

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

**ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS DE
PESTICIDAS EM PEIXES NATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis

Curitiba
2009

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as dádivas.

Ao meu filho Bertran, ao meu marido Robson e à minha mãe Reny, pelo amor, pela força, por sempre acreditarem em mim e serem meu porto seguro. AMO VOCÊS!

Aos amigos que fiz durante minha permanência no departamento de Farmacologia, obrigada pelas conversas, pela ajuda e pela força sempre: Camila, Zaíra, Pamela, Scheila, Mariza, Adriana, Yara, Yanna, Juliane, Aedra, Lucélia, Diego, Manuela, Sandra e Amanda. UM GRANDE ABRAÇO EM TODOS VOCÊS!

À Alessandra Lemes, que foi minha companheira de trabalho e amiga, muito obrigada por todo carinho.

À Silvia Nardi Cordazzo Genari, por auxiliar no preparo dos reagentes e por ser minha amiga tão querida e sempre presente.

À Prof^ª. Dr^ª. Helena Cristina da Silva de Assis por me acolher em seu laboratório e ter dedicado seu tempo em me orientar.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia por seus ensinamentos e por todo carinho.

Aos estagiários, Flávio e Raquel, agradeço a grande ajuda nos experimentos.

Aos animais que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, muito obrigada por ter aberto o seu laboratório para a realização de parte de minha dissertação, pelas sugestões e grande ajuda.

Ao Francisco, Chico, obrigada por todas as sugestões, explicações, enfim toda a ajuda.

Ao Daniel Bussolaro, sem o qual eu não teria conseguido fazer os experimentos *in vitro*, obrigada por me ajudar em todas as etapas, obrigada pela paciência e por todo tempo dispensado, inclusive em fins de semana e à noite.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 1 – CARBAMATOS E ORGANOFOSFORADOS | 1 |
| 1.1 – Sevin® (carbaril)..... | 2 |
| 1.2 – Folisuper 600® (Paration metílico)..... | 3 |
| 2 – PIRETRÓIDES | 4 |
| 2.1 – Decis® (Deltametrina)..... | 5 |
| 3– BIOMARCADORES | 6 |
| 3.1– Neurotoxicidade..... | 7 |
| 3.1.1– Atividade da Acetilcolinesterase..... | 7 |
| 3.2 - Estresse oxidativo e Biotransformação..... | 9 |
| 3.2.1 – Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)..... | 11 |
| 3.2.2 – Atividade da Catalase..... | 11 |
| 3.2.3 – Lipoperoxidação | 12 |
| 3.3– Genotoxicidade..... | 13 |
| 3.3.1 - Teste do Micronúcleo..... | 14 |
| CAPÍTULO I: DETECÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DE TRÊS | |
| DIFERENTES PESTICIDAS EM <i>Corydoras sp.</i> UTILIZANDO | |
| BIOMARCADORES | 16 |
| 1 - INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 – OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 – OBJETIVO GERAL..... | 19 |
| 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 3– MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 – OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS..... | 20 |
| 3.2 – DESENHO EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 3.3 – ANÁLISES DOS BIOMARCADORES..... | 21 |
| 3.3.1 – Processamento do material | 21 |
| 3.3.2– Atividade da Acetilcolinesterase..... | 21 |
| 3.3.3 - Atividade da Glutathione S-Transferase..... | 22 |
| 3.3.4 - Atividade da Catalase..... | 22 |
| 3.3.5 - Lipoperoxidação..... | 22 |
| 3.3.6- Análise da Concentração de Proteína..... | 23 |
| 3.3.7 - Teste Do Micronúcleo Pisceo..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 23 |
| 4 – RESULTADOS..... | 24 |
| 4.1 – EXPERIMENTO SEVIN® | 24 |
| 4.2 – EXPERIMENTO FOLISUPER 600® | 27 |
| 4.3 – EXPERIMENTO DECIS® | 30 |
| 5 – DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 38 |
| CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SEVIN®, FOLISUPER 600® E DECIS® EM HEPATÓCITOS DE <i>Hypostomus commersoni</i>..... | 39 |
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 40 |
| 2 – OBJETIVOS..... | 42 |
| 2.1 – OBJETIVO GERAL..... | 42 |
| 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 42 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS..... | 42 |
| 3.1 – OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS PEIXES..... | 42 |
| 3.2 – ISOLAMENTO DAS CÉLULAS..... | 42 |
| 3.3 – CONDIÇÕES PARA O CULTIVO CELULAR..... | 43 |
| 3.4 - RENDIMENTO DO ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR..... | 43 |
| 3.5 - PRÉ-TRATAMENTO PARA MELHORAR A ADESÃO CELULAR..... | 43 |
| 3.6 - DESENHO EXPERIMENTAL..... | 43 |
| 3.7 – ANÁLISES DOS BIOMARCADORES..... | 44 |
| 3.7.1 – Atividade da Glutathione S-transferase..... | 44 |
| 3.7.2 – Atividade da Catalase..... | 44 |
| 3.7.3 – Lipoperoxidação..... | 45 |
| 3.7.4 – Análise da concentração de proteína..... | 45 |
| 3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 45 |
| 4 – RESULTADOS..... | 46 |
| 4.1 – RENDIMENTO DO ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR..... | 46 |
| 4.2 – MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS EM CULTURA..... | 46 |
| 4.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E DA GLUTATIONA S- TRANSFERASE E LIPOPEROXIDAÇÃO..... | 47 |
| 5 – DISCUSSÃO..... | 50 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 01 | Fórmula estrutural do carbaril..... | 3 |
| Figura 02 | Fórmula estrutural do paration metílico..... | 3 |
| Figura 03 | Fórmula estrutural da deltametrina..... | 5 |
| Figura 04 | Síntese e degradação da acetilcolina | 8 |
| Figura 05 | Exemplar de <i>Corydoras sp.</i> | 18 |
| Figura 06 | Atividade da acetilcolinesterase muscular de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Sevin [®] (Carbaril) por 96 horas. | 24 |
| Figura 07 | Atividade da acetilcolinesterase cerebral de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Sevin [®] (Carbaril) por 96 horas. | 25 |
| Figura 08 | Atividade da Glutathione S-transferase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Sevin [®] (Carbaril) por 96 horas. | 25 |
| Figura 09 | Atividade da catalase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Sevin [®] (Carbaril) por 96 horas | 26 |
| Figura 10 | Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos em <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Sevin [®] (Carbaril) por 96 horas. | 26 |
| Figura 11 | Atividade da acetilcolinesterase muscular de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Folisuper 600 [®] (Paration metílico) por 96 horas. | 27 |
| Figura 12 | Atividade da acetilcolinesterase cerebral de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Folisuper 600 [®] (Paration metílico) por 96 horas. | 28 |
| Figura 13 | Atividade da glutathione S-transferase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Folisuper 600 [®] (Paration metílico) por 96 horas. | 28 |
| Figura 14 | Atividade da catalase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Folisuper 600 [®] (Paration metílico) por 96 horas. | 29 |
| Figura 15 | Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Folisuper 600 [®] (Paration metílico) por 96 horas. | 29 |
| Figura 16 | Atividade da acetilcolinesterase muscular de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Decis [®] (Deltametrina) por 96 horas. | 30 |
| Figura 17 | Atividade da acetilcolinesterase cerebral de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Decis [®] (Deltametrina) por 96 horas. | 30 |
| Figura 18 | Atividade da glutathione S-transferase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Decis [®] (Deltametrina) por 96 horas. | 31 |
| Figura 19 | Atividade da catalase de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Decis [®] (Deltametrina) por 96 horas. | 31 |
| Figura 20 | Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de <i>Corydoras sp.</i> expostos ao Decis [®] (Deltametrina) por 96 horas..... | 32 |

Capítulo II

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 01 | Exemplar de <i>Hypostomus commersoni</i> - cascudo..... | 41 |
| Figura 02 | Viabilidade celular estimada através do ensaio de exclusão com azul de tripan..... | 46 |
| Figura 03 | Morfologia de hepatócitos em cultura..... | 47 |
| Figura 04 | Atividade da Catalase de hepatócitos de <i>Hypostomus commersoni</i> | 48 |
| Figura 05 | Atividade da Glutathione S-transferase de hepatócitos de <i>Hypostomus commersoni</i> | 48 |
| Figura 06 | Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de hepatócitos de <i>Hypostomus commersoni</i> | 49 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 01 | Determinação das concentrações subletais dos pesticidas Sevin [®] , Folisuper 600 [®] e Decis [®] | 25 |
|-----------|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| % | por cento |
| ϵ | coeficiente de extinção da reação |
| °C | graus Celsius |
| μg | microgramas |
| μL | microlitros |
| ACh | acetilcolina |
| AChE | acetilcolinesterase |
| ATC | acetiltiocolina |
| BChE | butirilcolinesterase |
| CAT | catalase |
| Ca^{2+} | cálcio |
| CDNB | 1-cloro -2,4 dinitrobenzeno |
| Cl_{50} | concentração letal em 50% dos animais |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DTNB | 5,5 – Ditio-bis-2-nitrobenzoato |
| DL_{50} | dose letal em 50% dos animais |
| GSH | glutationa reduzida |
| GST | glutationa S-transferase |
| h | hora |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta pressão |
| L | litros |
| M | molar |
| Mg^{2+} | magnésio |
| mg.L^{-1} | miligrama por litro |
| min | minutos |
| mL | mililitros |
| μM | microMolar |
| n | número de animais por grupo |
| nM | nanoMolar |
| Na^+ | Sódio |
| nm | Nanômetros |
| OF | organofosforado |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| PCBs | bifenis policlorados |
| ppm | partes por milhão (mg.L^{-1}) |
| P=S | fósforo=enxofre |
| ® | marca registrada |
| SNC | Sistema Nervoso Central |

RESUMO

Os pesticidas organofosforados, carbamatos e piretróides estão sendo utilizados em substituição aos organoclorados, por não serem tão persistentes no ambiente. No entanto, ao atingir corpos d'água causam intoxicação cujos efeitos prévios podem ser detectados através dos biomarcadores. Este trabalho objetivou: avaliar o efeito de concentrações subletais de Sevin[®] (carbamato), Folisuper 600[®] (organofosforado) e Decis[®] (piretróide) em *Corydoras sp.* através dos biomarcadores acetilcolinesterase (AChE), glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT) e lipoperoxidação (LPO) e, também verificar o efeito destes pesticidas em hepatócitos de *Hypostomus commersoni* através da atividade da CAT e GST e também da LPO. Para o ensaio *in vivo* os peixes foram distribuídos em grupos controle e teste, sendo expostos por 96 horas às concentrações 7,2 e 14,4 mg.L⁻¹ de Sevin[®]; 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de Folisuper 600[®] e 0,05 e 0,1 µg.L⁻¹ de Decis[®]. A AChE foi analisada no cérebro e músculo e a CAT, GST e LPO no fígado. No ensaio *in vitro*, hepatócitos foram isolados, cultivados por três dias e expostos aos pesticidas (Sevin[®] I = 20 µM, Sevin[®] II = 200 µM, Folisuper 600[®] I = 5 µM, Folisuper 600[®] II = 50 µM, Decis[®] I = 10 nM, Decis[®] II = 100 nM) por 96 horas. Um grupo controle e outro grupo controle do solvente foram mantidos em paralelo. No experimento *in vivo* os pesticidas inibiram a AChE cerebral (média ± erro padrão, mmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹) sendo o grupo controle Sevin[®] (106,5±12,9), 7,2 mg.L⁻¹ (17,1±1,7) e 14,4 mg.L⁻¹ (12,9±1,2). O grupo controle Folisuper 600[®] (131,2±43,8), 0,5 mg.L⁻¹ (34,0±3,4), 1,0 mg.L⁻¹ (0,4±0,1), 2,0 mg.L⁻¹ (3,0±0,6). No entanto, apenas o Folisuper 600[®] inibiu a AChE muscular: grupo controle (70,9±7,4), 0,5 mg.L⁻¹ (62,4±8,9), 1,0 mg.L⁻¹ (5,6±0,8) e 2,0 mg.L⁻¹ (1,5±0,1). Nos grupos expostos ao Decis[®] não houve inibição da AChE. As atividades da CAT, GST e LPO não foram significativamente diferentes nos grupos expostos ao Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] quando comparados com o controle. As análises dos experimentos *in vitro* também não revelaram diferença significativa na atividade da GST e nem na LPO entre os grupos. Somente a maior concentração de Folisuper 600[®] causou indução da atividade da catalase em hepatócitos de *Hypostomus commersoni*, porém sem dano de membrana. Os pesticidas, estudados no experimento *in vivo*, não geraram radicais livres para induzir o estresse oxidativo e/ou causar dano de membrana e provavelmente não são metabolizados pela via da GST. O cérebro foi o tecido de maior sensibilidade, pois a inibição da AChE chegou a 99,7% na exposição ao Folisuper 600[®]. A atividade da AChE de *Corydoras sp.* pode ser utilizada como biomarcador de contaminação ambiental por exposição ao Sevin[®] e ao Folisuper 600[®].

Palavras-chave: pesticidas, biomarcadores, peixes, *Corydoras sp.*, *Hypostomus commersoni*.

ABSTRACT

Organophosphates, carbamates and pyrethroids have been used in replacing the organochlorine compounds, due to their less persistence in the environment. However, reaching the water they can cause intoxication whose effects may be detected through the biomarkers. This work aimed: to evaluate the effects of sublethal concentrations of Sevin[®] (carbamate), Folisuper 600[®] (organophosphate) and Decis[®] (pyrethroid) in *Corydoras sp.* through the biomarkers acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and lipid peroxidation (LPO) and also to verify the effect of these pesticides in *Hypostomus commersoni* hepatocytes through the CAT and GST activities and LPO. For the *in vivo* assay the fish were distributed in control and experimental groups, being exposed for 96 hours to the concentrations 7,2 and 14,4 mg.L⁻¹ Sevin[®]; 0,5, 1,0 and 2,0 mg.L⁻¹ Folisuper 600[®] and 0,05 and 0,1 µg.L⁻¹ Decis[®]. The AChE activity was analysed in muscle and brain and the CAT, GST and LPO in liver. For the *in vitro* assay, hepatocytes were isolated, cultivated for three days and exposed to pesticides (Sevin[®] I = 20 µM, Sevin[®] II = 200 µM, Folisuper 600[®] I = 5 µM, Folisuper 600[®] II = 50 µM, Decis[®] I = 10 nM, Decis[®] II = 100 nM) for 96 hours. Control and solvent groups were also carried out. In *in vivo* experiments the pesticides inhibited the brain AChE (mean ± standard error, mmol.min⁻¹.mgprotein⁻¹) being the control group Sevin[®] (106.5±12.9), 7.2 mg.L⁻¹ (17.1±1.7) and 14.4 mg.L⁻¹ (12.9±1.2). The control group Folisuper 600[®] (131.2±43.8), 0.5 mg.L⁻¹ (34.0±3.4), 1.0 mg.L⁻¹ (0.4±0.1), 2.0 mg.L⁻¹ (3.0±0.6). However, only Folisuper 600[®] inhibited the muscle AChE: control group (70.9±7.4), 0.5 mg.L⁻¹ (62.4±8.9), 1.0 mg.L⁻¹ (5.6±0.8) and 2.0 mg.L⁻¹ (1.5±0.1). The pesticide Decis[®] did not inhibit the AChE and GST activities and LPO was not significantly different for the three pesticides compared to the control group. The *in vitro* analyses showed also no significant difference in the GST activity and LPO among the groups. It was only observed a CAT activity induction in the group Folisuper 600[®] (MPII) without any membrane damage. In the *in vivo* experiments the studied pesticides did not generate free radicals able to induce oxidative stress and/or damage to the membrane and probably they were not metabolized by the GST pathway. The brain was the most sensitive tissue, the inhibition of AChE reached 99.7% after the Folisuper 600[®] exposure. The AChE activity may be used in *Corydoras sp.* as an environmental contamination biomarker to Sevin[®] and Folisuper 600[®] exposure.

Keywords: pesticides, biomarkers, freshwater fishes, *Corydoras sp.*, *Hypostomus commersoni*.

INTRODUÇÃO GERAL

Os pesticidas são compostos químicos especialmente empregados pelo homem para destruir, repelir ou mitigar pragas (insetos, ácaros, nematódeos e outras formas de vida animal, fungos, plantas daninhas terrestres e aquáticas). Neste sentido podem ser classificados em inseticidas, acaricidas, nematicidas, raticidas, fungicidas, herbicidas e outros (LARINI, 1999). Dentre os inseticidas estão os carbamatos, organofosforados e piretróides.

1- CARBAMATOS E ORGANOFOSFORADOS

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico (*monoamida do ácido carbâmico*) e são substâncias reconhecidas como extremamente eficientes quanto à ação praguicida, principalmente inseticida. Os compostos deste grupo apresentam as seguintes características: 1) alta atividade inseticida; 2) baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas e 3) baixa toxicidade a longo prazo, quando comparada com os derivados fosforados (MÍDIO e SILVA, 1995). São exemplos: carbaril (Sevin[®]), propoxur (Baygon[®]), aldicarb (Temik[®]) e carbofuran (Furadan[®]) (MORTENSEN, 1986; MÍDIO e SILVA, 1995; SOARES, 1998). A toxicidade dos carbamatos é grandemente influenciada pelo veículo e pela via de exposição (BARON, 1991). São utilizados como pesticidas ou produtos fitossanitários, e alguns, de toxicidade mais baixa, são também empregados em formulações de inseticidas para uso doméstico (MENDES, 1995; MORGAN, 1998; SOARES, 1998). Carbamatos são ésteres que têm sua estrutura comum e dois radicais, R e R', onde R é um álcool, oxima, ou fenol e R' um hidrogênio ou um grupo metil (BARON, 1991). Podem ser absorvidos por via oral, respiratória e dérmica (LIMA, 1996; MORAES, 1998). Os carbamatos são rapidamente absorvidos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Na exposição dérmica, não só o veículo, como condições ambientais influenciam na absorção (BARON, 1991).

