order, could contribute to the effects of the pyrethroid on the membrane proteins, since it can modify the lipid environment, in which integral proteins are embedded. This indicates that in acute exposure, where DTM levels could be very high, effects on membranes such those presently described would occur. This can be inferred, since several of the neurotoxic effects following DTM exposure are due to effects on membrane channels, whose malfunctioning could be a consequence of effects on the membrane environment.

Acknowledgements

This investigation was supported by grants from CNPq and Fundação Araucária. Deltamethrin was kindly provided by Aventis CropScience Brazil Ltda, São Paulo, Brazil.

References

- Åkerman, K., Wikström, M., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191–197.
- Anadón, A., Martínez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P., 1991. Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 1–8.
- Anadón, A., Martínez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P., Fernandez, M.C., Martínez, M.A., Fernando-Cruz, M.L., 1995. Effect of flumethrin on hepatic drug metabolizing enzymes and

- antipyrene disposition in rats. *Toxicol. App. Pharmacol.* 132, 14–18.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Fernández-Cruz, M.I., Díaz, M.I., Fernández, M.C., Martínez, M.A., 1996. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. *Toxicol. App. Pharmacol.* 141, 8–16.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C., 1984. Partition of parathion in synthetic and native membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 778, 49–56.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C., 1989. Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 161–166.
- Antunes-Madeira, M.C., Videira, R.A., Madeira, V.M.C., 1994. Effects of parathion on membrane organization and its implications for the mechanisms of toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 149–154.
- Aziz, M.H., Agrawal, A.K., Adhami, V.M., Shukla, Y., Seth, P.K., 2001. Neurodevelopmental consequences of gestational exposure (GD14-GD20) to low dose deltamethrin in rats. *Neurosci. Lett.* 300, 161–165.
- Bloomquist, J.R., 1993. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol.* 1066, 301–314.
- Cadena, S.M.S.C., Carnieri, E.G.S., Echevarria, A., Oliveira, M.B.M., 2001. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. *Cell Biochem. Funct.* 19, 1–7.
- Catinot, R., Hoellinger, H., Sonnier, M., Do, C.-T., Pichon, J., Nguyen, H.N., 1989. In vitro covalent binding of the pyrethroids cismethrin, cypermethrin and deltamethrin to rat liver homogenate and microsomes. *Arch. Toxicol.* 63, 214–220.
- Chance, B., Williams, G.R., 1955. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217, 383–393.
- Chinn, K., Narahashi, T., 1986. Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* 380, 191–207.
- Crofton, K.M., Kehn, L.S., Gilbert, M.E., 1995. Vehicle and route dependent effects of a pyrethroid insecticide, deltamethrin, on motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 17, 489–495.
- Crofton, K.M., Reiter, L.W., 1987. Pyrethroid insecticides and the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor_A complex: motor activity and the acoustic startle response in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 243, 946–954.
- Ecobichon, D.J., 1995. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, fifth ed. McGraw-Hill, New York, p. 643–690.
- Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.* 10, 41–47.
- Gassner, B., Wüthrich, A., Sholtysik, G., Solioz, M., 1997. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial Complex I. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 281, 855–860.
- Ghosh, T.K., 1989. Influence of cypermethrin on the oxidative metabolism of *Labeo rohita*. *Proc. Ind. Natl. Sci. Acad. B* 55, 115–120.
- Golow, A.A., Godzi, T.A., 1994. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis* (LIN). *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 52, 351–354.
- Haya, G., 1989. Toxicity of pyrethroid insecticide to fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 381–391.
- He, F., Wang, S., Liu, L., Chen, S., Zang, Z., Sun, J., 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.* 63, 54–58.
- Hogeboom, G.H., 1955. Fractionation of cell components of animals tissues. In: Colowick, S.P., Kaplan, O.N. (Eds.), *Methods and Enzymology*, series 1. Academic Press, New York, p. 16–22.
- Husain, R., Malaviya, M., Seth, P.K., Husain, R., 1994. Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behavior in young rats. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 211–215.
- Husain, R., Husain, R., Adhami, V.M., Seth, P.K., 1996. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 515–526.
- Jain, M.K., Wu, N.M., 1977. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III phase transition in lipid bilayer. *J. Membr. Biol.* 34, 157–201.
- Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D., 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: as possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 105, 197–205.
- Knox, J.M., Tucker, S.B., Flannigan, S.A., 1984. Paresthesia from cutaneous exposure to a synthetic pyrethroid insecticide. *Arch. Dermatol.* 120, 744–746.
- Le Quesne, P.M., Maxwell, I.C., 1980. Transient facial sensory symptoms following exposure to synthetic pyrethroids: a clinical and electrophysiological assessment. *Neurotoxicology* 2, 1–11.
- Lee, C.P., Ernster, C., 1968. Studies of the energy-transfer system of submitochondrial particles. Part 2. Effects of oligomycin and aurovertin. *Eur. J. Biochem.* 3, 391–400.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Madsen, C., Claesson, M.H., Röpke, C., 1996. Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and α -cypermethrin. *Toxicology* 107, 219–227.
- Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C., Schatz, G., 1973. Cytochrome *c* oxidase from bakers yeast. Part I. Isolation and properties. *J. Biol. Chem.* 248, 1346–1354.
- Mestres, R., Mestres, G., 1992. Deltamethrin: uses and environmental safety. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* 124, 1–18.
- Michelangeli, F., Robson, M.J., Lee, A.G., 1990. The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 49–57.
- Moreno, A.J., Madeira, V.M., 1990. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 361–367.
- Moya-Quiles, M.R., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J., 1994. Interaction of the pyrethroid insecticide allethrin with liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 95–100.