A absorção por via oral ocorre nas intoxicações agudas acidentais, nas tentativas de suicídio e intoxicações por contaminação alimentar e ocupacional. A via dérmica, contudo, é a via mais comum de intoxicações ocupacionais, seguida da via respiratória (LIMA, 1996; LARINI, 1999).

Após serem absorvidos, os carbamatos e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos (BARON, 1991). A concentração tende a ser maior

nos órgãos e tecidos envolvidos no metabolismo do xenobiótico (BARON, 1991). A maioria dos carbamatos, entretanto, não causa sinais evidentes em nível de SNC, e quando estes estão presentes, são considerados como sinais de gravidade (LARINI, 1999).

Na biotransformação dos carbamatos, as reações de maior importância compreendem (LARINI, 1999):

1 - Hidrólise, com a formação do ácido N-metilcarbâmico e o fenol correspondente.

2 - Hidroxilação do grupamento metil ligado ao nitrogênio, com formação de compostos com menor toxicidade.

3 - Hidroxilação do anel aromático. Alguns produtos resultantes são mais tóxicos, enquanto outros são menos tóxicos, como no caso do carbaril.

4 -N- desmetilação: Esta via é considerada de importância secundária na biotransformação dos inseticidas carbamatos.

5 - Conjugação com o UDPGA (uridil difosfato ácido alfa glicurônico) e PAPS (3-fosfoadenosina e 5- fosfosulfato), especialmente dos compostos hidroxilados.

Estruturalmente, os carbamatos são diferentes dos organofosforados (OF), funcionando, porém de forma similar, fazendo uma ligação no sítio da enzima acetilcolinesterase, nas junções sinápticas. O fato da inibição da acetilcolinesterase produzida pelos carbamatos ser de mais curta duração é uma das diferenças destes dois grupos de compostos (FORD, 1993; JEYARATNAM E MARONI, 1994; MENDES, 1995; MORGAN, 1998; SOARES, 1998).

1.1 – Sevin[®] (carbaril)

O carbaril (Figura 01) é um inseticida carbamato da classe toxicológica II (WHO, 2002; ANVISA, 2003b), ou moderadamente tóxico. É utilizado nas lavouras de abacaxi, abóbora, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate. Controla mais de 100 espécies de insetos, além de ser utilizado no controle de moluscos e ácaros. Quimicamente, possui o nome de 1-naftil-n-metilcarbamato. É absorvido no estômago, quando ingerido, ou por contato direto. O carbaril é formulado como um sólido que varia das cores branco a cinza de acordo com a pureza do composto. Os cristais têm pouco odor. O composto é estável ao calor, à luz e aos ácidos. Não é corrosivo para metais e equipamento de aplicação. É encontrado em todos os tipos de formulações, incluindo iscas, pó, grânulos, óleo, dispersões aquosas e suspensões (CORNELL UNIVERSITY, 2005).

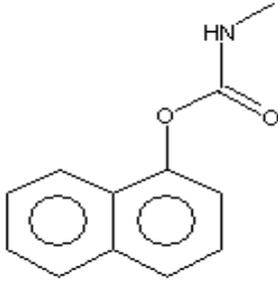


Figura 01 – Fórmula estrutural do carbaril

FONTE: <http://www.epa.gov/.../reports/regmsf/carbaryl.gif>

A ação tóxica do carbaril decorre da inibição da enzima acetilcolinesterase além de agir inibindo a desidrogenase láctica e outras serinas esterases (COX,1993).

Há dificuldade em se detectar quimicamente a intoxicação de organismos aquáticos por organofosforados e carbamatos, pois estes compostos são muito voláteis. Por isso, é de grande importância a análise dos biomarcadores que têm uma resposta rápida à exposição aos xenobiontes (substância estranha ao organismo).

1.2 – Folisuper 600[®] (Paration metílico)

O paration metílico (Figura 02) é um inseticida da classe toxicológica I ou extremamente tóxico. É utilizado nas culturas de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo. É um inseticida e acaricida organofosforado com rápido efeito inicial, recomendado contra uma série de pragas sugadoras (pulgão, tripés, percevejos, ácaro vermelho) e mastigadoras (lagartas, besouros, brocas, vaquinhas, mosca das frutas, bicudo do algodão). Quimicamente, possui o nome de tiofosfato de dimetil paranitrofenila. Possui coloração amarelada, é solúvel em solventes orgânicos, inflamável (LARINI, 1999).

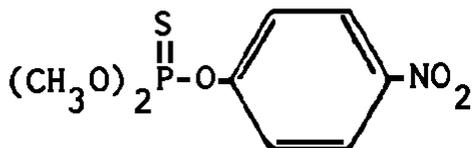


Figura 02 – Fórmula estrutural do paration metílico

Fonte: http://www.intox.org/.../chemical/paeathmt/pest7_e.htm

Os peixes podem ser expostos ao paration metílico acidentalmente, ou sob condições de tratamento. Em cultura de peixes, o tratamento com compostos organofosforados é um método comum empregado para controlar estágios larvais de insetos predadores de larvas de peixes. Organofosforados também são utilizados para tratar infecções de pele e brânquias causadas por parasitas externos. Dependendo do parasita e da espécie de peixe, a concentração do organofosforado recomendada pode variar entre 0,25 e 12,5 mg.L⁻¹. No Brasil, o Folisuper 600[®] é um dos organofosforados mais utilizados para este propósito, em concentrações variando de 0,5 a três ppm (MONTEIRO *et al.*, 2006).

2– PIRETRÓIDES

O termo “piretróide” é comumente usado para designar pesticidas sintéticos, os quais são derivados estruturalmente de piretrinas naturais, extrato do piretro obtido das flores de *Chrisantemun cinaerarifolium*.

O piretro é um inseticida instável na luz e no ar, o que limita a sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos. O desenvolvimento de piretróides sintéticos é resultado da tentativa de modificar estruturalmente a estrutura das piretrinas naturais, no sentido de reduzir a fotossensibilidade, retendo a potente e rápida atividade de inseticida e a toxicidade aguda relativamente baixa do piretro para mamíferos (SODERLUND *et al.*, 2001).

Os piretróides em geral são considerados moderadamente tóxicos para mamíferos (EPA categoria II). Os principais efeitos observados na exposição via oral dos mamíferos aos piretróides, aguda ou subcrônica, são efeitos neuroexcitatórios (CLARK, 1995), diferentes entre os piretróides tipo I e tipo II. Piretróides tipo I, geralmente produzem uma síndrome chamada “T”, por produzir tremor e os piretróides tipo II produzem uma síndrome chamada “CS”, por produzir coreoatetose e salivação. Por via dérmica, os piretróides podem causar irritação incluindo rubor e edema na pele (SODERLUND *et al.*, 2001).

Por serem menos tóxicos para humanos que os inseticidas organoclorados e organofosforados, os piretróides têm múltiplas funções de uso na agricultura, na medicina veterinária, no controle de pestes domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores (BARLOW *et al.*, 2001). Entretanto, quando estes inseticidas são utilizados, por exemplo, na agricultura, organismos não alvos como as espécies aquáticas podem ser expostas. Em peixes, os piretróides são altamente tóxicos, podendo causar efeitos tóxicos com uma dose cerca de mil vezes menor comparando-se com mamíferos (WHO, 1990).

2.1 – Decis[®] (Deltametrina)

Dentre os piretróides, a deltametrina (Figura 03) foi o composto químico originado da inclusão do grupamento substituinte α -ciano no grupo 3-fenoxibenzil, atribuindo-lhe maior potência inseticida que o composto anteriormente sintetizado (permetrina) (SODERLUND *et al.*, 2001).

Quimicamente, é o isômero [1R, cis; α S] de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-cis-3-(2,2-dibrovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato (SODERLUND *et al.*, 2001).

É um piretróide do tipo II, possui em sua estrutura química o grupamento alfa-ciano. Ela é estável na luz, umidade, mas instável em meio alcalino (WHO, 1990).

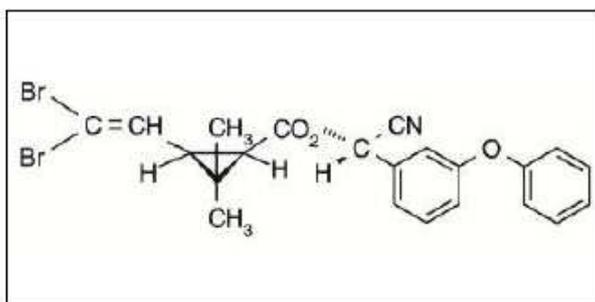


Figura 03 – Fórmula estrutural da deltametrina

Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/d06.pdf#search=%22deltametrina%22>

Formulada em uma emulsão concentrada, suspensão concentrada ou como pó, sozinho ou em combinação com outros pesticidas. Sinônimos e nomes comerciais incluem Decametrina, Decis, K-Otrine, Cislin.

Em mamíferos, estudos com deltametrina radioligada demonstraram que é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, dependendo do veículo é rapidamente absorvida via dérmica e é rapidamente absorvida pelo trato respiratório (CLARK, 1995). O tempo de meia-vida plasmática para a deltametrina é cerca de 38,5 horas, porém, a concentração em vários elementos do SNC e periférico foi mais alta que a concentração do plasma (ANADON *et al.*, 1996).

Devido sua lipofilicidade, os piretróides têm alto grau de absorção nas brânquias, um fator que contribui na sensibilidade dos peixes à exposição aos piretróides aquosos (POLAT *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação inclui efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da acetilcolina, receptores do ácido gama-aminobutírico, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases e canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, porém a causa primária de toxicidade são seus efeitos excitatórios nos canais Na^{+} voltagem-dependente de insetos e vertebrados, resultando numa persistente ativação dos canais Na^{+} e despolarização da membrana.

Comumente usada no plantio de algodão, de grãos como o café, milho, trigo e soja e na produção de cereais, frutas e vegetais e para a conservação de produtos estocados. Também é usada na saúde animal contra ectoparasitas e na saúde pública no controle de vetores.

É extremamente tóxica para peixes, a CL_{50} 96 h está entre 0,4 e 2,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$, enquanto a DL_{50} para ratos está entre 31-139 mg.Kg^{-1} e 19-34 mg. Kg^{-1} para camundongos. É capaz de causar danos neuronais, nos hepatócitos, em enzimas bioquímicas sanguíneas (BALINT *et al.*, 1995).

REDDY e PHILIP (1994) utilizaram uma concentração subletal de cipermetrina (também um piretróide do tipo II) para expor *in vivo*, machos de *Cyprinus carpio* e verificaram a inibição da atividade da AChE e da ATPase.

3 - BIOMARCADORES

Durante décadas os efeitos dos xenobióticos sobre o ambiente aquático eram avaliados pelo monitoramento de mudanças ambientais nos níveis do ecossistema. Entretanto, estes estudos eram limitados, pois vários efeitos importantes podiam ocorrer simultaneamente. A toxicologia ambiental passou a estudar estes efeitos utilizando marcadores para cada nível de organização (molecular ou celular). Esses biomarcadores refletem o *status* saudável dos organismos nos menores níveis de organização e podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações no ecossistema antes da ocorrência de danos irreversíveis (HUGGETT *et al.*, 1992).

A utilização de biomarcadores em programas de monitoramento oferece vantagens, pois eles são, normalmente, os primeiros a sofrer alteração, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise quando comparados às análises químicas (HUGGETT *et al.*, 1992).

Biomarcadores indicam se um grupo de organismos num dado ambiente está dentro de seus padrões fisiológicos normais. Se a resposta for negativa, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (WALKER *et al.*, 1996).

Os biomarcadores podem ser classificados em duas categorias: de exposição e de efeito. Biomarcadores de exposição são aqueles que indicam se um indivíduo foi ou está exposto a alguma espécie de poluente sem, no entanto, permitir qualquer inferência a respeito do grau de efeitos adversos causados. Biomarcadores de efeito são aqueles que demonstram a ocorrência de um efeito tóxico no organismo estudado. Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (WALKER *et al.*, 1996).

Neste trabalho os efeitos *in vivo* e *in vitro* dos pesticidas serão avaliados através de biomarcadores bioquímicos para neurotoxicidade como atividade da acetilcolinesterase, para estresse oxidativo como atividade da glutatona S-transferase e catalase e lipoperoxidação e ainda genéticos como o micronúcleo pisceo.

3.1 – Neurotoxicidade

3.1.1 – Atividade da Acetilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor cuja função nas sinapses e na junção neuromuscular tem sido bastante estudada. É sintetizada no neurônio (Figura 04), a partir da acetilcoenzima A e da colina, sob a influência da colina acetilase, dentro das vesículas, que estão em toda a célula, mas principalmente nas terminações axonais. É inativada por hidrólise sob ação da acetilcolinesterase, com formação de colina e ácido acético. A colina é reutilizada para nova síntese de acetilcolina e o ácido acético, para a formação da acetilcoenzima A (SCHVARTSMAN, 1991; GALLO e LAWRYK, 1991).

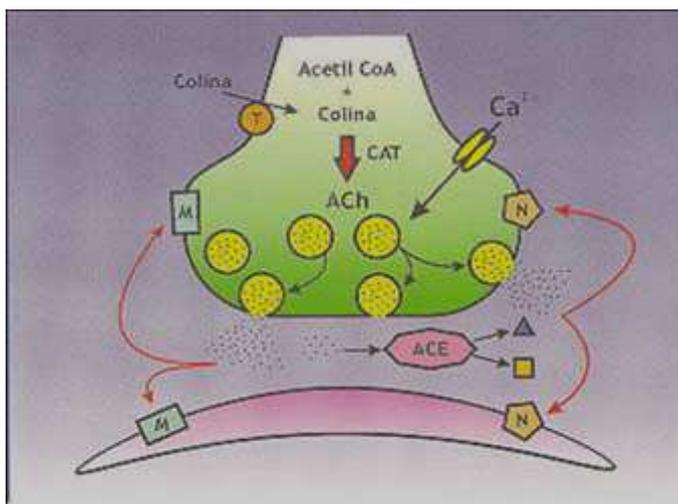


Figura 04 – Síntese e degradação da acetilcolina.

ACE= Acetilcolinesterase; ACh= Acetilcolina; CAT= Colina acetil-transferase

Fonte: http://www.medicinainformacion.com/rudimentos_ace.htm

A acetilcolina é o mediador químico necessário para transmissão do impulso nervoso nas fibras (a) pré e pós-ganglionares do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) simpático e parassimpático; (b) fibras parassimpáticas pós-ganglionares (órgãos efetores) e algumas fibras simpáticas pós-ganglionares (glândulas). Ainda é o transmissor neuro-humoral (c) do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural); e (d) de algumas sinapses interneurais do Sistema Nervoso Central (GALLO e LAWRYK, 1991, MORAES *et al.*, 1995, MORAES *et al.*, 1998).

Na acetilcolinesterase existe um centro ativo para inativação da ACh, que contém um sítio aniônico e um esterásico. A inibição da acetilcolinesterase por carbamatos e OF dá-se através da sua ligação com o sítio esterásico da enzima, diferindo apenas o tipo de ligação (fosforilação em OF ou carbamilação em carbamatos). Tais substâncias são posteriormente hidrolisadas e a enzima regenerada (BARON, 1991; MORAES *et al.*, 1995; SOARES, 1998). A taxa de regeneração varia de acordo com o composto. Se tal não ocorre, supõe-se que seja uma forma fosforilada muito estável. O que ocorre é que a inibição da enzima acetilcolinesterase pelos OF é feita inicialmente por uma ligação iônica, mas a enzima é progressivamente fosforilada por uma ligação covalente, processo que normalmente leva 24 a 48 horas para ocorrer. Tal fenômeno denomina-se "*envelhecimento*" da enzima e quando ocorre, esta não mais se regenera (QUINBY e WASH, 1964; MORTENSEN, 1986; GALLO e LAWRYK, 1991, MORAES *et al.*, 1995; SOARES, 1998; CARLTON, SIMPSON e HADDAD, 1998).

Desta forma, os OF são ditos inibidores irreversíveis da AChE, enquanto os carbamatos são ditos inibidores reversíveis (sofrem hidrólise *in vivo* em 12 a 48 horas) (MÍDIO e SILVA, 1995; MORAES, 1998).

Durante a década de 1950, a atividade da acetilcolinesterase cerebral foi proposta como um indicador de exposição a organofosforados e a carbamatos (WEISS, 1958). As relações entre a exposição a organofosforados e carbamatos e a atividade das acetilcolinesterases têm sido estudadas em muitas espécies de organismos aquáticos incluindo moluscos, crustáceos e peixes (VARÒ *et al.*, 2003).

As colinesterases de vertebrados são tradicionalmente divididas em duas classes: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) ou pseudocolinesterase. As duas enzimas podem ser distinguidas funcionalmente com base na especificidade ao substrato e na diferente susceptibilidade aos seus inibidores. A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), o neurotransmissor da sinapse colinérgica do sistema nervoso. A BChE é encontrada, principalmente no soro, mas está presente também no fígado, músculo e outros

tecidos. Em muitos peixes, o tecido cerebral contém predominantemente AChE. O músculo axial de peixes pode conter apenas AChE ou AChE e BChE (MONTEIRO *et al.*, 2004).

A inibição da atividade da AChE tem sido utilizada em organismos aquáticos para diagnosticar exposição a agentes anticolinesterásicos como pesticidas organofosforados e carbamatos. Estudos recentes demonstram que as acetilcolinesterases são também sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais como metais, detergentes e misturas complexas de poluentes (VALE, 1998; PENÑ-LLOPIS *et al.*, 2003; FERRARI *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2004; SHAONAN *et al.*, 2004). Porém, a maioria dos estudos é realizada com peixes de países nórdicos, existindo poucos estudos em relação aos peixes nativos brasileiros. Assim, faz-se necessário estudos de biomarcadores em peixes nativos.

3.2 – Estresse Oxidativo e Biotransformação

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa, geralmente pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução). Em meio biológico a maioria das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados, entretanto, em determinadas situações os radicais livres, também denominados espécies reativas são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio são formadas através de redução parcial do oxigênio até água através de sucessivas reações. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante endógeno é um fator predominante que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O efeito do estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: 1) adaptação por regulação do sistema antioxidante; 2) injúria tecidual, podendo causar dano a qualquer molécula alvo (DNA, proteínas e lipídios); 3) morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2001).

As espécies reativas de oxigênio podem reagir com biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Nas proteínas tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser alvos (LEVINE, 2002). Com relação ao DNA, estudos associam fragmentação deste causada por estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando o balanço crítico entre oxidantes e antioxidantes é desregulado devido à depleção de antioxidantes ou excessiva acumulação de espécies reativas de oxigênio, ou ambos, levando ao dano. Muitos xenobióticos como os pesticidas, podem causar estresse oxidativo levando à geração de espécies reativas de oxigênio e alterações em antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio estimuladas por contaminantes são associadas com diferentes processos patológicos envolvidos na etiologia de muitas doenças de peixes e também, podem ser um mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos a poluentes (BANERJEE *et al.*, 1999).

Porém, estresse oxidativo pode ocorrer quando há grande formação de radicais livres e as defesas antioxidantes não capazes de eliminá-los. Um resultado do dano oxidativo, por exemplo, é a peroxidação lipídica e a inativação de enzimas. Dessa forma, enzimas antioxidantes têm função crucial na manutenção da homeostase celular. As respostas ao dano oxidativo, mencionadas acima, têm sido propostas como biomarcadores de estresse oxidativo em vários organismos aquáticos (ZHANG *et al.*, 2004).

Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são necessários para manter o estado redox das células do peixe e servem como uma importante defesa biológica contra estresse oxidativo. Antioxidantes de peixes podem ser utilizados como biomarcadores de exposição a poluentes aquáticos. Mecanismos bioquímicos são particularmente relevantes para compreender os efeitos deletérios de muitos metais ou outros poluentes ambientais, como pesticidas (MONTEIRO *et al.*, 2006).

3.2.1 – Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

O metabolismo de xenobióticos usualmente envolve reações enzimáticas de Fase I e II. As reações de Fase I são de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos são freqüentemente mais reativos ou mais tóxicos que os iniciais, servindo como ponto de ataque para o sistema conjugador. As reações de Fase II envolvem a conjugação, que acarreta em compostos inativos. Ambas as etapas diminuem normalmente a lipossolubilidade da substância, aumentando a taxa de eliminação renal. E o sistema de enzimas metabolizadoras pode ser considerado um sistema não seletivo de desintoxicação para eliminar do organismo uma grande variedade de xenobiontes (RANG *et al.*, 1997).

As enzimas mais estudadas da Fase II são as glutathione transferases, UDP-glucuronosiltransferases e sulfotransferases (HUGGETT *et al.*, 1992). Enzimas de Fase II podem

ser utilizadas como biomarcadores tanto de exposição como de efeito, por serem alteradas por vários xenobiontes.

A glutathiona S-transferase forma uma família de enzimas de biotransformação da Fase II multifuncional, está presente no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutathiona em uma unidade de compostos com o núcleo eletrofílico envolvidos na eliminação de radicais de oxigênio e intermediários reativos (RIOL *et al.*, 2000). Em mamíferos e peixes a suscetibilidade para diferentes espécies de carcinogênese química pode ser modulada pela atividade da glutathiona S-transferase (HUGGETT *et al.*, 1992).

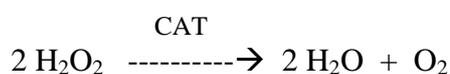
Experimentos prévios com peixes expostos a diferentes classes de pesticidas mostraram aumento na atividade da GST hepática. SAYEED *et al.* (2003) demonstraram indução da atividade da GST em peixes expostos a deltametrina e ao endosulfano.

3.2.2– Atividade da Catalase (CAT)

As reações do sistema biológico à produção de radicais livres, especialmente radicais livres de oxigênio, são complexas. Quando exposto à poluição, o organismo tenta, usualmente, um metabolismo de depuração, minimizando algum dano celular que esses radicais possam causar. Espécies reativas de oxigênio geradas por metabolismo e xenobiontes podem ser removidas pelo sistema de defesa antioxidante.

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. É encontrada em todas as células aeróbicas, em altos níveis no fígado, rim e sangue, e baixos níveis no tecido conjuntivo e cérebro (CHEN, 2003).

Quando há um estresse oxidativo, muitos ânions peróxidos são liberados e são transformados em peróxidos de hidrogênio que em seguida são decompostos pela catalase (GUL *et al.*, 2003). Como mostra a reação:



A catalase pode decompor somente H_2O_2 . A atividade da catalase está associada com os peroxissomos ou pequenos corpos que estão associados ao metabolismo de ácidos graxos. Durante a oxidação do ácido graxo peroxissomal H_2O_2 é produzida e a catalase atua degradando-a (HUGGETT *et al.*, 1992).

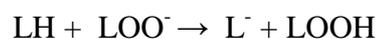
Em um estudo conduzido por MONTEIRO *et al.* (2006), *Brycon cephalus* expostos ao Folisuper[®] (organofosforado) por 96 horas tiveram significantes alterações em suas enzimas

antioxidantes. A atividade da catalase aumentou indicando um elevado estado antioxidante para reduzir o impacto de espécies reativas de oxigênio geradas pelo pesticida.

3.2.3 - Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque do DNA (HIGUCHI, 2003).

A lipoperoxidação utilizada como um sinal de estresse oxidativo celular ocorre em uma seqüência de reações já conhecida. No passo inicial, um átomo de hidrogênio é sequestrado do ácido graxo contendo ao menos duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), radical livre centrado no carbono (radical lipídico) (L[•]) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos). Seguido pela interação do L[•] com o oxigênio molecular (O₂), para formar um radical peroxil (LOO[•]), que pode então retirar um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio, como, por exemplo, um antioxidante. Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo (LOOH) é formado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).



As conseqüências mais comuns da lipoperoxidação correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, dentre elas está o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e o gradiente de íons e metabólitos.

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é um processo fisiológico regular visto que possui um importante papel na maturação celular (SCHEWE *et al.*, 1986; MATSUI *et al.*, 1997) e mobilização de lipídios (FEUSSNER *et al.*, 2001). Determinadas classes de contaminantes podem conduzir a uma disfunção com efeitos deletérios (SEVANIAN e URSINI, 2000) levando ao mau funcionamento celular (BAKER e KRAMER, 1999), comprometendo a função das membranas celulares e organelas essenciais (MEAGHER e FITZGERALD, 2000).

Durante a lipoperoxidação os grupos hidroperóxidos ligam-se aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, levando à perturbação nas interações lipídicas e, conseqüentemente, a alterações estruturais das biomembranas e lipoproteínas; e também, à formação de radicais livres, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (GIROTTI, 2002).

SAYEED *et al.* (2003) mostraram que a peroxidação lipídica é uma informação importante sobre a exposição a pesticidas, como deltametrina e endossulfano.

Lipoperoxidação tem sido reportada como a principal contribuinte para a perda de função celular sob condições de estresse oxidativo. Considerando que a reação típica durante o dano induzido por espécies reativas de oxigênio envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados; os resultados obtidos por MONTEIRO *et al.* (2006) mostraram que a exposição ao paration metílico por 96 horas levou a estresse oxidativo com aumento da lipoperoxidação.

3.3 - GENOTOXICIDADE

Agentes tóxicos induzem em organismos aquáticos defeitos genéticos devido a mutações e efeitos teratogênicos em células germinativas, efeitos carcinogênicos (MICHELMORE e CHIPMAN, 1998b), declínio populacional (redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos), redução de crescimento e desenvolvimento anormal (LEE e STEINERT, 2003).

Devido às implicações ecológicas associadas com genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Genotóxicos produzem modificações químicas e físicas ao DNA, chamadas de aductos de DNA (produto da ligação do DNA com outra molécula) ou quebra de fita de DNA, respectivamente (NACCI *et al.*, 1996).

Muitos biomarcadores têm sido utilizados na detecção de exposição e efeitos da poluição genotóxica. Estes incluem a presença de aductos de DNA, aberrações cromossômicas quebras da fita de DNA, presença de micronúcleo e outras frequentes anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

3.3.1 - Teste do Micronúcleo Písceo

Os micronúcleos foram descritos no citoplasma de eritrócitos há mais de um século, e foram chamados de “fragmentos do material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” por Jolly; no final do século XIX e início do século XX. Devido a esta descoberta os hematologistas chamavam esta estrutura de “corpúsculo de Howell-Jolly” (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Entre os testes desenvolvidos para investigar genotoxicidade, o teste do micronúcleo tem se provado um sensível indicador de danos cromossômicos e tem sido usado com sucesso em tecidos hematopoiéticos e epiteliais de muitos organismos (DE LA SIENRAA *et al.*, 2003). Em

medula óssea e sangue periférico, este teste é um dos melhores da citogenética *in vivo*, para estudos de genotoxicidade; no entanto, não é aplicável a qualquer tipo celular, não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações celulares que não sofrem divisão ou células em divisão em que a cinética da divisão celular não é bem compreendida ou controlada (FENESH, 2000).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vitro* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Micronúcleos resultam de lesões no DNA ou cromossomos, ou em nível de proteínas direta ou indiretamente envolvidas na segregação de cromossomos (como tubulina, por exemplo). Formação de micronúcleos depende da perda de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros e requer divisão meiótica ou mitótica (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

As vantagens do teste do micronúcleo, incluem (1) micronúcleo pode ser observado durante o ciclo celular, e o número de células contáveis é ilimitado; (2) a contagem pode ser feita por qualquer pessoa com pouco treinamento em citogenética; (3) não é necessário o cariótipo; (4) o micronúcleo formado persiste pelo menos até a próxima intérfase; (5) não é necessário nenhum reagente para bloquear o fuso (HEDDLE *et al.*, 1983).

Os micronúcleos são muito menores que o núcleo principal, sendo uma proporção 1/5 até 1/20 do tamanho deste. Em peixes os micronúcleos parecem ser menores que os sugeridos, pois o tamanho de seus cromossomos é menor que em mamíferos, portanto a proporção é de 1/10 até 1/30 do tamanho do núcleo principal (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo é rotineiramente usado como teste padrão durante o primeiro estágio de desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas, para identificar possíveis aberrações cromossômicas (PHELPS *et al.*, 2002).

HOOFTMAN e RAAT (1982) *apud* FERRARO *et al.* (2004), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido em 1975 para células de medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em

laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*, e adotado neste trabalho como Teste do Micronúcleo Písceo.

CAPÍTULO I:

DETECÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DE TRÊS DIFERENTES PESTICIDAS EM *Corydoras sp.* UTILIZANDO BIOMARCADORES

1 - INTRODUÇÃO

O homem desenvolveu suas aptidões e habilidades para a ciência e tecnologia mostrando que tem capacidade de transformar e criar. Através dos anos, as indústrias cresceram, a ciência evoluiu, a população aumentou. Para aumentar e qualificar a produção, o homem aprimorou suas técnicas de plantio, aperfeiçoando equipamentos, desenvolvendo agrotóxicos e recentemente, modificando geneticamente os organismos biológicos (THOMPSON *et al.*, 1995).

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo (CALDAS, 2000). A utilização de pesticidas cresceu com a exploração agrícola intensiva, pois melhora a produção animal e vegetal porque elimina parasitas que competem por alimentos ou causam doenças. Entretanto, estas substâncias trazem riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal, pois podem causar intoxicação aguda além de possíveis efeitos crônicos, difíceis de serem relacionados à exposição em baixas concentrações (COOPER *et al.*, 1999).

Os erros de manejo do equipamento de aplicação dos pesticidas e o uso em larga escala causam preocupação. Por não serem substâncias seletivas a pragas, há o risco de causarem um desequilíbrio ambiental, podendo levar a um aumento ou redução da riqueza e da abundância de espécies nos níveis tróficos (ARAÚJO, 2005).

Há uma preocupação crescente em avaliar os riscos que as substâncias químicas podem causar ao homem e ao ecossistema porque estes compostos são liberados no meio ambiente. Se não são diretamente lançados no ambiente aquático, processos hidrológicos e atmosféricos eventualmente distribuem estes componentes químicos, depositando-os nos sistemas aquáticos. Em toxicologia aquática, objetiva-se preservar a saúde e sobrevivência das espécies aquáticas. Dentre as substâncias capazes de causar dano à biota aquática estão os inseticidas piretróides, organofosforados e carbamatos. Os biomarcadores podem ser utilizados como ferramentas para detectar a contaminação por estas substâncias e preservar o meio ambiente. Eles detectam os efeitos subletais dos xenobióticos, antes que os efeitos fisiológicos e populacionais sejam evidentes (HUGGETT *et al.*, 1992).

Dentre os biomarcadores utilizados neste trabalho estão a acetilcolinesterase a qual tem sua atividade inibida por carbamatos e organofosforados (BARON, 1991). A catalase e a glutathione S-transferase são biomarcadores de estresse oxidativo. A catalase converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A glutathione S-transferase é uma enzima da Fase II da biotransformação que pode ser alterada por várias classes de xenobióticos (HUGGETT *et al.*, 1992). A lipoperoxidação causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o

ambiente favorável ao ataque do DNA (HIGUCHI, 2003). O Teste do Micronúcleo Písceo é utilizado para detectar lesões no DNA que resultam de quebras cromossômicas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A espécie *Corydoras sp.* foi o modelo animal utilizado neste trabalho. O gênero *Corydoras* (Figura 05) Lacépède, 1803 - é composto por 143 espécies amplamente distribuídas na América do Sul. Pertence à Ordem Siluriformes e à Família Callichthyidae. A distribuição geográfica compreende a bacia do rio Paraná e rios costeiros do Brasil e Uruguai. No sul do Brasil, região com fortes interferências antrópicas, está presente em todos os Estados. É um peixe facilmente diferenciado de seus congêneres pelo padrão de colorido de três manchas castanho escuras nas regiões lateral e dorsal do tronco, e nadadeira caudal estriada (SHIBATTA *et al.*, 2005). Popularmente, é conhecida como diabinho, limpa-fundo e cascudinho.

Espécies do gênero *Corydoras* foram caracterizadas como habitantes de fundo e demonstrando preferência por substrato arenoso (ARANHA *et al.*, 1993). A sua estratégia alimentar foi caracterizada por FOGAÇA *et al.* (2003) em escavadores (revolvem o substrato areia em busca de alimento) e raspadores (quando permanecem no fundo raspando a vegetação e os microrganismos que se desenvolvem sobre as rochas. A sua dieta é composta por larvas de dípteros, microcrustáceos planctônicos e algas, além de alta frequência de areia nos estômagos sugerindo que se alimentam do substrato (ARANHA *et al.*, 1993).



Figura 05 – Exemplar de *Corydoras sp.*

Fonte:http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.akvarium.sk/ryby/corydoras_paleatus

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da contaminação pelo Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®], em concentrações subletais, em *Corydoras sp.* utilizando biomarcadores.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito agudo da exposição subletal ao Sevin[®], ao Folisuper 600[®] e ao Decis[®], em *Corydoras sp.* sobre a atividade das enzimas:
 - acetilcolinesterase cerebral e muscular;
 - catalase e
 - glutathione S-transferase.
- Avaliar o efeito agudo da exposição subletal ao Sevin[®], ao Folisuper 600[®] e ao Decis[®], em *Corydoras sp.* sobre a lipoperoxidação.
- Avaliar a genotoxicidade na exposição aguda ao Sevin[®], ao Folisuper 600[®] e ao Decis[®], em concentrações subletais, em *Corydoras sp.* através do Teste do Micronúcleo Písceo.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os peixes *Corydoras sp.* foram adquiridos de estabelecimentos comerciais e transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR sendo mantidos em aquários estoques de 120 L para aclimação, com fotoperíodo 12 h, aeração constante e temperatura da água de 23 ± 2 °C. Segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”. Aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas sob o número 216.

3.2 – DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DOS PESTICIDAS SEVIN[®], FOLISUPER 600[®] E DECIS[®]

Após o período de aclimação os animais foram distribuídos randomicamente em grupos para a determinação das concentrações subletais a serem utilizadas nos experimentos definitivos. Os grupos foram compostos de cinco animais cada e dispostos em aquários de 20 litros.

Grupos:

Experimento Sevin[®]

Controle água

3,5 mg. L⁻¹ de carbaril

7,5 mg. L⁻¹ de carbaril

15,0 mg. L⁻¹ de carbaril

30,0 mg. L⁻¹ de carbaril

Experimento Folisuper 600[®]

Controle água

0,5 mg. L⁻¹ de paration metílico

1,0 mg. L⁻¹ de paration metílico

2,0 mg. L⁻¹ de paration metílico

4,0 mg. L⁻¹ de paration metílico

Experimento Decis[®]

Controle água

Controle acetona

0,1 µg. L⁻¹ de deltametrina

0,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de deltametrina

1,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de deltametrina

2,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de deltametrina

4,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de deltametrina

O início do experimento deu-se com a exposição dos animais ao pesticida por via hídrica. O experimento teve duração de 96 horas e neste período os animais não foram alimentados. Baseado nos resultados as concentrações subletais para os experimentos definitivos foram escolhidas.