- Moya-Quiles, M.R., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J., 1996. The pyrethroid insecticide deltamethrin modifies the thermotropic properties and lipid packing order of model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 83, 61–69.
- Mustafa, M.G., Utsumi, K., Packer, L., 1966. Damped and oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 117, 381–385.
- Petrescu, I., Tarba, C., 1997. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 385–394.
- Reddy, P.M., Phillip, G.H., 1992. Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, *Labeo rohita* under fenvalerate stress. *Chemosphere* 25, 843–852.
- Rickard, J., Brodie, M.E., 1985. Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroid deltamethrin with the onset of symptoms in rats. *Pest. Biochem. Physiol.* 23, 143–156.
- Sarkar, S.N., Balasubramanian, S.V., Sikdar, S.K., 1993. Effect of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta* 1147, 137–142.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295–301.
- Sepalla, A.J., Wikstrom, M.K.F., Saris, N.E.L., 1973. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: Chance, B., Pye, E.K., Ghosh, A.K., Hess, B. (Eds.), *Biological and Biochemical Oscillators*. Academic Press, New York, pp. 115–124.
- Shinitzky, M., Barenholz, Y., 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367–394.
- Singer, T.P., 1974. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. In: Glick D. (Eds.), *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 22. John Wiley, New York, p. 123.
- Soderlund, D.M., 1985. Pyrethroid-receptor interactions: stereospecific binding and effects on sodium channels in mouse brain preparations. *Neurotoxicology* 6, 35–46.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 77–96.
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171, 3–59.
- Somlo, M., 1965. Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). *Biochim. Biophys. Acta* 97, 183–201.
- Summer, J.B., 1944. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100, 413–414.
- Trotter, P.J., Storch, J., 1989. 3-[*p*-(6-Phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]-phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 131–139.
- Varsho, B.J., 1996. Acute oral toxicity study of deltamethrin in albino rats. *AgrEvo USA Company Study no. WIL-274001*.
- Voss, D.O., Campelo, A.P., Bacila, M., 1961. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48–51.
- Weickowski, M.R., Wojtczak, L., 1998. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 423, 339–342.
- Yáñez, L., Ortiz-Pérez, D., Batres, L.E., Borja-Aburto, V.H., Diaz-Barriga, F., 2002. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico. *Environ. Res. Sect. A* 88, 174–181.

ANEXO III

BRAGUINI, W. L.; DALSENTER, P. R.; VITAL, M. A. B. F.; ANDREATINI, R.; CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ROCHA, M. E. M.; OLIVEIRA, M. B. M. Low-dose deltamethrin toxicity on neurobehavior of male rats. *A ser submetido.*

Low-dose deltamethrin toxicity on neurobehavior of male rats

Wellington Luciano Braguini^{a*},
Paulo Roberto Dalsenter^b,
Maria Aparecida B. F. Vital^b,
Roberto Andreatini^b,
Silvia Maria S. C. Cadena^a
Eva G. Skare Carnieri^a
Maria Eliane M. Rocha^a
Maria Benigna M. de Oliveira^a.

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, Federal University of Paraná, Brazil.

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

C.P. 19046, C.E.P. 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail address: mbmo@ufpr.br or Fax: (55) (41) 266-2042.

Abstract

The effects of administration of deltamethrin at 1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg once daily, over 63 days (NOEL doses for teratogenic effects in rats) were investigated. On the final week of treatment the animals were evaluated in the forced swimming test and preference for intake of sucrose solution to determine their state of depression. The elevated plus-maze was employed to evaluate anxiety and the open field test was used to assess locomotor activity alteration. Under the present experimental conditions deltamethrin was not able to induce a depressive state, anxiety or altered locomotion behavior. The behavioral results suggest that this dose regimen of deltamethrin neither induced a depressive state nor altered the locomotion activity of the animals under study. However this did not exclude a role for this substance in the higher depression rate in farmers involved in its use. Thus, deltamethrin as well as chemical mixtures containing this pesticide should be further evaluated to other biochemical parameters in *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Deltamethrin, Pyrethroid, Pesticide, Depressive State, Anxiety.

1. Introduction

Synthetic pyrethroids such as deltamethrin (Fig. 1) are potent insecticides. Since they are considered to have a widely margin of safety for mammals, they are used in agriculture, veterinary and public health programs in several countries (Leahay, 1985; Aldridge, 1990). The marked possibility of exposure through environmental and occupational sources and concern over consequent hazards, particularly those of an insidious and late manifesting nature, has motivated studies on their potential pharmacological and biochemical toxicity.

Studies have revealed that the primary target site of pyrethroids in both insects and mammals is a neuronal sodium channel (Lund and Narahashi, 1983; Vijverberg and van den Bercken, 1990; Narahashi 1982).

Experimental studies on clinical symptoms of deltamethrin, have reported the affinity of the pesticide towards the central and peripheral nervous system (Ray and Cremer, 1979; Verschoyle and Aldridge, 1980; Anadon et al., 1987). Dose-dependent studies have shown that deltamethrin produces neurobehavioral symptoms such as profuse salivation, coarse body tremors, and choreoathetosis or sinuous writhing, i.e. slow twisting or writhing movement of neck and tail of the animal, in order of increasing toxicity (Gray and Rickard, 1982). Deltamethrin gives rise to behavioral stress in rats, and plays an important role in the etiology of depression (Hatotani et al., 1977; Danysz et al., 1988; Cancela et al., 1991; Albonetti and Farabollini, 1993; Biagini et al., 1993; Papp et al., 1994; Kitayama et al., 1994). Although the neurochemical basis of depression and the mechanisms responsible for neurochemical regulation by stressful stimuli are not well understood, the imbalance on regulation of some neurotransmitter systems in the brain by stress, such as an exposure to pesticides, could have an important role in the pathogenesis of depression. This follows as deltamethrin is rapidly absorbed and reaches the central and peripheral nervous system after oral administration (Rickard and Brodie, 1985; Anadón et al., 1996). Besides the brain, the liver is another target organ. A small dose- and time-dependent increase in the P450s activity was observed following acute exposure to deltamethrin and its metabolites in the brain and liver (Dayal et al., 1999). This pesticide is quickly metabolized to 4-hydroxy-deltamethrin and both the parent compound and its major metabolite are slowly eliminated from the brain indicating that deltamethrin induces neurotoxicity and this effect can be attributed in part to its metabolism and disposition (Anadón et al., 1996).

Investigations of the long-lasting effects of prenatal exposure of rats to relatively low doses of deltamethrin (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg) showed no clinical signs of pyrethroid intoxication during day 1 of pregnancy to day 21 of lactation (weaning) (Andrade et al., 2002a). Deltamethrin exposure throughout pregnancy and lactation also did not affect the mean time necessary for male rat offspring to display selected sexual development landmarks (testis descent and preputial separation) (Andrade et al., 2002a). These variables are external landmarks of sexual development in male rats and are androgen-dependent events (Dalsenter et al., 1999). Another study by Andrade et al. (2002b) indicates that technical-grade deltamethrin and formulated deltamethrin were not able to produce anti-estrogenic and anti-androgenic responses in the uterotrophic and Hershberger assays, at the dose levels tested (1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg). These results suggest that this synthetic pyrethroid does not act as an endocrine disrupter. An investigation of the long-lasting effects of prenatal exposure of dams to a nontoxic deltamethrin dose (0.08 mg/kg body weight), showed that it was not able to induce maternal toxicity, but altered emotionality, motor and dopaminergic activity systems of the offspring (Lazarini et al., 2001). Low doses of deltamethrin induced vigorous autonomic and neuroendocrine responses with increased plasma noradrenaline, adrenaline, and corticosterone levels, indicating high levels of stress (Boer et al., 1988). Tos-Luty et al. (2001) showed that deltamethrin (5 and 25 mg/kg for 28 days) caused degenerative changes in the liver and kidneys in Swiss mice, and stimulated erythropoiesis and synthesis of hemoglobin in male Swiss mice and caused a general increase in the number of leukocytes.

Environmental studies on the carp, *Cyprinus carpio*, after exposure to lethal concentrations of deltamethrin and other type II pyrethroids for a period of 72 h, showed a decrease of succinate dehydrogenase activity with a concomitant increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. These effects indicated a biochemical adaptation to overcome the toxic stress of deltamethrin (Kamalaveni et al., 2001). We have shown that deltamethrin (10 - 200 nmol \times mg⁻¹ protein) decreased the activity of

mitochondrial electron transfer complexes I, II and III, and affected other mitochondrial parameters such as $\Delta\psi$ (electric membrane potential) and mitochondrial swelling (Braguini et al., 2004). The effects on synthetic model and native mitochondrial membranes revealed that deltamethrin perturbed the membrane core and promoted concentration-dependent effects on membrane fluidity (Braguini et al., 2004).

The toxicity of deltamethrin depends on its concentrations in target organs after its distribution, metabolism, and excretion, so that relative amount of chemical that reaches a target tissue (disposition), can produce different effects on different study models. The main purpose of the present study is to investigate whether deltamethrin would alter emotional and locomotion behaviors. The forced swimming test and preference for sucrose solution intake were carried out to assess depressive state and elevated plus-maze was employed to evaluate anxiety. Given the hypothesis that the animals submitted to deltamethrin administration may exhibit a decrease in motor function, which can influence depression and anxiety parameters, an open field test was used to assess locomotor activity. The deltamethrin dose regimens were based on the NOEL (no observed effect level) for maternal toxicity of 3.3 mg/kg/day reported by the U.S. EPA (2000).

2. Materials and Methods

2.1. Ethical evaluation

The Animal Ethical Experimentation Committee of the Federal University of Paraná - Brazil, has approved the experiments described in this article, as followed by the guide of COBEA ("Colégio Brasileiro de Experimentação Animal") and "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care). All recommendations of the Brazilian national law (n° 6638, November 5, 1979) for Scientific Management of Animals were respected.

2.2. Chemicals

Deltamethrin [(*S*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl-(1*R*)-*cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate] was purchased from AventisPharma (Brazil), and was 99.2% pure. It was dissolved in canola oil prior to *in vivo* administration. Ethylene glycol-bis(β -amino-ethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), succinic acid, rotenone, NADH, and *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) were from Sigma (St Louis, MO). All other reagents, chemicals, and solvents were of the highest analytical grade.

2.3. Animal handling

Male Wistar rats weighing 300-350 g and of about 100 days old, was used. On arrival five animals were placed in each cage. To minimize stress, they were allowed to remain in the transport cage for 7 days before they were separated and housed individually in conventional polypropylene home cages (30 × 10 × 18 cm). The animals were maintained at a controlled temperature (22-24 °C), with a 12:12 L/D light schedule (lights on at 7:00 a.m.) and free access to food and water, except when the stress procedure required deprivation.

2.4. Stress procedure

The stress procedure during animal treatment (from day 1 to 63) was to expose the rats to a protocol described by Willner et al. (1987), and some stressors were included as described by Moreau et al. (1992) (e. g. restriction of water and food by 1 h

once week). Control animals were also submitted to stress procedures but deltamethrin was not administered.

2.5. *Experimental design*

The pesticide was administered daily to rats intragastrically (gavage) for 63 consecutive days. Doses were chosen on the basis of previous studies, according to preliminary ones that have been carried out in our laboratory and which are based on the NOEL (no observed effect level) for maternal toxicity of 3.3 mg/kg/day reported by the U.S. EPA (2000). Animals were divided into four equal groups that were treated as follows:

Group 1: rats were gavaged with canola oil alone in a volume (5.0 ml/kg) equivalent to that used with deltamethrin (vehicle control) and served as a control group (n = 9).

Group 2: rats were treated daily with 1 mg/kg deltamethrin (n = 9).

Group 3: rats were treated daily with 2 mg/kg deltamethrin (n = 9).

Group 4: rats were treated daily with 4 mg/kg deltamethrin (n = 9).