3.3 – DESENHO EXPERIMENTAL

Para o ensaio de 96 horas os peixes foram distribuídos aleatoriamente em grupos-teste e controle (n=20 para Sevin[®], n=16 para o Folisuper 600[®] e n=20 para Decis[®]). Os grupos-teste foram expostos às concentrações 7,2 e 14,4 mg. L⁻¹ de carbaril (Sevin[®]); 0,5; 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹ de paration metílico (Folisuper 600[®]) e 0,05 e 0,1 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de deltametrina (Decis[®]). Para o ensaio com o Decis[®] foi adicionado um grupo controle-acetona (solvente). Os grupos-controle não sofreram contaminação. O ensaio biológico foi conduzido por 96 horas observando-se o comportamento e mortalidade dos peixes. Durante o experimento os animais não foram alimentados. O experimento finalizou com a eutanásia dos animais por secção medular.

Os peixes foram pesados e medidos e os fígados retirados e agrupados dois a dois, formando *pools* e em seguida armazenados em freezer -80°C para análise da atividade da catalase, glutathione S-transferase e lipoperoxidação. Um fragmento de músculo e o cérebro foram retirados de cada animal e armazenados em freezer a -20°C para a análise da acetilcolinesterase.

3.4 – ANÁLISES DOS BIOMARCADORES

3.4.1 – Processamento do material

As amostras de músculo e cérebro foram descongeladas em gelo moído e pesadas, aproximadamente 100 mg e 50 mg, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. O homogeneizador utilizado foi o Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, no qual foi medida a atividade da acetilcolinesterase.

As amostras de fígado, *pools* de dois fígados foram descongeladas em gelo moído e pesadas sendo aliqüotadas em partes iguais. Sendo uma parte homogeneizada na proporção 1:10 em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 com auxílio de homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas duas alíquotas para medir a atividade da catalase e glutatona S-transferase. A outra parte foi homogeneizada na proporção 1:10 em metanol 30% e centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C obtendo-se o sobrenadante para medir a lipoperoxidação.

3.4.2 – Atividade da Acetilcolinesterase

O princípio da técnica é a exposição de um homogeneizado de tecido muscular ou cerebral e do reagente DTNB ao substrato acetiltiocolina. Este substrato é hidrolisado pela AChE em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato responsável pelo aparecimento de coloração amarela.

A análise da acetilcolinesterase foi realizada pelo método de ELLMAN *et al.* (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998).

Os sobrenadantes das centrifugações dos músculos e cérebros foram diluídos na proporção 1:5 e pipetados (50 µL) nas cavidades da microplaca (quatro repetições). O DTNB (5,5 – Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM foi adicionado (200µL) a cada amostra. O substrato acetiltiocolina a 9 mM foi adicionado (50 µL) a cada cavidade imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro de microplaca TECAN A-5082 a 405 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.4.3 - Atividade da Glutaciona S-transferase (GST)

As amostras diluídas na proporção 1:10 foram pipetadas (100 µl), em microplaca e em seguida foi adicionado 200 µl de solução reação: CDNB (2,5 mM), GSH (2,0 mM) e tampão fosfato). A conjugação do substrato CDNB com GSH é catalisada pela GST, formando um tioéter, e pode ser conferida através do aumento da absorbância (KEEN, 1976). A absorbância foi medida com comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro TECAN A-5082. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.4.4 - Atividade da Catalase (CAT)

As amostras diluídas na proporção 1:5 foram pipetadas (10 μ l) em três réplicas, em cubetas de quartzo. Em seguida foram adicionados 990 μ l de solução reação 20 mM (Tris-base a 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0, 25°C; peróxido de hidrogênio a 20 mM e água miliqué). As leituras procederam-se em intervalos de 2 s (λ = 240 nm). O decréscimo gradual na absorbância devido a degradação de peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984), foi registrado num intervalo de 1 min e 10 s. Os resultados foram expressos em μ mol.min⁻¹.mgproteína⁻¹.

3.4.5 - Lipoperoxidação (LPO)

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de *FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method)*. Esse método tem por princípio a rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ – laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG *et al.*, 1992).

O sobrenadante foi diluído na proporção 1:5 em metanol 30%, levado ao ultrassom por dois minutos e finalmente, centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C obtendo-se a amostra.

As amostras foram pipetadas (30 μ l), em microplaca e em seguida foi adicionado 270 μ l de solução reação [(laranja de xilenol a 100 μ M, H₂SO₄ a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 μ M (acrescentados na seqüência descrita a metanol 90%)], e incubadas por 30 min antes da leitura. Foram feitas três réplicas. A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca TECAN A-5082 (λ = 570 nm). Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos (mmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹).

3.4.6 - Análise da Concentração de Proteína

Para a quantificação da proteína nas amostras foi utilizado o método de BRADFORD (1976), com curva padrão de soro de albumina bovina.

3.3.7 - Teste do Micronúcleo Písceo

Para o Teste do Micronúcleo Písceo foi utilizado o protocolo descrito por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). A técnica consiste em coletar uma gota de sangue em uma lâmina. Após, procede-se o esfregaço o qual seca à temperatura ambiente. Posteriormente à secagem a lâmina é fixada com álcool etílico absoluto por uma hora e corada com Giëmsa 10% por 15 min. A leitura é feita por teste cego contando-se 2.000 células por animal. Só são consideradas para análise hemácias nucleadas com membrana citoplasmática intacta.

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos de atividade enzimática e lipoperoxidação foram analisados estatisticamente através do Programa *GraphPad Prism 3* por ANOVA de uma via para determinar se havia diferença entre os grupos, seguida de Prova de Bonferroni para demonstrar qual grupo diferia do controle, com $p < 0,05$ e expressos em média \pm erro padrão da média.

4 – RESULTADOS

4.1 – DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DOS PESTICIDAS SEVIN[®], FOLISUPER 600[®] E DECIS[®]

Os resultados da mortalidade dos animais estão descritos na Tabela 1.

No experimento com Sevin[®] houve mortalidade de 60% dos animais no grupo 30,0 mg. L⁻¹ de carbaril e de 20% no grupo 15,0 mg. L⁻¹. Nos grupos 3,5 e 7,5 mg. L⁻¹ de carbaril não ocorreu mortalidade.

Em relação ao Folisuper 600[®] ocorreu mortalidade de 60% dos animais no grupo 4,0 mg. L⁻¹ de paration metílico. Nos grupos 0,5, 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹ de paration metílico não ocorreu mortalidade.

Houve mortalidade de 100% dos animais horas após a exposição nas concentrações 1,0; 2,0 e 4,0 µg. L⁻¹ de deltametrina (Decis[®]). Na concentração 0,5 µg. L⁻¹ ocorreu mortalidade de 60% dos animais e na 0,1 µg. L⁻¹ nenhum animal morreu. As concentrações escolhidas para serem usadas nos experimentos definitivos foram: 7,2 e 14,4 mg.L⁻¹ de carbaril (Sevin[®]), pois na concentração 15,0 mg.L⁻¹ ocorreu mortalidade de um animal então, optou-se por uma concentração um pouco menor; onde não ocorreu mortalidade. As concentrações de paration metílico (Folisuper 600[®]) a serem utilizadas no experimento definitivo foram: 0,5, 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹ de paration metílico, pois não houve mortalidade nessas concentrações. Em relação a deltametrina (Decis[®]), 0,1 µg. L⁻¹ foi utilizada no experimento definitivo e a metade deste valor (0,05 µg. L⁻¹) foi escolhida como a outra concentração a ser testada no experimento definitivo.

TABELA 1 – Determinação das concentrações subletais dos pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®].

| Grupos | Mortalidade |
|---|-------------|
| <u>Experimento Sevin[®]</u> | |
| Controle água | 0 |
| 3,5 mg. L ⁻¹ de carbaril | 0 |
| 7,5 mg. L ⁻¹ de carbaril | 0 |
| 15,0 mg. L ⁻¹ de carbaril | 1 |
| 30,0 mg. L ⁻¹ de carbaril | 3 |

| <u>Experimento Folisuper 600®</u> | |
|--|---|
| Controle água | 0 |
| 0,5 mg. L ⁻¹ de paration metílico | 0 |
| 1,0 mg. L ⁻¹ de paration metílico | 0 |
| 2,0 mg. L ⁻¹ de paration metílico | 0 |
| 4,0 mg. L ⁻¹ de paration metílico | 3 |
| <u>Experimento Decis®</u> | |
| Controle água | 0 |
| Controle acetona | 0 |
| 0,1 µg. L ⁻¹ de deltametrina | 0 |
| 0,5 µg. L ⁻¹ de deltametrina | 3 |
| 1,0 µg. L ⁻¹ de deltametrina | 5 |
| 2,0 µg. L ⁻¹ de deltametrina | 5 |
| 4,0 µg. L ⁻¹ de deltametrina | 5 |

4.2 – EXPERIMENTO SEVIN®

Durante o experimento com o Sevin® houve mortalidade de 01 peixe do grupo 7,2 mg. L⁻¹ e de 02 peixes do grupo 14,4 mg. L⁻¹. Foram observados sinais de intoxicação como: menor atividade geral em relação ao grupo controle, perda do equilíbrio e menor movimentação em locais como o nível médio da água.

Na atividade da acetilcolinesterase muscular (Figura 06) dos peixes expostos ao Sevin® não foi observada diferença significativa entre os grupos-teste e controle. Entretanto quando analisada a acetilcolinesterase cerebral (Figura 07) observou-se diferença estatística entre as duas concentrações de Sevin® em relação ao grupo controle. Uma inibição em 84% da atividade da enzima na concentração 7,2 mg. L⁻¹ e 88% na concentração 14,4 mg.L⁻¹ foi observada.

Na atividade da GST (Figura 08) e da catalase (Figura 09) e também na lipoperoxidação (Figura 10) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos-teste e o grupo controle. No Teste do Micronúcleo Písceo não foram encontradas alterações morfológicas nucleares nos grupos analisados.

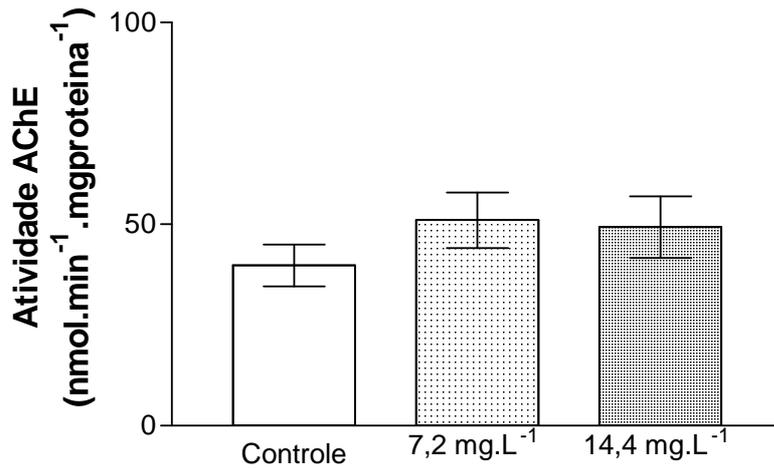


Figura 06 – Atividade da acetilcolinesterase muscular de *Corydoras sp.* expostos ao Sevin® (Carbaril) por 96 horas. Controle n= 20; 7,2 mg.L⁻¹ n=19 e 14,4 mg.L⁻¹ n=18. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular ± erro padrão.

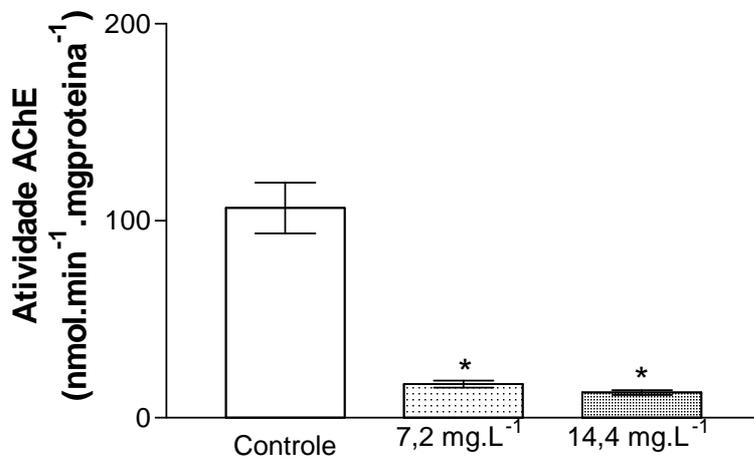


Figura 07 – Atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Corydoras sp.* expostos ao Sevin® (Carbaril) por 96 horas. Controle n= 20; 7,2 mg.L⁻¹ n=19 e 14,4 mg.L⁻¹ n=18. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular ± erro padrão. * = difere significativamente do controle (p<0,001) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni.

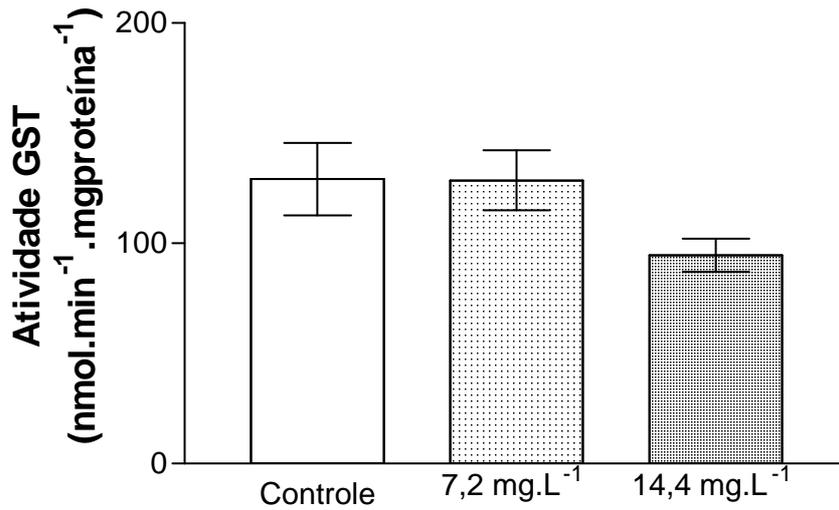


Figura 08 – Atividade da Glutathione S-transferase de *Corydoras sp.* expostos ao Sevin[®] (Carbaril) por 96 horas. Amostra = *pools* de dois fígados. Controle n= 10; 7,2 mg.L⁻¹ n=9 e 14,4 mg.L⁻¹ n=8. As barras expressam a média da atividade da GST ± erro padrão.

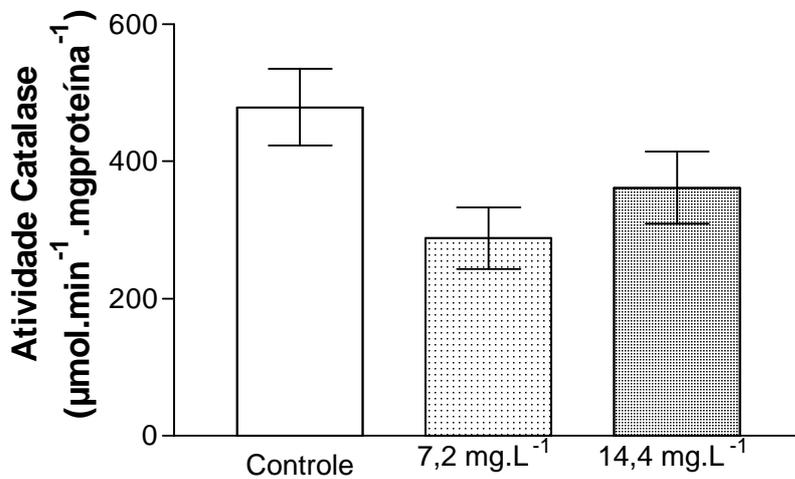


Figura 09 – Atividade da catalase de *Corydoras sp.* expostos ao Sevin[®] (Carbaril) por 96 horas. Amostra = *pools* de dois fígados. Controle n= 10; 7,2 mg.L⁻¹ n=9 e 14,4 mg.L⁻¹ n=8. As barras expressam a média da atividade da catalase ± erro padrão.

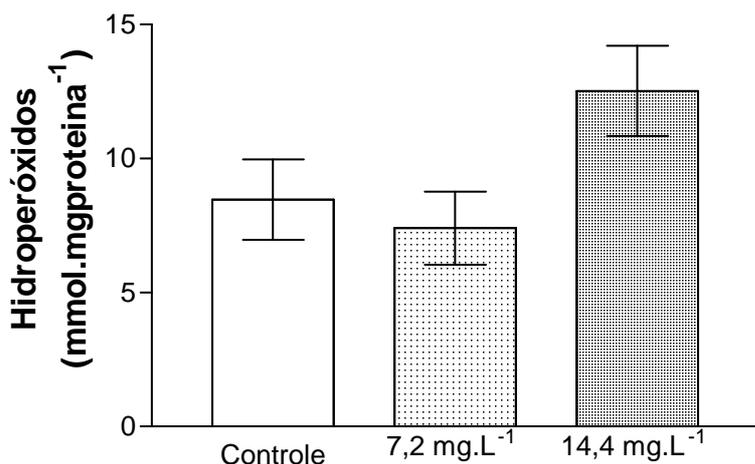


Figura 10 – Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos em *Corydoras sp.* expostos ao Sevin[®] (Carbaril) por 96 horas. Amostra = *pools* de dois fígados. Controle n= 10; 7,2 mg.L⁻¹ n=9 e 14,4 mg.L⁻¹ n=8. As barras expressam a média da concentração de hidroperóxidos ± erro padrão.

4.3 – EXPERIMENTO FOLISUPER 600[®]

No experimento com o Folisuper 600[®] não houve mortalidade dos animais. Nos grupos-teste ocorreram os mesmos sinais de intoxicação observados com o Sevin[®], mas em maior intensidade.