2.6. *Sucrose preference and body weight*

All animals were first trained to consume a palatable weak 1% sucrose solution. This consisted of an initial 48 h exposure to sucrose in place of water, followed by nine 1 h tests 1/week overall treatment (63 days). Thus, sucrose was provided, in the home cage, following 1 h food and water deprivation, the intake being measured by weighing pre-weighed bottles at the end of the test. Subsequently, sucrose consumption was measured in 1 h tests 12:00-13:00 h. The body weight of animals was measured once a week.

2.7. *Forced-swimming test*

All rats were randomly assigned to one of the treatment groups (9 animals each). Rats were plunged individually into a vertical glass cylinder (height 30 cm; diameter 15 cm) containing 15 cm of water at 25 °C. After 15 min in the cylinder, animals were removed and allowed to dry for 30 min in a heated enclosure (28 °C). One day later, the rats were plunged in the cylinder again, and immobility time, in seconds, was quantified during the following 5 min (Porsolt et al., 1977; Borsini and Meli, 1988). This experiment was carried out at the last week of treatment.

2.8. *Open-field test*

The open-field employed was constructed according to Broadhurst (1960). The testing arena was round with a diameter of 97 cm. The circular wall was 32.5 cm high and was constructed of aluminum sheeting. The arena was situated on a wood floor. The floor and the wall were painted white. The arena floor was divided into three concentric circles. The small inner circle had a diameter of 23 cm; the second circle of 61 cm with the arena wall defining the outer circle. Each circle was divided into essentially equal-size areas. The number of areas in the inner circle, middle and outer circles was 1, 6 and 12, respectively. A 100-W ceiling light was situated 48 cm above the arena floor. Cheesecloth was draped from the ceiling and dropped outside the arena wall. The cloth served to diffuse the light and functioned as a one-way screen. Rats were observed individually for 5 min and the different groups were inter-mixed; observations started at 8.00 a.m. and animals were tested in the same order every day. Hand-operated counters were used to score locomotion frequency (number of floor units entered), rearing

frequency (number of times the animals stood on their hind legs) and immobility time (number of seconds of lack of movement during testing). The apparatus was washed with a 5% aqueous ethanol before behavioral testing to eliminate any possible bias due to odors left by previous rats.

2.9. Elevated plus-maze

The elevated plus-maze consisted of wood and of two opposite open arms, 50 × 10 cm (surrounded by a 1 cm high Plexiglas ledge) and two enclosed arms, 50 × 10 × 40 cm, elevated to a height of 50 cm above the floor. The junction area of the four arms (central platform) measured 10 × 10 cm. The floor of the maze was painted with impermeable dark epoxy resin, in order to avoid urine impregnation.

The experiments were carried out in a room with low (40-watt) illumination (measured on the central platform). After each trial, the maze was cleaned with 5% aqueous ethanol. In the sessions, the analyzed parameters of frequency of open and enclosed arm entries and the time spent by the rats on the central platform open and enclosed arms. This experiment was carried out at the last week of treatment after the open-field study.

2.10. Statistical analysis

The data were analyzed by 2-way ANOVA followed by Newman Keuls' post hoc test using software Statistica 5.5 (StatSoft, Inc.). Sucrose intake and body weight: ANOVA for repeated measurement was performed with each group as independent factor and time as repeated measure. Significance was accepted at $p < 0.05$. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was employed.

3. Results and Discussion

Deltamethrin (1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg) and stress exposure did not produce a significant alteration in sucrose preference between groups (Table I).

Figure 2 shows the body weight profiles of the control- and deltamethrin-treated groups during the 63 days of treatment expressed as values of weight change in relation to the first week of treatment. Final weights of animals were calculated as the mean of each week and were compared with those between the weeks. Results of the analysis indicated no effect of treatment with deltamethrin and stress exposure [$F_{(3,28)} = 0.13$; $p < 0.943$].

In the forced swimming test (Fig. 3), no differences in the immobility time was observed between the control and treated animals [$F_{(3,33)} = 0.7897$; $p < 0.5027$].

The results of the open-field behavior studies are illustrated in Figure 4A-C. The data showed no differences in locomotion [$F_{(3,33)} = 0.8422$; $p < 0.4806$] (Fig. 4A), rearing [$F_{(3,33)} = 2.047$; $p < 0.1263$] (Fig. 4B), and duration of immobility [$F_{(3,33)} = 0.8047$; $p < 0.5003$] (Fig. 4C) between groups.

Data illustrated in Table II represent the behavioral profile of rats submitted to the elevated plus-maze after deltamethrin treatment. Deltamethrin administration did not change the performance of treated animals in the elevated plus-maze compared to control, revealing no significant effect of deltamethrin/stress exposure × arm interaction [closed entries - $F_{(3,33)} = 0.7138$; $p < 0.5508$; percent of entries into open arms - $F_{(3,33)} = 1.0632$; $p < 0.3779$; percent of time in the open arms - $F_{(3,33)} = 1.5889$; $p < 0.2107$; Table II].

The lipophilicity of pyrethroids favors absorption in the gastrointestinal and respiratory tracts and also confers their preferential distribution into lipid-rich internal tissues, including body fat and elements of the central and peripheral nervous system

(Soderlund et al., 2002). Liver is also a target since it is the main site for drug detoxification.

Behavioral parameters analyzed in the open-field, plus-maze apparatuses and forced swimming test, were not affected by treatment with our deltamethrin doses, which were NOEL for maternal toxicity (U.S. EPA, 2000).

When animals are introduced into an open-field, they are inclined to mainly explore the peripheral zone of the apparatus, i. e., they show a so-called thigmotaxis (Grossen and Kelley, 1973; Simon et al., 1994). Thus, the anxiety level is operationally related as the response to a situation in which behavior is influenced by two opposing motivational forces (e.g. a natural curiosity to investigate unexplored or novel areas versus an aversion to open areas) (Palermo-Neto and Guimarães, 2000; File, 1991; Pellow et al., 1985).