Houve uma inibição significativa da atividade da acetilcolinesterase muscular (Figura 11) e cerebral dos peixes expostos. Uma inibição significativa de 92,2% da atividade da enzima na concentração 1,0 mg. L⁻¹ e 97,9% na concentração 2,0 mg.L⁻¹ e pode-se observar que houve diferença estatística também entre as concentrações 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹. Analisando a acetilcolinesterase cerebral (Figura 12) observou-se diferença estatística entre as três concentrações de Folisuper 600[®] e o controle. Ocorrendo uma inibição em 74% da atividade da enzima na concentração 0,5 mg. L⁻¹, 99,7% na concentração 1,0 mg.L⁻¹ e 97,7% na concentração 2,0 mg. L⁻¹.

Quanto à atividade da GST (Figura 13), catalase (Figura 14) e na concentração de hidroperóxidos (Figura 15) não foi observada diferença significativa entre os grupos-teste e controle.

No Teste do Micronúcleo Písceo não foram encontradas alterações morfológicas nucleares nos grupos analisados.

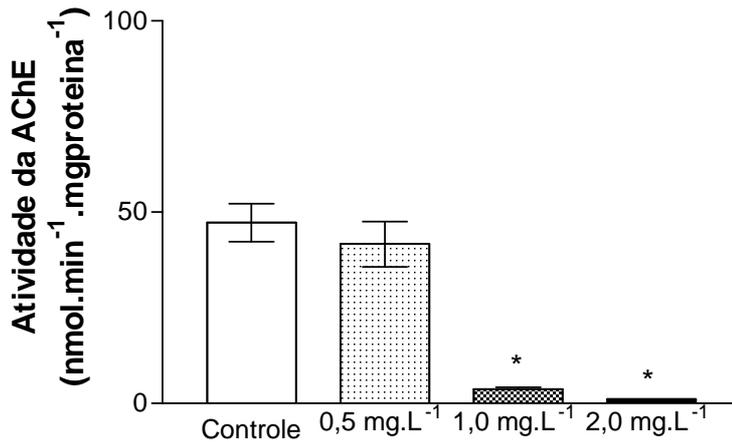


Figura 11 – Atividade da acetilcolinesterase muscular de *Corydoras sp.* expostos ao Folisuper 600[®] (Paration metílico) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular \pm erro padrão (n=16 para cada grupo). * = difere significativamente do controle (p<0,001) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni.

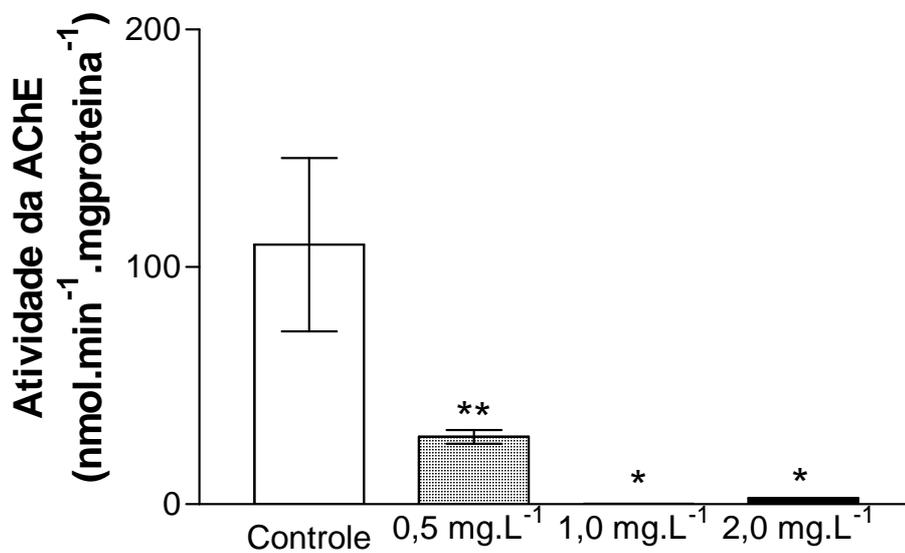


Figura 12 – Atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Corydoras sp.* expostos ao Folisuper 600[®] (Paration metílico) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase cerebral \pm erro padrão (n=16 para cada grupo). * = difere significativamente do controle (p<0,001); ** = difere significativamente do controle (p<0,05) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni.

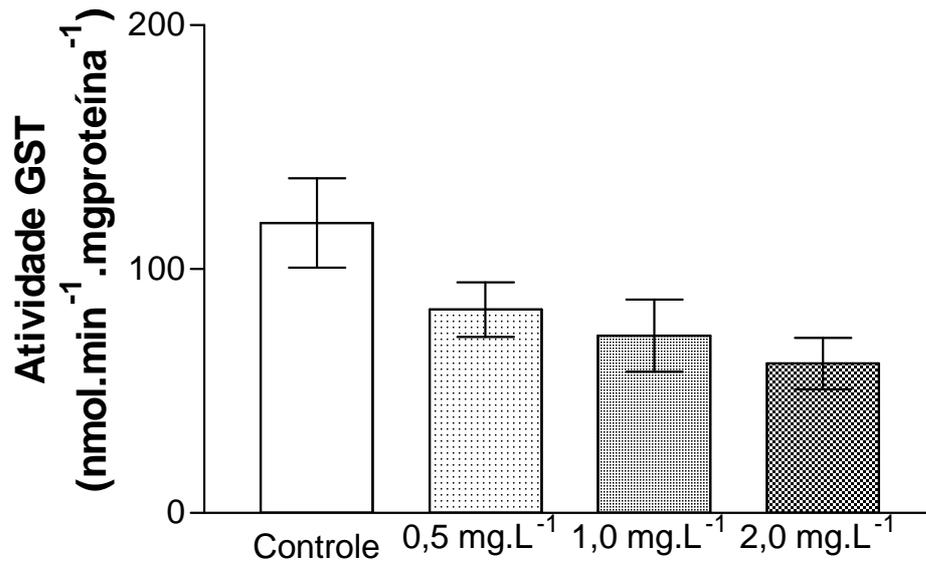


Figura 13 – Atividade da glutatona S-transferase de *Corydoras sp.* expostos ao Folisuper 600[®] (Paration metílico) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da glutatona S-transferase \pm erro padrão. Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=08 para cada grupo.

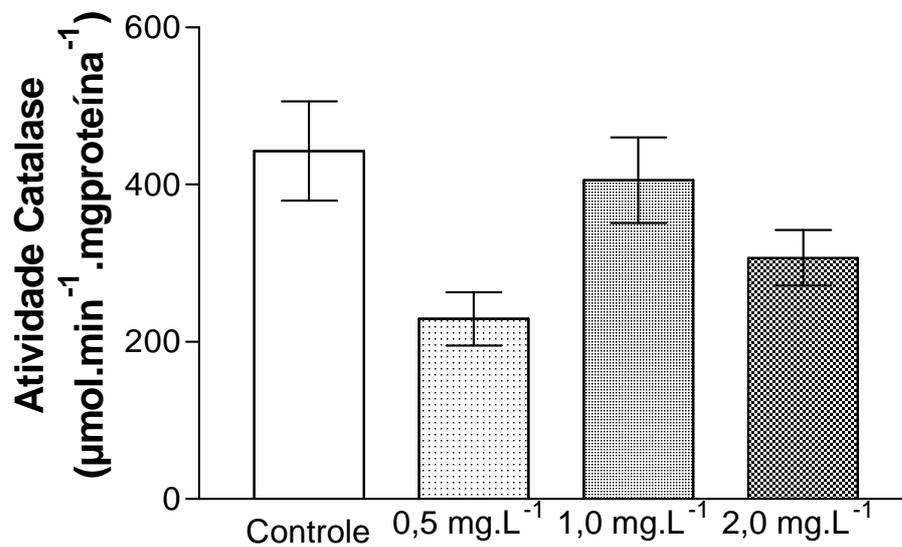


Figura 14 – Atividade da catalase de *Corydoras sp.* expostos ao Folisuper 600[®] (Paration metílico) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da catalase \pm erro padrão. Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=08 para cada grupo.

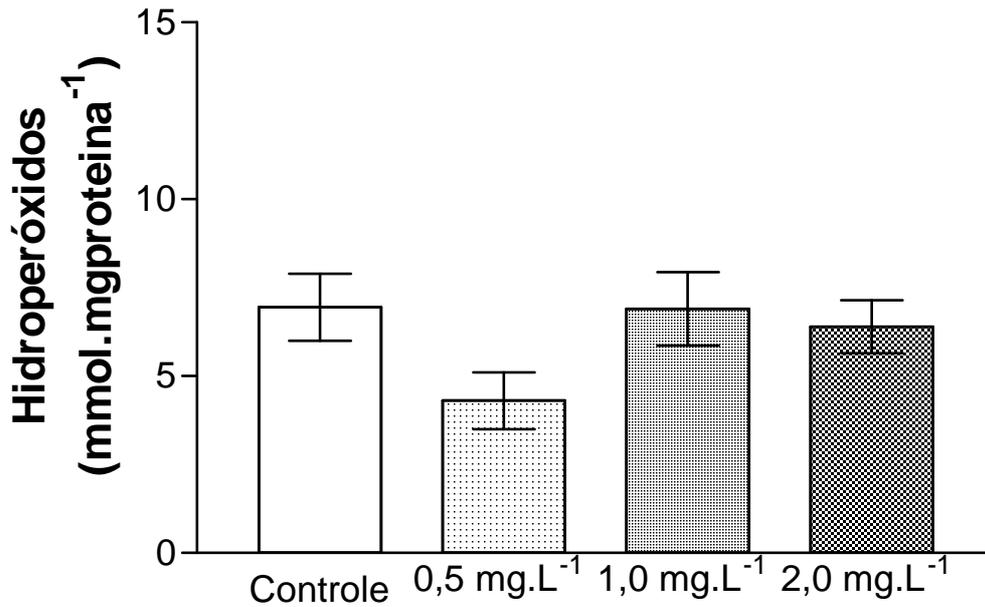


Figura 15 – Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de *Corydoras sp.* expostos ao Folisuper 600[®] (Paration metílico) por 96 horas. As barras expressam a média da concentração de hidroperóxidos \pm erro padrão. Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=08 para cada grupo.

4.4 – EXPERIMENTO DECIS[®]

No experimento com o Decis[®] não houve mortalidade dos animais. Os grupos-teste apresentaram redução da locomoção permanecendo no fundo do aquário. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação à atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral, glutathiona S-transferase, catalase e lipoperoxidação (Figuras 16 a 20).

No Teste do Micronúcleo Písceo não foram encontradas alterações morfológicas nucleares nos grupos analisados.

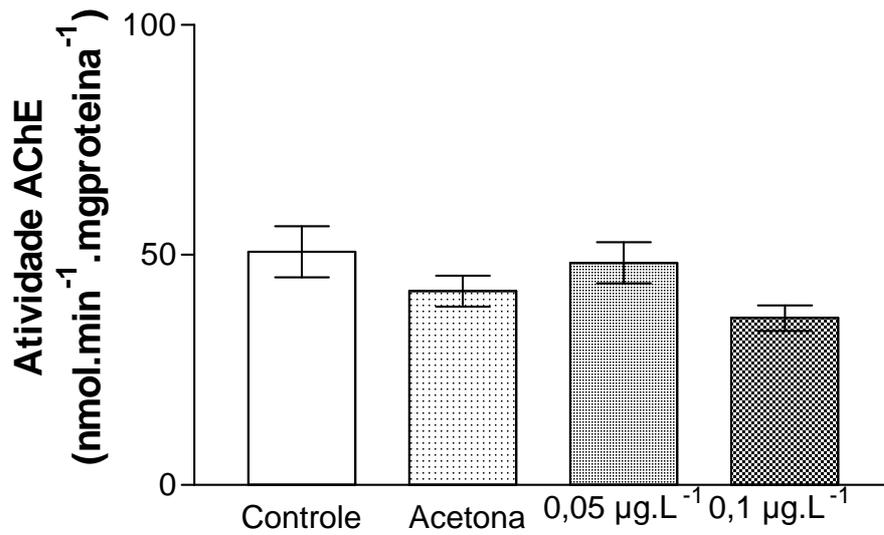


Figura 16 – Atividade da acetilcolinesterase muscular de *Corydoras sp.* expostos ao Decis[®] (Deltametrina) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular \pm erro padrão (n=20 para cada grupo).

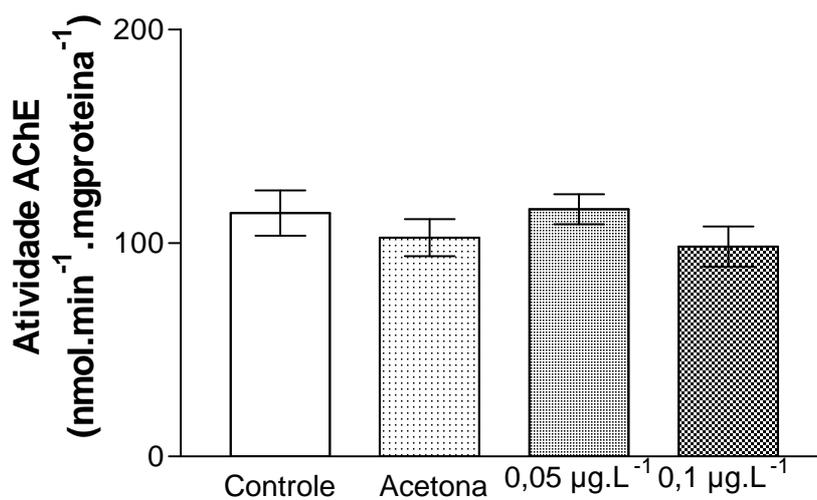


Figura 17 – Atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Corydoras sp.* expostos ao Decis[®] (Deltametrina) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase cerebral \pm erro padrão (n=20 para cada grupo).

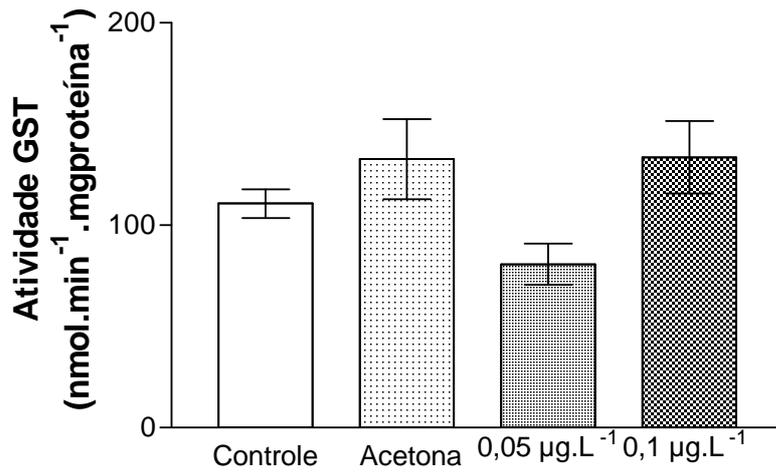


Figura 18 – Atividade da glutathione S-transferase de *Corydoras sp.* expostos ao Decis® (Deltametrina) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da glutathione S-transferase \pm erro padrão. Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=10 para cada grupo.

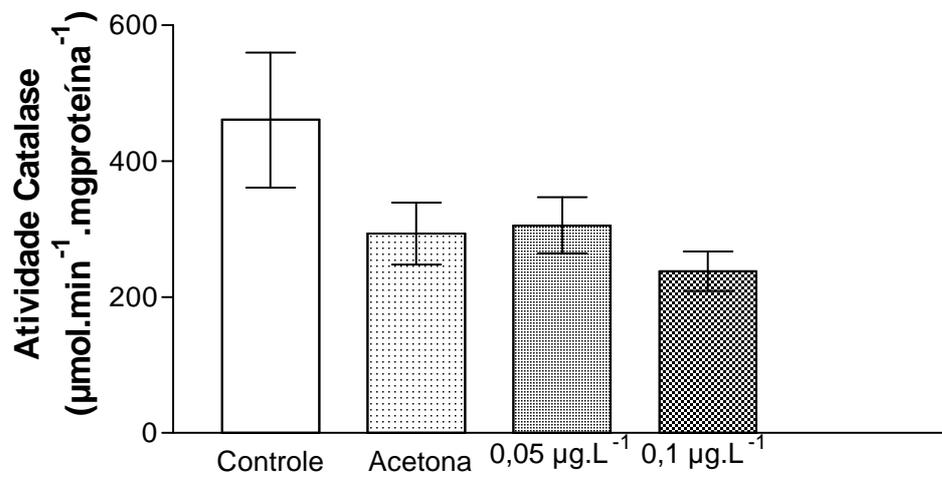


Figura 19 – Atividade da catalase de *Corydoras sp.* expostos ao Decis® (Deltametrina) por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da catalase \pm erro padrão. (Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=10 para cada grupo.

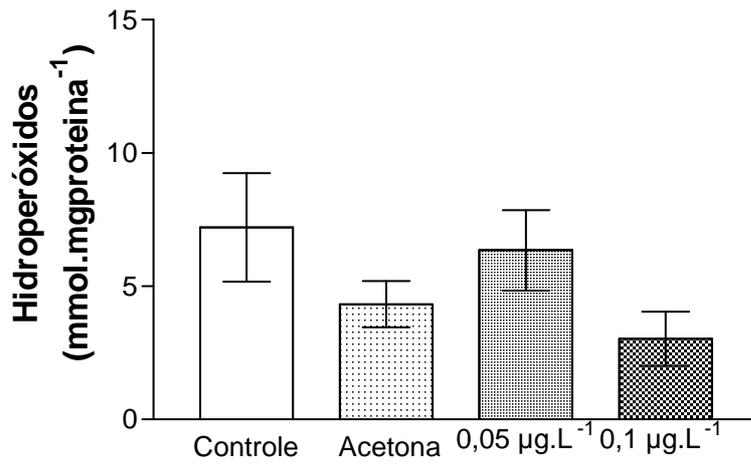


Figura 20 – Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de *Corydoras sp.* expostos ao Decis[®] (Deltametrina) por 96 horas. As barras expressam a média da concentração de hidroperóxidos \pm erro padrão. Amostras = *pools* de dois fígados sendo n=10 para cada grupo.