Locomotion frequency, measured in open-field, has been used as an index of both arousal (Iviniskis, 1970; Kelley, 1993) and emotionality (Walsh and Cummins, 1976), with a decrease or absence of movements within the apparatus usually indicating a reduction of motor activity. Deltamethrin treated animals did not show differences compared with control animals. Thus, the lack of effects of deltamethrin on open-field behavior showed that it, in doses of 4 mg/kg or lower, administered for a long period (63 days), is unable to produce impairment of motor activity. This is in agreement with the number of entries into the closed arm and the elevated plus-maze, a parameter related to locomotor activity. No increase on emotionality and/or stress, which are known to decrease exploratory behavior, was observed in the experimental conditions used. According to our results, deltamethrin (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg/day for 63 days) do not have anxiogenic effects. Boer et al. (1988) indicated that deltamethrin exposure should be considered a stressful situation because the physiological and neurochemical changes induced by this group of pesticides are very similar to those observed in stress. However, the doses now administered were not able to produce such alterations, and so a possibility that cannot be ruled out is that rats repeatedly exposed to the same stress acquire habituation or adaptation to the stress. Such an adaptation was observed in tests of locomotion activity (Kennett et al., 1985).

Another model used to detect anxiolytic activity of deltamethrin is the elevated plus-maze test. Anxiogenic compounds promote increased aversion to the open arms due to increased fear or anxiety (Pellow et al., 1985; Pellow and File, 1986). In this test, the passage of the animal into the open arms is associated with elevated plasma corticosterone concentrations, increased freezing, and production of fecal boli, hormonal and behavioral changes that are indications of increased anxiety. Normal exploratory behavior is in favor of the closed arms, and this tendency to stay in the closed aspects of the maze can be enhanced by compounds that increase the aversion towards the anxiety-provoking open arms, i.e., anxiogenics. The critical determinants considered to be correlated with anxiety are the entries made into the open arms and the time spent in these arms. Increments in the number of entries or in the time spent by animals in plus-maze open arm exploration are commonly taken as indications of the presence of decreased levels of anxiety (Pellow et al., 1985; File, 1991). We did not now observe any significant alterations in rat behavior in this apparatus. Our data also showed that deltamethrin (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg/day for 63 days) did not modify the time spent by rats in plus-maze open arm exploration compared with control animals. Reductions of locomotion in open-field central zones (Kelley, 1993) and/or in plus-maze open arm exploration (Comissaris, 1993; File, 1991; Pellow et al., 1985) are good indices of both stress response and/or anxiety levels. Thus, it can be suggested that

deltamethrin (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg/day for 63 days) did not have an anxiogenic-like effect in rats at these doses.

In the forced swimming test, when rats are forced to swim in a restricted space, they will rapidly cease apparent attempts to escape and adopt a characteristic posture, which have termed "immobility" (Porsolt et al., 1979). The immobility time has been referred to as "behavioral despair", which might be considered as an acute depressive reaction in response to inescapable swimming (Porsolt et al., 1978; Porsolt et al., 1979). Such forced swimming is an inescapable stressful situation causing a relatively short escape reaction followed by floating without performing any activity. Thus, animals submitted to this test might show high emotionality levels, which may cause the reduced latency to float (Lazarini et al., 2001). We now observed that deltamethrin (1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg/day for 63 days) does not modify the emotionality levels observed in relation to control animals, as indicated by the exposure to adult male rats exposure to deltamethrin, which did not show a behavioral deficit in immobility time.

Some studies using stress procedures as animal models of depression and anhedonia have raised the possibility that decreases in reward responsiveness, or changes in intake of sweet solutions, may be related to loss of body weight (Forbes et al., 1996; Harris et al., 1997; Mathews et al., 1995). A stress-induced decrease in sucrose preference varies between and/or within experiments among laboratories, depending on the animal strain, according to a specific procedure (Moreau, 1997). If this stress procedure did not cause depressive behavior of animals, and changes in sucrose preference is an indicator of depression, then it is reasonable to assume that the absence of effects on sucrose preference correlates with the absence of changes in animals behavior. We found that sucrose preference and body weight remained unaffected by deltamethrin 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg/day for 63 days in relation to control animals.

Our net results on forced swimming test and sucrose preference suggest that this dose regimen of deltamethrin did not induce a depressive state. However, this did not exclude a role for this substance in the higher depressor rate in exposed farmers since additional factors can be involved such as the genetic vulnerability, major stressful events, longer exposure, higher doses and association with other substances.

In conclusion, the data suggest that our doses of deltamethrin did not induce neurobehavioral effects in rats. However, deltamethrin cannot be classified as a safe substance since alterations of hepatic metabolism were detected (Braguini et al., 2004), which were traduced by alterations on energy metabolism. Foods that are considered safety for consumption frequently contain residues of deltamethrin higher than those permitted: concerns about its effects are therefore important. Thus, synthetic pyrethroids as well as chemical containing these pesticides should be further examined for their biochemical parameters *in vitro* and *in vivo*. Standard toxicity studies that are limited to behavioral evaluations using low doses may be insufficient to reveal long-term effects. For this reason the investigation of a sufficient number of well-validated endpoints is necessary to characterize substances having potential to interfere with biochemical functions. In addition, deltamethrin is widely used in the control of a broad range of ectoparasites in food-producing animals; thus, our data might raise concerns about the possible effects of deltamethrin residues in food. Thus, although deltamethrin produced no behavioral effects at the tested doses, alterations on mitochondrial metabolism might be relevant to the toxicity of this synthetic pyrethroid insecticide.

Acknowledgments

This investigation was supported by grants from CNPq and Fundação Araucária. Deltamethrin was kindly provided by Aventis CropScience Brazil Ltda, São Paulo, Brazil.

References

- Albonetti, M. E., Farabollini, F., 1993. Effects of single and repeated restraint on the social behavior of male rats. *Physiol. Beh.* 53, 937-942.
- Aldridge, W.N., 1990. An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 89-104.
- Anadón, A., Maritnez-Larranaga, M. R., Fernandiz-Cruz, M. L., Diaz, M. J., Fernandiz, M. C., Martinez, M. A., 1996. Toxicokinetics of deltamethrin and 4'-HO-metabolite in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 8-16.
- Anadón, A., Martinez-Larranaga, M. R., Diaz, M. J., 1987. Changes in neuromuscular transmission of guinea pig vas deferens produced by decamethrin treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90, 96-102.
- Andrade, A. J. M., Araújo, S., Santana, G. M., Ohi, M., Dalsenter, P. R., 2002a. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 36, 310-317.
- Andrade, A. J. M., Araújo, S., Santana, G. M., Ohi, M., Dalsenter, P. R., 2002b. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 35, 379-382.
- Biagini, G., Pich, E. M., Carani, C., Marrama, P., Gustafsson, J. Å., Fuxe, K., Agnati, L. F., 1993. Indol-pyruvic acid, a tryptophan ketoanalogue, antagonizes the endocrine but not the behavioral effects of repeated stress in a model of depression. *Biol. Psychiatry* 33, 712-719.
- Boer, S. F., Gugten, J. L., Slagen, J. I., Hijzen, T. H., 1988. Changes in plasma corticosterone and catecholamine contents induced by low doses of deltamethrin in rats. *Toxicol.* 49, 263-270.
- Borsini, F., Meli, A., 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacol.* 94, 147-160.
- Braguini, W. L., Cadena, S. M. S. C., Carnieri, E. G. S., Rocha, M. E. M., Oliveira, M. B. M., 2004. Effects of deltamethrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. *Toxicol. Lett.* 152, 191-202.
- Broadhurst, P. L., 1960. Experiments in psychogenetics, in: Eisenk, H. J. (Ed.), *Experiments in Personality*. Routledge & Kegan Paul, London, pp. 31-71.
- Cancela, L. M., Rossi, S., Molina, V. A., 1991. Effect of different restraint schedules on the immobility in the forced swim test: modulation by an opiate mechanism. *Brain Res. Bull.* 26, 671-675.
- Chance, B., Williams, G. R., 1955. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217, 383-393.
- Comissaris, R. L., 1993. Conflict behaviours as animal models for the study of anxiety, in: van Hareen, W. (Ed.), *Methods in Behaviour Pharmacology*. Elsevier Science Publisher, New York, pp. 442-474.
- Dalsenter, P. R., Dallegrave, E., Mello, J. R. B., Langeloh, A., Oliveira, R. T., and Faqui, A. S., 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 583-589.
- Danysz, W., Plaznik, A., Kostowski, W.; Malatynska, E.; Jarbe, T. U.; Hiltunen, A. J.; Archer, T., 1988. Comparison of desipramine, amitriptyline, zimelidine and

- alaproclate in six animal models used to investigate antidepressant drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 62, 42-50.
- Dayal, M., Parmar, D., Dhawan, A., Dwivedi, U. N., Doehmer, J., Seth, P. K., 1999. Induction of rat brain cytochrome P450s 1A1/1A2 and 2B1/2B2 isoenzymes by deltamethrin. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 7, 169-178.
- File, S. E., 1991. Interactions of anxiolytic and antidepressant drugs with hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In: Simon, P., Sourbrie, P., Wildoher, P. (Eds), *Psychopharmacology of Anxiolytics and Antidepressant*. Pergamon, New York, pp. 29-55.
- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Mathews, K., Reid, I. C., 1996. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol. Behav.* 60, 1481-1484.
- Gray, A. J., Rickard, J., 1982. The toxicokinetics of deltamethrin in rats after intravenous administration of a toxic dose. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18, 205.
- Grossen, N. E., Kelley, M. J., 1973. Specific-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rat. *J. Comp. Psychol.* 81, 307-310.
- Harris, R. B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., Ryan, D. H., 1997. Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav.* 63, 91-100.
- Hatotani, N., Nomura, J., Yamaguchi, T., Kitayama, I., 1977. Clinical and experimental studies on the pathogenesis of depression. *Psychoneuroendocrinol.* 2, 115-130.
- Hodgson, E., Levi, P. E., 1994. *Introduction to Biochemical Toxicology*. Appleton & Lange, Connecticut.
- Iviniskis, A., 1970. A study of validity of open-field measures. *Australian J. Physiol.* 22, 175-183.
- Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D., 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 105, 197-205.
- Kamalaveni, K., Gopal, V., Sampson, U., Aruna, D., 2001. Effect of pyrethroids on carbohydrate metabolic pathways in common carp, *Cyprinus carpio*. *Pest Management Sci.* 57, 1151-1154.
- Kelley, A. E., 1993. Locomotor activity and exploration. In: Naaren, F. (Ed.), *Methods in Behavioral Pharmacology*. Elsevier, New York, pp. 499-516.
- Kennett, G. A., Dickinson, S. L., Curzon, G., 1985. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res.* 330, 253-263.
- Kitayama, I., Nakamura, S., Yaga, T., Murase, S., Nomura, J., Kayakara, T., Nakao, K., 1994. Degeneration of locus coeruleus axons in stress-induced depression model. *Brain Res. Bull.* 35, 573-580.
- Lazarini, C. A., Florio, J. C., Lemonica, I. P., Bernardi, M. M., 2001. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 665-673.
- Leahay, J.P., 1985. *The Pyrethroid Insecticides*. Taylor and Francis, London, UK.
- Lister, R. G., 1987. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacol.* 92, 180-185.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lund, A.E., Narahashi, T., 1983. Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20, 203-216.