5 - DISCUSSÃO

Como reconhecido recentemente pelas organizações internacionais e agências ambientais, o risco estimado de contaminação não pode basear-se somente na análise química das amostras ambientais, pois esta abordagem não indica os efeitos deletérios dos contaminantes na biota. Para detectar e estimar os efeitos de baixas concentrações e de complexas misturas tem sido utilizados os biomarcadores de exposição e efeito de contaminantes em organismos (LIONETTO *et al.*, 2003).

Organofosforados e carbamatos são grupos de compostos químicos bastante difíceis de serem analisados quimicamente devido sua alta volatilidade e baixa persistência no ambiente. Como apresentam a capacidade de causar a inibição da atividade de acetilcolinesterase, esta enzima é bastante útil no diagnóstico de intoxicações por organofosforados e carbamatos. Embora estes inseticidas sejam relativamente não persistentes em ambientes aquáticos, sua aplicação constante é necessária, e sua detecção em programas de monitoramento através da inibição da atividade da acetilcolinesterase apresenta bons resultados (BOCQUENÉ *et al.*, 1990; NAJIMI *et al.*, 1997; STURM *et al.*, 1999; TORTELLI *et al.*, 2006). Apesar da efetividade da medida da atividade acetilcolinesterase como biomarcador, a legislação brasileira (CONAMA, 2005) ainda não preconiza sua utilização no diagnóstico de contaminação ambiental por estes compostos e poucos são os estudos com peixes nativos.

Os resultados deste trabalho mostraram que a AChE cerebral foi mais sensível ao Sevin[®] e ao Folisuper 600[®], pois foi inibida em todas as concentrações testadas. A AChE muscular não foi inibida nos animais expostos ao Sevin[®], sendo inibida nas maiores concentrações (1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) nos animais expostos ao Folisuper 600[®].

Isso corrobora com os estudos que propõem que os organofosforados têm uma ligação mais forte com a enzima AChE do que os carbamatos (MÍDIO e SILVA, 1995; MORAES, 1998).

Nos organismos aquáticos há uma considerável diversidade nas propriedades bioquímicas e na distribuição da acetilcolinesterase, assim como, na sua sensibilidade aos agentes anticolinesterásicos (LIONETTO *et al.*, 2003). Em *Cyprinus carpio* houve uma inibição de 55-57 % da AChE cerebral em indivíduos expostos ao Trichlorfon por 24 horas, sendo a atividade da enzima restaurada somente após sete dias (CHANDRASEKARA *et al.*, 2005). SILVA *et al.* (1993) observaram em *Callichthys callichthys* intoxicados com Folidol 600[®] (paration metílico) um retorno dos níveis normais de colinesterase oito dias após a exposição, provavelmente, como consequência da desintoxicação do paration metílico e da síntese *de novo* desta enzima

SARIKAYA *et al.* (2004) investigaram a toxicidade aguda do inseticida fenitrothion em *Corydoras paleatus* e encontraram o valor de CL_{50} de $3,51 \text{ mg.L}^{-1}$. As mudanças comportamentais após a exposição foram típicas de neurotoxicidade: menor atividade geral em relação ao grupo controle, perda do equilíbrio, natação irregular e menor movimentação em certos locais, geralmente no nível médio de água por períodos prolongados.

Estudos *in vitro* de STURM *et al.* (2000) mostraram que a BChE do músculo foi três vezes mais sensível do que a AChE do cérebro e do músculo em peixes expostos aos organofosforados paraoxon e diclorvos. Em outro estudo com o mesmo método, estes resultados foram encontrados para as espécies *Limanda limanda*, *Serranus cabrilla* e *Platichthys flesus* (STURM *et al.*, 1999). WHITEHEAD *et al.* (2005) tiveram como resultado maior sensibilidade da AChE muscular ao diazinon em *Catostomus occidentalis*.

Carbaril, em concentrações subletais, exerce um efeito inibitório na atividade da acetilcolinesterase em tecidos de peixe. Num estudo realizado por SHARMA *et al.* (1993) o carbaril causou maior inibição na atividade da acetilcolinesterase de cérebro e brânquias do que de fígado e músculo. A inibição foi mais pronunciada com concentrações subagudas do pesticida ($1,0$; $2,0$ e $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$) por 15 dias do que por 96 horas.

A AChE cerebral de *Ictalurus punctatus* foi sensível ao carbamato Aldicarb, mas os peixes mesmo com 90% da atividade neuronal diminuída foram capazes de sobreviver tendo apenas sinais moderados de toxicidade. Estes dados sugeriram que a inibição da AChE muscular é o fator mais importante na mortalidade de peixes expostos ao Aldicarb. A perda do controle muscular pode causar vários problemas para o peixe, incluindo perda do controle da natação e cessação do movimento opercular (PERKINS e SCHLENK, 2000).

Com relação aos peixes expostos ao piretróide Decis[®] não houve diferença significativa na atividade da AChE entre os grupos-teste e controle. A literatura descreve que outros compostos além dos organofosforados e carbamatos parecem ter capacidade de inibir as colinesterases, porém segundo STURM *et al.* (1999) as concentrações destes inibidores requeridas para promover efeitos sobre a AChE seriam relativamente altas em relação aos organofosforados e carbamatos. Essa poderia ser uma explicação para a ausência do efeito do piretróide sobre a enzima neste estudo.

Com este estudo foi possível demonstrar que a acetilcolinesterase de *Corydoras sp.* pode ser utilizada como biomarcador de contaminação ambiental por Sevin[®] (carbaril) e Folisuper 600[®] (paration metílico), pois a enzima foi inibida de 74 até 99,7%. O cérebro foi o tecido que apresentou maior sensibilidade, pois houve inibição da enzima em todas as concentrações.

A GST está envolvida na desintoxicação de xenobióticos e excreção destes e de seus metabólitos (MONTEIRO *et al.*, 2006). A GST pode ser induzida por pró-oxidantes e/ou compostos eletrofílicos através de uma resposta antioxidante (FERRARI *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados revelaram uma ausência de indução da enzima nos peixes expostos ao Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®]. Somados a estes resultados concentrações de azinfósmetil falharam em induzir a atividade da GST em fígado e rim de carpas (*Cyprinus carpio*). Tem sido reportado que a indução desta enzima em peixes é variável e tem alta variabilidade individual entre espécies. ERP *et al.* (2002) encontraram que a atividade da GST da aranha *Lycosa hilaris* não foi afetada pelo clorpirifós enquanto, KHEIR *et al.* (2001) também não encontraram indução da GST por pirimifósmetil em *Chironomus riparius*.

Em peixes *Gambusia yucatanana* não foi observado nenhum efeito na atividade da GST quando expostos ao glifosato e clorpirifós (sozinhos ou em mistura) sugerindo que a GST não participa da desintoxicação destes compostos. Os autores do estudo afirmam que estes resultados podem ser parciais, uma vez que existem várias isoformas de GST. No entanto, o carbofuran inibiu a GST de *Gambusia yucatanana* (RENDÓN-VON OSTEN *et al.*, 2005).

JENSEN *et al.* (1991) trabalhando com a truta arco-íris verificaram que o inseticida endossulfano não interferiu na atividade da GST utilizando os substratos CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e DCNB (1,2-dicloro-4-nitrobenzeno).

TRUTE *et al.* (2007) também não verificaram inibição da GST pela atrazina e clorpirifós e pouca inibição por paration metílico indicando que o fígado do salmão (*Oncorhynchus kisutch*) tem sensibilidade limitada à inibição mediada por pesticidas e isto pode levar estas espécies à suscetibilidade a injúrias químicas.

Entretanto, alterações significativas na atividade da GST também são reportadas por outros autores (SANDVIK *et al.*, 1997; EGAAS *et al.*, 1999; SAYEED *et al.*, 2003 e MONTEIRO *et al.*, 2006). A resposta da GST aos tóxicos é controversa porque ela é altamente dependente do tipo de xenobiótico, da concentração e tempo de exposição ao xenobiótico e das espécies envolvidas (FERRARI *et al.*, 2007). Devido apresentarem várias isoformas nem todas podem ser alteradas por todos os xenobióticos. Uma segunda razão para os resultados encontrados pode ser que o CDNB, substrato utilizado, não é específico para a GST induzida por estes xenobióticos (CLARK *et al.*, 1986).

A catalase é principalmente localizada nos peroxissomos e é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio produzido pelo metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa nos peroxissomos (ZHANG *et al.*, 2004). Em alguns estudos a catalase é induzida em resposta à

exposição a pesticidas, metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (RODRIGUES-ARIZA *et al.*, 1993; DIMITROVA *et al.*, 1994; FERRARI *et al.*, 2007). Entretanto, a atividade desta enzima em peixes pode ser reduzida após exposição a xenobióticos como reportado por LIVINGSTONE (2001). Neste trabalho observou-se uma tendência de redução da atividade da catalase nos grupos expostos aos pesticidas, mas não houve diferença estatisticamente significativa. Alguns autores relatam que o fluxo de radicais superóxido pode estar inibindo esta enzima quando ocorre exposição a pesticidas.

SAYEED *et al.* (2003) verificaram redução da atividade da CAT em fígado e rim de *Channa punctatus* expostos a deltametrina.

KAVITHA e RAO (2007) demonstraram uma indução da atividade da CAT pelo pesticida monocrotofós em *Gambusia affinis*. As enzimas superóxido dismutase e catalase são a primeira linha de defesa do organismo contra radicais de oxigênio e um marcador para toxicidade por pesticidas gerada por espécies reativas de oxigênio.

DURMAZ *et al.* (2006) não verificaram alteração na CAT de rins, brânquias e músculos de *Oreochromis niloticus* expostos ao diazinon indicando que a atividade da CAT basal foi suficiente para remover o peróxido de hidrogênio.

MONTEIRO *et al.* (2006) utilizando o Folisuper 600[®], mesmo pesticida utilizado neste trabalho, encontrou uma indução na atividade da CAT em peixes *Brycon cephalus*, demonstrando que a ausência de efeito em *Corydoras sp.* pode ser devido a características desta espécie.

O dano oxidativo pode ocorrer quando o sistema de desintoxicação e antioxidante são deficientes e não são capazes de neutralizar os intermediários ativos produzidos pelos xenobióticos e seus metabólitos. A oxidação de ácidos graxos polinsaturados leva a lipoperoxidação (LPO). A peroxidação lipídica pode ser o primeiro passo de dano à membrana celular por pesticidas (ORUÇ *et al.*, 2004). Entretanto, neste estudo, os pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] não foram capazes de causar lipoperoxidação, estatisticamente significativa. Baixos níveis de peroxidação lipídica nos tecidos refletem os efeitos protetores das enzimas oxidativas. No entanto, não se verificou alteração na atividade das enzimas GST e CAT indicando que outro mecanismo que não enzimas antioxidantes possa estar atuando.

RODRIGUEZ-ARIZA *et al.* (1993) mostrou uma inibição da lipoperoxidação nas mesmas espécies de peixe na presença de PCBs, PAHs e pesticidas, mas em outras espécies um aumento foi observado na exposição ao Aroclor 1254 (PCB). Os resultados mostram grande variabilidade para este biomarcador.

Devido às implicações ecológicas associadas a genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Alguns tipos de contaminantes encontrados em ambientes aquáticos aumentam significativamente o número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, quando os peixes são expostos a compostos como PCBs, PAHs e pesticidas (HOSE *et al.*, 1987).

Com base nisso, o Teste do Micronúcleo Písceo foi utilizado neste estudo, porém não foram encontradas alterações morfológicas nucleares nem micronúcleos em nenhum dos grupos expostos aos três pesticidas.

Alguns autores (AL-SABTI e METCALFE, 1995; SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999; PORTO *et al.*, 2005; KIM e HYUN, 2006) discutem a sensibilidade do Teste do Micronúcleo Písceo quando utilizado em experimentos *in situ*. Foram observadas diferenças de resposta em espécies coletadas em locais poluídos e não poluídos sugerindo que algumas delas são mais ou menos adequadas para estudos *in situ*. Este pode ser o caso da espécie utilizada, porém não foram encontrados dados na literatura com *Corydoras sp.* para comparação de resultados.

Verifica-se que não foram observadas diferenças significativas nas atividades das enzimas GST e CAT e também na LPO, além de não ter ocorrido alteração genética detectável pelo Teste do Micronúcleo Písceo. Na literatura há relatos de alteração na atividade das enzimas e também na LPO em estudos com pesticidas pertencentes aos mesmos grupos testados. Por isso, supõe-se que o que está influenciando nas respostas aos pesticidas é o metabolismo da espécie testada. Provavelmente, esta espécie possui alguma via metabólica alternativa para metabolizar estes pesticidas. Os resultados sugerem que *Corydoras sp.* pode não ser a espécie mais sensível e apropriada para estudos de detecção de pesticidas utilizando biomarcadores. Contudo, a enzima AChE foi alterada pelo carbamato e pelo organofosforado. Em relação ao piretróide Decis[®], a alta volatilidade e fotossensibilidade deste composto pode ter contribuído para a ausência de efeito, pois nenhum dos parâmetros testados foi alterado.

No entanto, estudos com espécies resistentes são importantes, pois elas também estão presentes no ambiente aquático e se seu sistema enzimático estiver alterado provavelmente, o ecossistema estará altamente impactado.

6 – CONCLUSÕES

A AChE confirmou-se um biomarcador específico para organofosforados (Folisuper 600[®]) e carbamatos (Sevin[®]) em *Corydoras sp.*, sendo que o cérebro mostrou-se o tecido mais sensível.

Os pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] não causaram estresse oxidativo em *Corydoras sp.*

Os pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] não causaram dano genético em *Corydoras sp.* detectável através do Teste do Micronúcleo Písceo.

CAPÍTULO II:
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SEVIN[®], FOLISUPER 600[®] E DECIS[®]
EM HEPATÓCITOS DE *Hypostomus commersoni*

1- INTRODUÇÃO

A toxicologia é uma ciência que utiliza diferentes abordagens para identificar ameaças e entender os processos básicos que ocorrem nos sistemas biológicos. Modelos *in vitro* que retenham as condições básicas das interações *in vivo* mais complexas são muitos úteis nesse campo de pesquisa (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Dentre as diversas células diferenciadas de vertebrados, os hepatócitos são provavelmente as mais versáteis do ponto de vista metabólico. O fígado possui importância chave na manutenção da homeostase interna em vertebrados. Ele adapta-se a flutuações nas condições ambientais por continuamente ajustar as estruturas e funções hepatocelulares, como: metabolismo de nutrientes, estoque de energia (glicogênio e lipídios), síntese e secreção de proteínas (albumina, vitelogenina, lipoproteínas etc), manutenção dos níveis de glicose do plasma, eliminação de compostos nitrogenados depois da formação de uréia e amônia, metabolismo de xenobióticos, metabolismo de hormônios e formação da bile. A natureza altamente dinâmica do fígado e sua regulação em muitos processos metabólicos e fisiológicos fazem deste órgão um valioso modelo de estudo de mecanismos de aclimatação ambiental (SEGNER, 1998). Células isoladas de fígado proporcionam um excelente sistema para avaliar vários aspectos do metabolismo hepático, incluindo os processos celulares e bioquímicos envolvidos na ativação de químicos tóxicos e poluentes ambientais (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Dentre os diversos ensaios *in vitro* com hepatócitos, o cultivo primário merece um destaque especial, pois permite ensaios biomecânicos bastante elaborados e sofisticados, onde as células são mantidas sem a complexidade da interação sistêmica (SEGNER, 1998).

Hepatócitos recém-isolados respondem aos sinais para os quais eles respondiam antes da dissociação do fígado e são ricos em enzimas de metabolismo de xenobióticos (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Os dados disponíveis indicam uma maior estabilidade em enzimas de biotransformação de teleósteos que de mamíferos (PESONEN e ANDERSON, 1997).

Para o cultivo de hepatócitos de peixe é necessário identificar condições que previnam, ou ao menos reduzam, a perda de diferenciação e viabilidade das células isoladas. Os fatores que mudam com a transferência do ambiente *in vivo* para o *in vitro* incluem o suprimento de sangue (provisão de nutrientes, fatores endócrinos, remoção de metabólitos etc) e o microambiente celular (contato celular e componentes de matriz extracelular). Portanto, parece ser necessário que fatores como os componentes solúveis do meio, a matriz extracelular e as interações célula-célula sejam recriadas *in vitro* (GUILLOUZO *et al.*, 1990).

As metodologias de isolamento de hepatócitos já estão bem conhecidas para diversos peixes exóticos (truta, carpa, salmão, linguado etc). A história evolutiva de espécies exóticas é, geralmente, diferente da vivida por espécies nativas. Portanto, modelos importados não necessariamente aplicam-se aos ecossistemas brasileiros, o que requer o desenvolvimento de modelos empregando espécies nativas, como a espécie *Hypostomus commersoni*.

A espécie *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836) – cascudo – (Figura 21) – pertence à Ordem siluriformes e à Família Loricariidae. Possui ampla distribuição na América do Sul. Ocorre em rios e lagos e alimenta-se de detritos e algas presentes no fundo (FISHBASE, 2007).



Figura 01 – Exemplar de *Hypostomus commersoni* – cascudo. Peixe mantido no Laboratório de Toxicologia Ambiental – Setor de Ciências Biológicas em aquários de 120 L (A,B).

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] em cultura primária de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*.

2.2 – OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar possíveis efeitos citotóxicos do Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] através de biomarcadores bioquímicos: atividade da catalase, atividade da glutatona S-transferase e lipoperoxidação.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS PEIXES

Os oito peixes *Hypostomus commersoni* foram obtidos de uma Estação de Piscicultura na região de Araucária. Os animais foram transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR sendo mantidos individualmente em aquários estoques de 120 L, com fotoperíodo de 12 h, aeração constante e temperatura da água de 23 ± 2 °C.