- Mathews, K., Forbes, N., Reid, I. C., 1995. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiol. Behav.* 57, 241-248.
- Moreau, J. L., 1997. Reliable monitoring of hedonic deficits in the chronic mild stress model of depression. *Psychopharmacol.* 134, 357-358.
- Moreau, J. L., Jenck, F., Martin, J. R., Mortas, P., Haefely, W. E., 1992. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2, 43-49.
- Narahashi, T., 1982. Cellular and molecular mechanisms of action of insecticides: neuro-physiological approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 753-758.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2002. Respiratory chains, in: Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. (Eds.), *Bioenergetics 3*. Academic Press, London, pp. 89-154.
- Palermo-Neto, J., Guimarães, R., 2000. Pavlovian conditioning of a lung anaphilatic response. *Life Sci.* 68, 611-623.
- Papp, M., Klimek, V., Willner, P., 1994. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacol.* 115, 441-446.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M., 1985. Validation of open-closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14, 149-167.
- Pellow, S., File, S. E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525-529.
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blave, N., Jalfre, M., 1978. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379-391.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Blavet, M., Deniel, M., Jalfre, M., 1979. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamines and serotonin activity. *Eur. J. Pharmacol.* 57, 201-210.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Ray, D. E., Cremer, J. E., 1979. The action of deltamethrin (a synthetic pyrethroid) on the rat. *Pesticide Biochem. Physiol.* 10, 333-340.
- Rickard, J., Brodie, M. E., 1985. Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroid deltamethrin with the onset of symptoms in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23, 143-156.
- Simon, P., Duputis, R., Costentin, J., 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice influence of dopaminergic transmission. *Behav. Brain Res.* 61, 59-64.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., Weiner, M. L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicol.* 171, 3-59.
- Szewczyk A., 1998. The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function. *Mol. Membr. Biol.* 15, 49-58.
- Tos-Luty, S., Haratym-Maj, A., Latuszynska, J., Obuchowska-Przebirowska, D., Tokarska-Rodak, M., 2001. Oral toxicity of deltamethrin and fenvalerate in Swiss mice. *Ann. Agr. Environ. Med.*, 8, 245-254.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2000. Notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for certain pesticide chemicals in or on food. *Federal Register Document* 65, 8143-8149.
- Verschoye, R. D., Aldridge, W. N., 1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.* 45, 325-329.

- Vijverberg, H. P. M., van den Bercken, J., 1990. Neurotoxicological effects and mode of action of pyrethroid insecticides. *CRC Rev. Toxicol.* 21, 105-126.
- Voss, D. O., Campelo, A. P., Bacila, M., 1961. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48-51.
- Walsh, R. N.; Cummins, R. A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 3, 482-504.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Muscat, R., Sophokleous, S., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacol.* 93, 358-364.

Fig. 1. Chemical structure of deltamethrin.

Fig. 2. Effects of chronic deltamethrin administration on body weight of rats. Data are reported as means, with a number of animals used per group = 9. Possible effects were calculated to a significant level ($p < 0.05$) vs. control vehicle-treated group. All animals were weighed at one-week intervals during treatment (63 days).

Table I

Effects of chronic deltamethrin administration on sucrose preference (%).

Note. Data represent means \pm S.D. of each group per week with number of animals used per group = 9. One-hour tests 1/week during entire treatment (63 days) following 1 h food and water deprivation were carried out.

Fig. 3. Effect of chronic deltamethrin administration on the immobility time in the forced swimming test in rats. The experiment was carried out at the final week of treatment. Data are reported as means \pm S.E.M. Number of animals used per group = 9. Possible effects were calculated to a significant level ($p < 0.05$) vs. control vehicle-treated group.

Fig. 4. Effects of chronic deltamethrin administration on locomotion (A), and rearing frequencies (B), and the immobility time (C) of male rats observed in an open field. The experiment was carried out at final week of treatment. Data are reported as means \pm S.E.M., with number of animals used per group = 9. Possible effects were calculated to significant level ($p < 0.05$) vs. control vehicle-treated group.

Table II

Effects of deltamethrin on elevated plus-maze parameters in rats.

Note. Elevated plus-maze parameters were evaluated in rats repeatedly treated with deltamethrin (1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg) or a control vehicle-treated group (control). Number of animals used per group = 9. The experiment was carried out at final week of treatment after open-field study. Values are mean \pm S.E.M., calculated to significant level ($p < 0.05$) vs. control vehicle-treated group.