3.2 – ISOLAMENTO DAS CÉLULAS

As culturas foram realizadas no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Biologia Celular, segundo o método de FILIPAK NETO (2006) modificado por BUSSOLARO (2008). Foram realizadas quatro culturas, sendo que para cada cultura primária realizada, dois espécimes de peixe foram anestesiados (MS222 a 0,02% em água). Após procedeu-se a eutanásia por secção espinhal logo abaixo do crânio. A assepsia foi realizada com etanol a 70% e clorexidina alcoólica a 2%. O espécime foi levado ao fluxo laminar e o fígado foi cuidadosamente removido para uma placa de Petri. O órgão foi, em seguida, cortado com auxílio de pinças e lâmina de bisturi em solução de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4) contendo EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a 0,02%, tripsina a 0,05%. Empregando pipetas *Pasteur* de plástico estéril, os pedaços de tecido e células foram gentilmente aspirados e

espirados durante 10-20 min e passados através de uma tela de metal (poros de aproximadamente 1 mm) para melhor dissociação das células. As células foram coletadas em PBS ou meio de cultura, lavadas e centrifugadas em baixa rotação (100-120 x g) para remoção de células rompidas e restos de fígado.

3.3 – CONDIÇÕES PARA O CULTIVO CELULAR

As células foram semeadas em garrafas de cultura Corning® de 25 e 75 cm² com meio RPMI 1640 (D-glucose a 2 g.L⁻¹) suplementado com HEPES (15 mM), NaHCO₃ (6mM), insulina mista (0,1 U.ml⁻¹), sulfato de gentamicina (40 mg.L⁻¹) e soro bovino fetal (5%). As garrafas foram mantidas a 22 °C em estufa convencional (pCO₂ atmosférica).

3.4 – RENDIMENTO DO ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O número de células isoladas foi determinado por contagem manual em câmara Neubauer e correlacionado com a massa do fígado (verificada antes da dissociação das células).

A viabilidade celular foi estimada através do teste de exclusão do corante azul de Tripán. Com essa finalidade, meio de cultura contendo células em suspensão (20 µL) e o corante azul de Tripán a 0,4% (20 µL) foram adicionados a um tubo de 0,5 mL e misturados. Após 1 min, 200 células foram classificadas visualmente em viáveis (células não coradas e com membrana íntegra) e não viáveis (células coradas e com membrana não íntegra) sob microscopia de campo claro.

3.5 – PRÉ-TRATAMENTO PARA MELHORAR A ADESÃO CELULAR

As garrafas de cultura foram previamente tratadas com colágeno do tipo I desnaturado (gelatina) para melhorar a adesão das células.

3.6 – DESENHO EXPERIMENTAL

Primeiramente, as células foram cultivadas por três dias para que houvesse recuperação do procedimento de isolamento, adesão e reagregação. Então, a maioria das células não aderidas e mortas foi removida na troca do meio antigo por um meio novo contendo os pesticidas. Foram estabelecidos oito grupos experimentais: grupo controle (sem exposição aos pesticidas), grupo controle solvente (acetona a 0,00018%), CB I (células expostas a Sevin® equivalente a 20 µM de

carbaril), CB II (células expostas a Sevin[®] equivalente a 200 µM de carbaril), MP I (células expostas a Folisuper 600[®] equivalente a 5 µM de paration metílico) e MP II (células expostas a Folisuper 600[®] equivalente a 50 µM de paration metílico), DC I células expostas a Decis[®] equivalente a 10 nM de deltametrina), DC II (células expostas a Decis[®] equivalente a 100 nM de deltametrina). As células foram cultivadas com (grupos expostos) e sem (grupos controle) os xenobióticos durante quatro dias, sem troca de meio de cultura durante a exposição.

Após os quatro dias de exposição, as células foram removidas com o emprego do *cellscraper* e ressuspensas em 750 µL de PBS. As células foram mantidas em freezer -70°C até a realização das análises.

3.7 – ANÁLISES DOS BIOMARCADORES

3.7.1 – Atividade da Glutathione S-transferase

A atividade da glutathione S-transferase foi monitorada através do aumento da absorbância ($\lambda = 340$ nm) resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

As amostras foram descongeladas em gelo (item 3.3.5 do Capítulo I) e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C (item 3.3.4 do Capítulo I). O volume de 50 µL do sobrenadante da amostra foi adicionado a microplaca e imediatamente antes das leituras, 100 µL de solução reação (GSH a 1,5 mM, CDBN a 2,0 mM, tampão fosfato pH 6,5 e etanol a 4%) foram rapidamente acrescentados (KEEN *et al.*, 1976). A absorbância em espectrofotômetro TECAN A-5082. Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$.

3.7.2 – Atividade da Catalase (CAT)

As amostras (células em PBS) foram descongeladas como descrito anteriormente para LPO e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C. As leituras procederam-se em intervalos de 2 s ($\lambda = 240$ nm) imediatamente após serem adicionados a uma cubeta de quartzo e serem misturados por inversão, 990 µl de solução reação 20 mM (Tris-base a 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0, 25°C; peróxido de hidrogênio a 20 mM e água miliqué) e 10 µl de amostra. O decréscimo gradual na absorbância devido a degradação de peróxido de hidrogênio foi registrado num intervalo de 1 min e 10 s segundo o método de AEBI (1984). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$.

3.7.3 – Lipoperoxidação (LPO)

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de *FOX* (JIANG *et al.*, 1992).

As amostras foram descongeladas em gelo, submetidas ao ultrassom por 2 min em gelo, após acréscimo de metanol (600 μL) e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, 30 μL do sobrenadante mais 270 μL da solução reação [(laranja de xilenol a 100 μM , H_2SO_4 a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 μM (acrescentados na seqüência descrita a metanol 90%)] foram adicionados à microplaca. Após 30 min de reação à temperatura ambiente em microplacas tampadas, para reduzir a evaporação do metanol, procedeu-se a medida da absorbância em espectrofotômetro de microplaca TECAN A-5082 ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$).

3.7.4 – Análise da concentração de proteína

Para a quantificação da proteína nas amostras foi utilizado o método de BRADFORD (1976), com curva padrão de soro de albumina bovina. Em microplaca, adicionaram-se 10 μL do sobrenadante das amostras seguidos de 250 μL do reagente de Bradford e as leituras de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 620 nm em espectrofotômetro TECAN A-5082.

3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios bioquímicos e de viabilidade foram analisados estatisticamente através do Programa *GraphPad Prism 3* por ANOVA de uma via para determinar se havia diferença entre os grupos, seguida de Prova de Bonferroni para demonstrar qual grupo diferia do controle, com $p < 0,05$ e expressos em média \pm erro padrão da média.

4 – RESULTADOS

4.1 – RENDIMENTO DO ISOLAMENTO E VIABILIDADE CELULAR

Em relação ao rendimento do isolamento (total de células isoladas por grama de órgão) obteve-se 6 a 8×10^6 hepatócitos por grama de fígado.

A viabilidade celular após 96 horas de exposição aos pesticidas foi em média de 73%. Houve uma redução de 34% (estatisticamente significativa) em relação ao controle no grupo DMI (Figura 22).

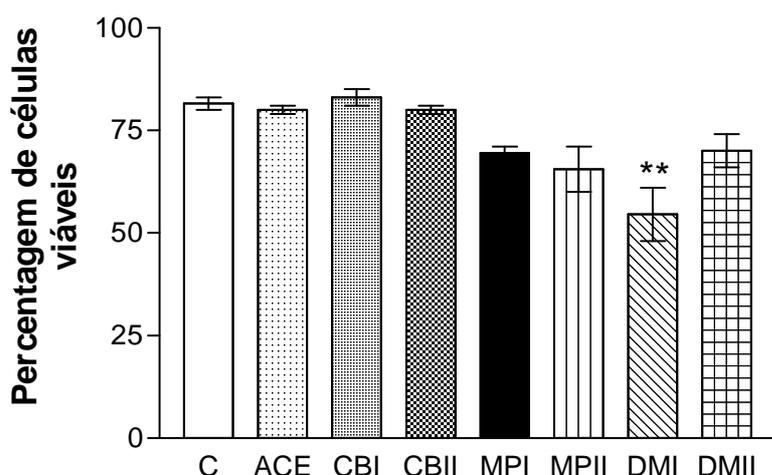


Figura 02 – Viabilidade celular estimada através do ensaio de exclusão com azul de tripan. Viabilidade em nº de células viáveis a cada 100 células. C = controle; ACE = acetona; CBI = Sevin[®] equivalente a 20 µM de carbaril; CBII = Sevin[®] equivalente a 200 µM de carbaril; MPI = Folisuper 600[®] equivalente a 5 µM de paration metílico; MPIO = Folisuper 600[®] equivalente a 50 µM de paration metílico; DMI = Decis[®] equivalente a 10 nM de deltametrina e DMII = Decis[®] equivalente a 100 nM de deltametrina ** = difere significativamente do controle (p<0,05) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni.

4.2 – MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS EM CULTURA

No tempo zero verifica-se que os hepatócitos de *Hypostomus comersoni* são células arredondadas (Figura 23A). Após três dias de cultura (Figura 23B) observa-se um processo de migração e reorganização da cultura, o que pode ser evidenciado pelas mudanças no formato celular após adesão, reorganização de especializações de membrana e pela delimitação de espaços não ocupados pelas células. No sétimo dia de cultura (Figura 23C) observa-se uma reagregação de células e delimitação de espaços não ocupados pelas células.

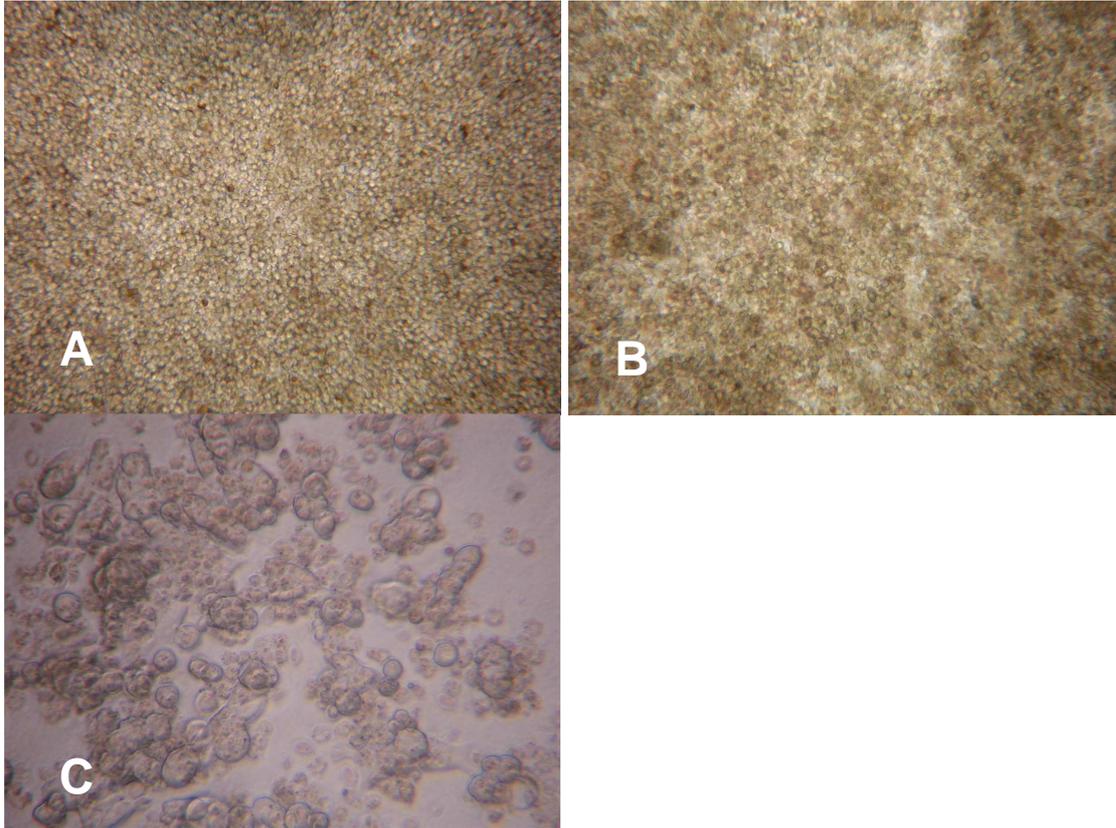


Figura 03 – Morfologia de hepatócitos em cultura. A=tempo 0; B= três dias de cultura e C= sete dias de cultura.

4.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE E LIPOPEROXIDAÇÃO

Na maior concentração do pesticida organofosforado (grupo MPII) ocorreu indução da atividade da catalase, o que não foi observado em relação aos demais grupos (Figura 24).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação à atividade da glutathione S-transferase e lipoperoxidação (Figuras 25 e 26).

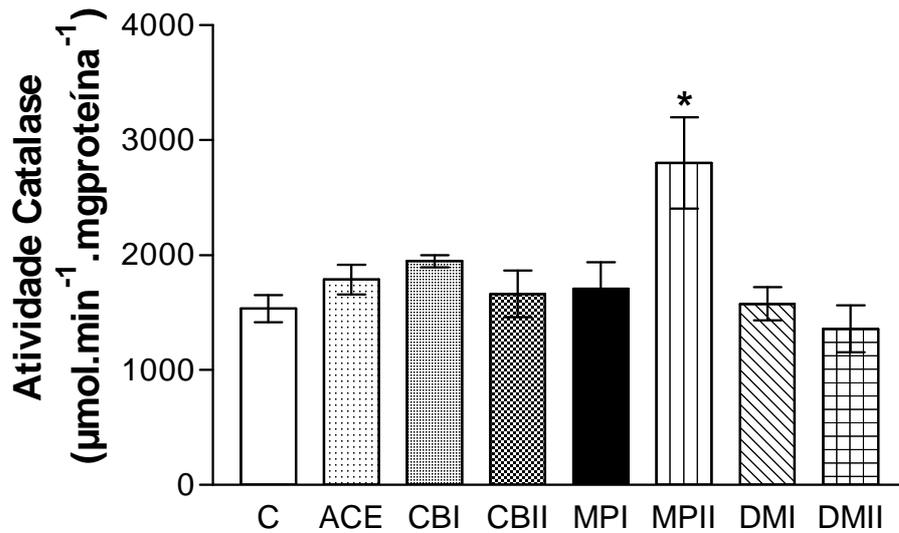


Figura 04 – Atividade da Catalase de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*. C = controle; ACE = acetona; CBI = Sevin[®] equivalente a 20 µM de carbaril; CBII = Sevin[®] equivalente a 200 µM de carbaril; MPI = Folisuper 600[®] equivalente a 5 µM de paration metílico; MPII = Folisuper 600[®] equivalente a 50 µM de paration metílico; DMI = Decis[®] equivalente a 10 nM de deltametrina e DMII = Decis[®] equivalente a 100 nM de deltametrina. As barras expressam a média da atividade da CAT ± erro padrão * = difere significativamente do controle (p<0,05) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni.

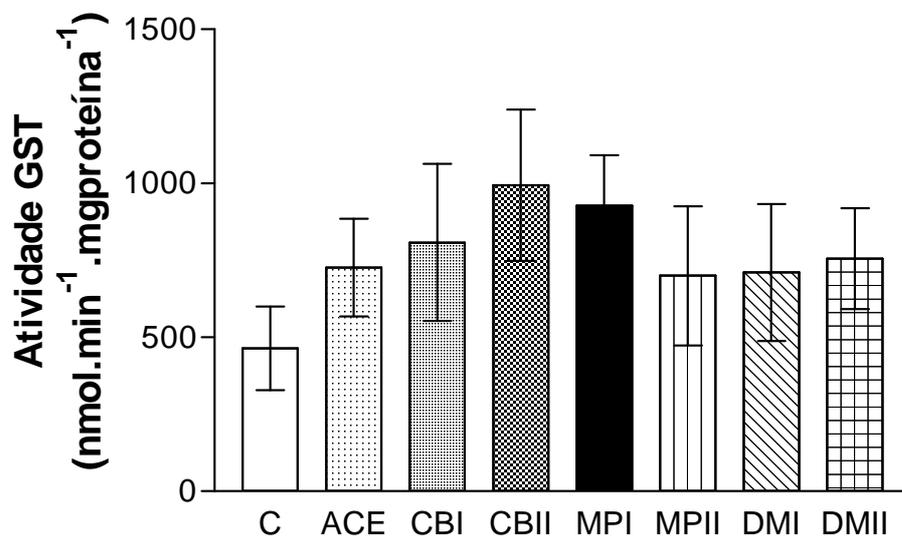


Figura 05 – Atividade da Glutathione S-transferase de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*. C = controle; ACE = acetona; CBI = Sevin[®] equivalente a 20 µM de carbaril; CBII = Sevin[®] equivalente a 200 µM de carbaril; MPI = Folisuper 600[®] equivalente a 5 µM de paration metílico; MPII = Folisuper 600[®] equivalente a 50 µM de paration metílico; DMI = Decis[®] equivalente a 10 nM de deltametrina e DMII = Decis[®] equivalente a 100 nM de deltametrina. As barras expressam a média da atividade da GST ± erro padrão.