FIGURE 1

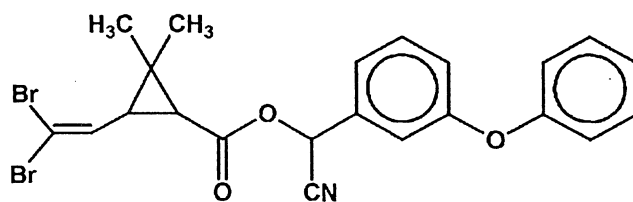


FIGURE 2

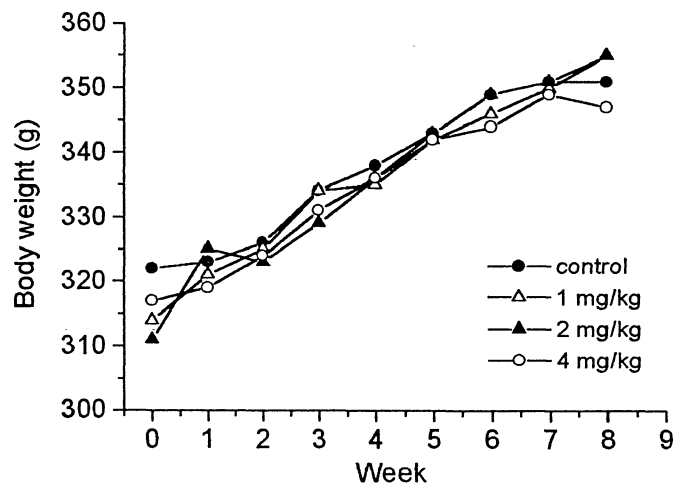


FIGURE 3

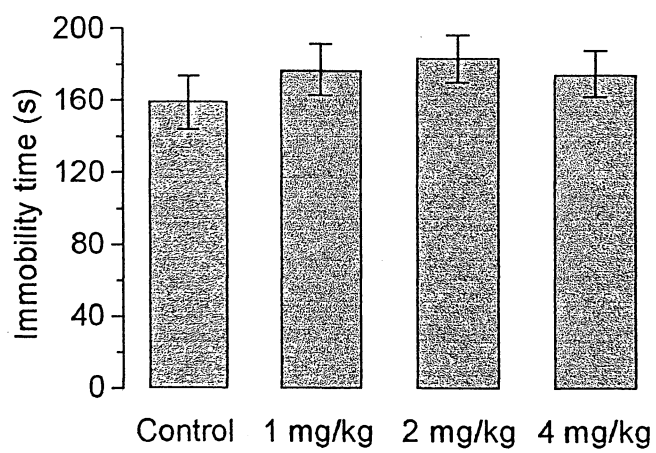


FIGURE 4 A

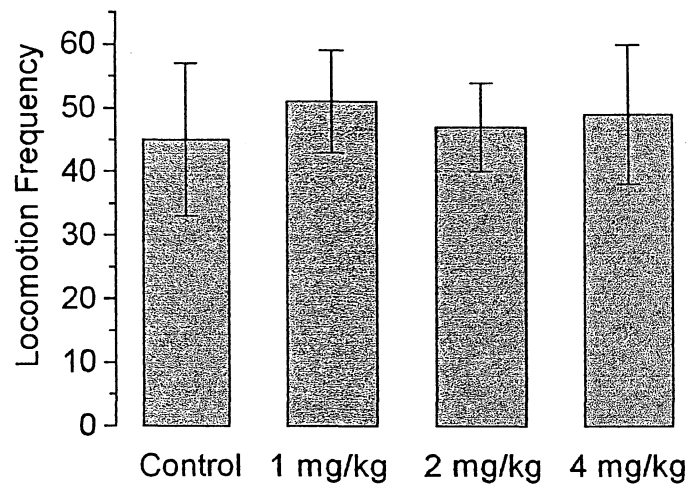


FIGURE 4 B

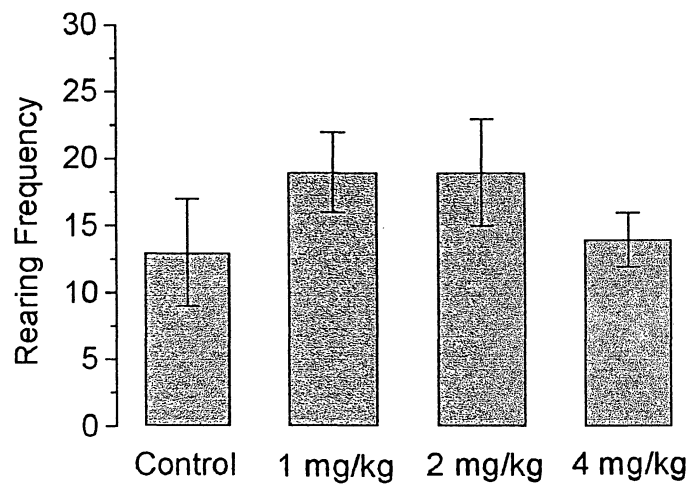


FIGURE 4 C

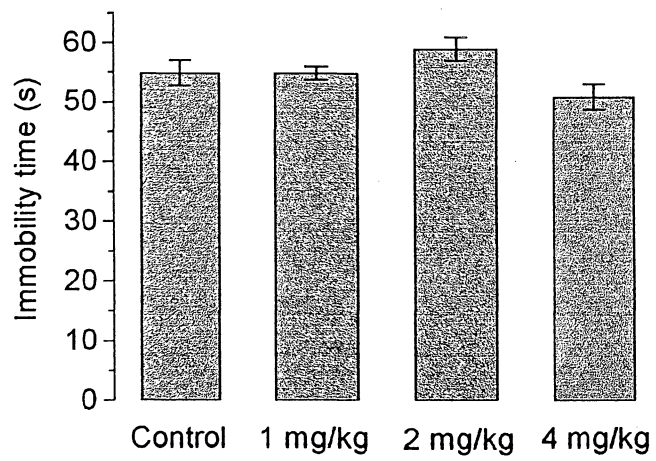


TABLE I

Group	Week								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	73.1 ± 12.7	79.7 ± 7.7	71.9 ± 8.8	69.7 ± 14.0	77.5 ± 14.4	78.6 ± 13.0	76.9 ± 12.9	79.2 ± 12.1	70.5 ± 8.7
1.0 mg/kg	74.8 ± 12.1	77.2 ± 12.7	72.5 ± 8.5	63.5 ± 7.0	78.2 ± 9.1	70.3 ± 16.8	82.1 ± 13.8	70.2 ± 6.9	82.2 ± 3.5
2.0 mg/kg	77.8 ± 10.6	85.3 ± 16.7	72.1 ± 13.3	75.4 ± 11.2	84.9 ± 7.0	86.8 ± 16.0	79.9 ± 6.4	77.9 ± 13.0	73.6 ± 17.2
4.0 mg/kg	76.5 ± 13.4	73.5 ± 11.4	67.8 ± 10.0	67.3 ± 7.8	84.9 ± 9.3	70.3 ± 6.0	80.9 ± 7.8	83.4 ± 12.5	67.4 ± 5.8

TABLE II

Parameters	Groups			
	Control	Deltamethrin (mg/kg)		
		1.0 mg/kg	2.0 mg/kg	4.0 mg/kg
Number of entries into the closed arm	4.2 ± 1.1	4.2 ± 0.8	5.3 ± 0.9	6.2 ± 1.5
Percentage of entries into the open arms	18.9 ± 7.3	35.5 ± 6.9	11.4 ± 5.2	23.1 ± 7.2
Percentage of time spent in the open arms	28.3 ± 3.4	23.7 ± 8.2	23.3 ± 7.5	31.9 ± 8.1

ANEXO IV

BRAGUINI, W. L.; CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ROCHA, M. E. M.; OLIVEIRA, M. B. M. Further studies on Deltamethrin: Effects on mitochondrial permeability transition. *Manuscrito em preparação.*