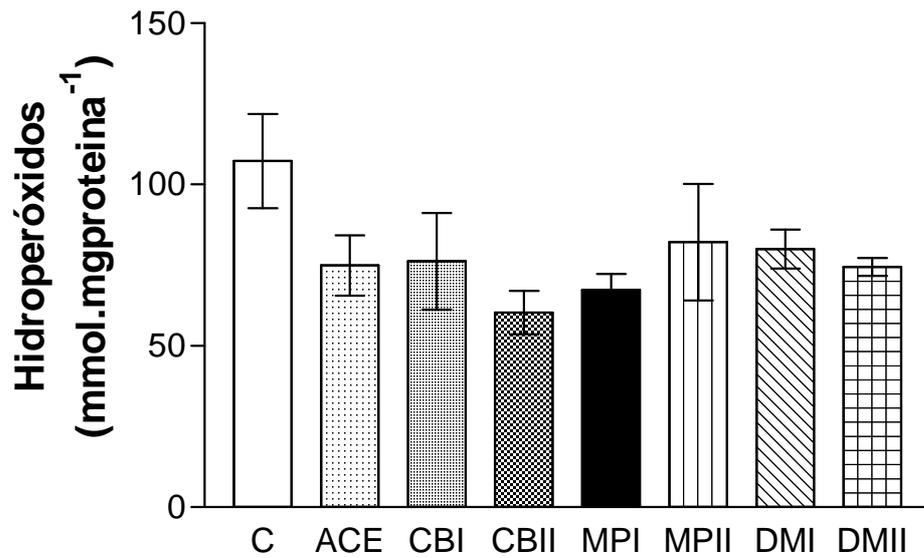


Figura 06 – Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*. C = controle; ACE = acetona; CBI = Sevin[®] equivalente a 20 µM de carbaril; CBII = Sevin[®] equivalente a 200 µM de carbaril; MPI = Folisuper 600[®] equivalente a 5 µM de paration metílico; MPIO = Folisuper 600[®] equivalente a 50 µM de paration metílico; DMI = Decis[®] equivalente a 10 nM de deltametrina e DMII = Decis[®] equivalente a 100 nM de deltametrina. As barras expressam a média da concentração de hidroperóxidos ± erro padrão.

5 – DISCUSSÃO

Os testes experimentais envolvendo os estudos dos efeitos dos poluentes em organismos aquáticos são baseados no reconhecimento de que a resposta do organismo ao tóxico é dependente do nível de exposição a este agente. Este princípio é a descrição da relação entre concentração e resposta (ZHANG *et al.*, 2004).

Com base nisso, foi testada a toxicidade de três grupos de pesticidas em hepatócitos de *Hypostomus commersoni*, através do uso de biomarcadores. A espécie *Hypostomus commersoni* pertence ao mesmo nível trófico da espécie *Corydoras sp.* utilizada no estudo *in vivo*. Devido ao estudo *in vitro* ter algumas vantagens sobre os estudos *in vivo* ele foi utilizado neste trabalho. Dentre estas vantagens pode-se citar: a possibilidade de um controle rigoroso das condições experimentais (condições físico-químicas do ambiente celular e concentração fisiológica dos íons); a facilidade em se aumentar o número de réplicas; a baixa variabilidade experimental; a geração de menos resíduos tóxicos; o menor número de espécimes requeridos para os estudos; ensaios geralmente rápidos; e de custo não elevado; além de não causarem sofrimento aos animais, senão àquele do seu sacrifício. Apesar destas vantagens dos sistemas *in vitro* estes modelos possuem algumas limitações em comparação com os sistemas *in vivo*, tal como: a dificuldade de extrapolar os dados para a situação encontrada no organismo devido à perda das interações entre tecidos e órgãos. Os estudos *in vivo* e *in vitro* devem ser integrados para uma aquisição holística de dados sobre toxicidade (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2007).

A catalase foi um dos biomarcadores avaliados e apresentou uma indução de sua atividade no grupo exposto ao Folisuper 600[®] na concentração equivalente a 50 µM de paration metílico, demonstrando uma toxicidade potencial deste pesticida. Um dos papéis da CAT é reduzir o risco de formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio. Isso é de grande importância, uma vez que a permeabilidade das membranas biológicas ao peróxido de hidrogênio é superior a de qualquer outra espécie reativa de oxigênio e ele pode servir como uma fonte de hidroxila (NORDBERG e ARNÉR, 2001). A hidroxila pode oxidar qualquer biomolécula, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (BREEN e MURPHY, 1995). A elevada concentração de peróxido de hidrogênio pode ter estimulado a transcrição enzimática e como consequência aumento de sua atividade (FILIPAK NETO, 2007).

Hepatócitos de *Hoplias malabaricus* quando expostos ao DDT tiveram uma indução da atividade da CAT gerada pela produção de espécies reativas de oxigênio (FILIPAK NETO, 2007).

Outros autores, entretanto, relatam que a redução na catalase indica citotoxicidade devido à produção de espécies reativas de oxigênio. JIA e MISRA (2007) verificaram uma redução da catalase em células do neuroblastoma humano (SH-SY5Y) expostas ao endossulfano e zineb. O fungicida iprodiona também provocou redução da CAT em hepatócitos de truta arco-íris (RADICE *et al.*, 2001).

Com base nisso, pode-se verificar que a atividade da catalase pode ser inibida ou induzida em resposta à produção de espécies reativas de oxigênio, a resposta depende do pesticida analisado e da espécie estudada.

Nos grupos expostos aos pesticidas Sevin[®] e Decis[®] não houve alteração desta enzima, demonstrando que não foi gerado estresse oxidativo.

O processo de LPO é propagado via uma cadeia autocatalítica de reações e influencia a fluidez de membrana bem como a integridade de biomoléculas associadas à membrana. O resultado da LPO pode ser dano estrutural à membrana e a geração de produtos de oxidação, alguns dos quais são reativos e podem causar dano tecidual (MONTINE *et al.*, 2004). Estudos demonstrando aumento da LPO após exposição a xenobióticos são comuns. A LPO aumentou em células hepáticas humanas (WRL - 68) expostas ao mercúrio (BUCIO *et al.*, 1999); em células do neuroblastoma humano (SH-SY5Y) expostas ao endossulfano e zineb (JIA e MISRA, 2007) e em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* expostos ao DDT (FILIPAK NETO, 2007).

Entretanto, o mesmo não ocorreu no presente trabalho, onde se verificou que a LPO (medida em concentração de hidroperóxidos) não foi estatisticamente diferente entre controle e grupos-teste. Isso indica que as concentrações utilizadas de pesticidas não foram capazes de alterar a membrana, podendo-se estender esta afirmação inclusive para o grupo MPII que apresentou indução da catalase.

A GST está envolvida na biotransformação de xenobióticos e excreção destes e de seus metabólitos. Ela exerce um papel importante na proteção do tecido contra o estresse oxidativo (MONTEIRO *et al.*, 2006). A GST pode ser induzida atuando como enzima antioxidante frente a xenobióticos. Entretanto, os resultados revelaram uma ausência de indução da enzima nos peixes expostos ao Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®]. Vários trabalhos revelam que a resposta desta enzima aos xenobióticos é altamente variável dependendo da espécie analisada.

DIERICKX (2001) não verificou alteração da GST em células derivadas de hepatoma de rato (Fa32) expostas ao quinalfós e diamide, entretanto, os pesticidas alaclor, metolaclor, propaolol, carbaril, benomil e carbendazim induziram a GST.

Os pesticidas carbaril, quinalfós, benomil e o carbendazim foram investigados em células derivadas de hepatoma de rato (Fa32) e humano (Hep G2) e causaram citotoxicidade evidenciada pela indução da EROD, além da glutathione ter mostrado um efeito protetor contra os pesticidas (DIERICKX, 1999).

O carbamato clorprofam induziu disfunção mitocondrial evidenciada pela rápida depleção de ATP via fosforilação oxidativa (NAKAGAWA *et al.*, 2004).

Em relação à viabilidade celular, não houve redução exceto para o grupo exposto à menor concentração de deltametrina (DMI). Revelando-se este pesticida como causador de morte celular no referido grupo, embora não tenha alterado nenhuma das enzimas testadas.

6 – CONCLUSÃO

O pesticida Sevin[®] não alterou as enzimas testadas, não causando estresse oxidativo para hepatócitos de *Hypostomus commersoni*.

O Folisuper 600[®] alterou a atividade da catalase demonstrando potencial tóxico, no entanto, a biotransformação não foi alterada e não ocorreu dano de membrana.

Em relação ao Decis[®], houve uma redução da viabilidade celular no grupo exposto à menor concentração do pesticida, porém não causou alteração da atividade da CAT e GST e nem LPO.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] foram investigados neste trabalho em dois estudos: *in vivo* (Capítulo I) e *in vitro* (Capítulo II).

No Capítulo I, foram analisadas as atividades das enzimas acetilcolinesterase cerebral e muscular para avaliar a ocorrência de neurotoxicidade e também a atividade da glutathione S-transferase, da catalase e a lipoperoxidação para avaliar o estresse oxidativo na espécie *Corydoras sp.* A genotoxicidade também foi avaliada através do Teste do Micronúcleo Písceo. Neste capítulo utilizou-se o estudo *in vivo* no qual ocorrem interações entre tecidos e órgãos.

A AChE confirmou-se um biomarcador específico para organofosforados (Folisuper 600[®]) e carbamatos (Sevin[®]), mas os pesticidas Sevin[®], Folisuper 600[®] e Decis[®] não causaram dano genético em *Corydoras sp.* detectável através do Teste do Micronúcleo Písceo e nem estresse oxidativo.

Como na literatura vários estudos demonstram a geração de estresse oxidativo quando estudados pesticidas pertencentes aos mesmos grupos testados supõem-se que o que está influenciando nas respostas aos pesticidas é o metabolismo da espécie testada. Com base nestes resultados o Capítulo II (estudo *in vitro*) foi realizado com o objetivo de verificar qual seria o comportamento dos pesticidas diretamente nos hepatócitos, sem a interferência do metabolismo do organismo. Para tanto, foi utilizada a espécie *Hypostomus commersoni* pertencente à mesma Ordem e nível trófico de *Corydoras sp.* (espécie testada no Capítulo I).

No Capítulo II, o Folisuper 600[®] alterou a atividade da catalase demonstrando potencial tóxico e o Decis[®] reduziu a viabilidade celular em um dos grupos, mas o Sevin[®] não alterou as enzimas testadas, não causando estresse oxidativo para hepatócitos de *Hypostomus commersoni*.

Com base nos resultados dos dois Capítulos verifica-se que o carbamato Sevin[®] inibiu a AChE cerebral demonstrando neurotoxicidade, mas não alterou nenhum dos outros parâmetros analisados tanto *in vivo* como *in vitro*.

A menor concentração do piretróide Decis[®] reduziu a viabilidade celular no estudo *in vitro*, mas nenhum dos outros parâmetros foi alterado em ambos os estudos.

O organofosforado Folisuper 600[®] foi o que gerou maior toxicidade entre os pesticidas testados, inibiu tanto a AChE muscular como cerebral em níveis próximos a 100% (*in vivo*) além de induzir a catalase *in vitro*. Os outros parâmetros não foram alterados por este pesticida.

Considerando estes resultados verifica-se a necessidade de mais estudos para elucidar que aspectos do metabolismo de *Corydoras sp.* estão envolvidos na desintoxicação destes pesticidas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. **Catalase *in vitro***. Academia Press, New York. p. 121-126, 1984.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monografia de pesticidas 2003b. **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 28 de novembro de 2006.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research** 343: 121-135, 1995.

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

ARANHA, J.M.R.; CARAMASCHI, E.P.; CARAMASCHI, U. Ocupação espacial, alimentação e época reprodutiva de duas espécies de *Corydoras* Lacépède (Siluroidei, Callichthyidae) coexistentes no Rio Alambari (Botucatu, São Paulo). **Revista Brasileira de Zoologia** 10: 453-466, 1993.

ARAÚJO, S. L. **Ratos Wistar expostos aos inseticidas Lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós em testes reprodutivos de curta e longa duração**. Curitiba, 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BAKER, R.C.; KRAMER, R.E. Citotoxicity of short-chain alcohols. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 39:127-150, 1999.

BAKSI, S.M.; FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research. **Aquatic Toxicology** 56: 16-229, 1990.

BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, Z.S.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology** 33: 279-295, 1995.

BANERJEE, B.D.; SETH, V.; BHATTAACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicology Letters** 107:33-47, 1999.

BARLOW, S.M.; SULLIVAN, F.M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. **Food and Chemical Toxicology** 39:407-422, 2001.

BARON, R.L. **Carbamate Insecticides**. In: Hayes, W.R., Laws, E.R.. *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 3, 1991, p. 1125-1190.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere** 44: 383-392, 2001.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research** 30: 75-89, 1990.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254, 1976.

BREEN, A.P.; MURPHY, J.A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radical Biology and Medicine** 18: 1033-1077, 1995.

BUCIO, L.; GARCÍA, C.; SOUZA, V.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, C.; BETANCOURT, M.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C. Uptake cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. **Mutation Research** 423: 65-72, 1999.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Efeitos citotóxicos do metilmercúrio e do DDT em hepatócitos de *Hypostomus comersoni*. **X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** 1: 223-223, Bento Gonçalves, 2008.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.5, p. 529-537, 2000.

CARLTON, F.B.; SIMPSON, W.M.; HADDAD, L.M. The Organophosphate and Other Insecticides. In: Haddad, L.M., Shannon, M.W., Winchester, J.F. **Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose**, Philadelphia, Pennsylvania, USA. WB Saunders Company, 3^a ed. 1998, p. 836-850.

CHANDRASEKARA, H.U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture Research** 36: 144-149, 2005.

CHEN, X.; LIANG, H.; REMMEN, H.V.; VIJG, J.; RICHARDSON, A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 197-210, 2003.

CLARK, A.; SHAMANN, N.; SINCLAIR, M.; DAUTERMAN, W. Insecticide metabolism by multiple glutathione s-transferase in two strains of the house fly *Musca domestica* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 25:169-175, 1986.

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

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; STOKER, T. E. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 26-36, 1999.

CORNELL UNIVERSITY. Extension Toxicology Network. Disponível em <[http://pmep.cce.cornell.edu/The Pesticide Management Education Program at Cornell University](http://pmep.cce.cornell.edu/The_Pesticide_Management_Education_Program_at_Cornell_University)> Acesso em 23 jul. 2006.

COX, C. Carbaryl. **Journal of Pesticide Reform**, v.13, n. 1, p.11-16, 1993.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. **Genética Toxicológica** 167-178, 2003.

DE LA SIENRAA, E.; ARMIENTAB, M.A.; GONSEBATTA, M.E. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkia*. **Environmental Pollution** 126:367-370, 2003.

DIERICKX, P.J. Activation of soluble glutathione transferase in rat hepatoma-derived Fa32 cells by several pesticides and oxidants. **Chemico-Biological Interactions** 133: 342-344, 2001.

DIERICKX, P.J. CYP1/2 activation and glutathione-dependent cytotoxicity of four pesticides in Hep G2 and Fa32 cells. **Toxicology in Vitro** 13: 779-783, 1999.

DIMITROVA, M.S.T.; TISHINOVA, V.; VELCHAVA, V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 108: 43-46, 1994.

DURMAZ, H.; SEVGILER, Y.; ÜNER, N. Tissue-specific antioxidative responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 84: 215-226, 2006.

EGAAS, E.; SANDVIK, M.; FJELD, E.; KALLQVIST, T.; GOKSOYR, A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 122: 337-344, 1999.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7:88-95, 1961.

ERP, V.; BOOTH, L.; GOONERATNE, R.; O'HALLORAN, K. Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorus insecticides. **Environmental Toxicology** 7: 449-456, 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research** 455, 81-95, 2000.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A. M. P. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 57:420-425, 2004.

FERRARI, A.; ANGUIANO, O. L.; SOLEÑO, J.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A. M. P. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. **Comparative Biochemistry and Physiology** 139C:239-243. 2004.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 88: 134-142, 2007.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; CESTARI, M.M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated of using the Comet Assay, Piscine Micronucleus and Chromosome aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology** 27:103-107, 2004.

FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; WASTERNACK, C. The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids. **Trends Plant Sciences** 6:268-273, 2001.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Hepatocytes primary culture from tropical fish species *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Journal of Fish Biology** 69: 1-9, 2006.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA, J.R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicology In Vitro** 21: 706-715, 2007.

FILIPAK NETO, F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus***. Curitiba, 2007. Tese do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular - Universidade Federal do Paraná.

FISHBASE. **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 28 de dezembro de 2007.

FOGAÇA, F.N.O.; ARANHA, J.M.R.; ESPER, M.L.P. Ictiofauna do Rio do Quebra (Antonina, PR, Brasil): Ocupação espacial e hábito alimentar. **Interciência** 28: 168-173, 2003.

FORCELLA, M.; BERRA, E.; GIACCHINI, R.; ROSSARO, B.; PARENTI, P. Increased alanine concentration is associated with exposure to fenitrothion but not carbamates in *Chironomus riparius* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 66:326-334, 2007.

FORD, M. Insecticides and Pesticides. In Viccellio, P. **Handbook of Medical Toxicology**, 1^a ed. USA. Little, Brown and Company. 1993, p. 303-314.

GALLO, M. e LAWRYK, N. Organic Phosphorus Pesticides. In Hayes, W.J, Laws, E. R. **Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 2, 1991, p. 917-1124.

GIROTTI, A.W. Serial Review: Regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine** 33: 154-172, 2002.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. **Toxicology In Vitro** 4: 415-427, 1990.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; LANGOUET, S.; MAHEO, K.; RISSEL, M. Use of hepatocytes cultures for the study of hepatotoxic compounds. **Journal of Hepatology** 26: 73-80, 1997.

GUL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.I.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International** 605-609, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York. Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals in the other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group: 1-7, 2001.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research** 18:187-190, 1973.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MCGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, N.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research** 123:61-118, 1983.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology** 66: 15327-15355, 2003.

HOSE, J.E.; CROSS, J.; SMITH, S.G.; DICHI, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research** 22: 167-176, 1987.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

JENSEN, E.G.; SKAARE, J.U.; EGAS, A.; GOKSOYR, A. Response of metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan by enzyme activities and immunological methods. **Aquatic Toxicology** 21:81-92, 1991.

JEYARATNAM, J. e MARONI, M. Organophosphorous Compounds. **Toxicology**, 91: 15-27, 1994.

JIA, Z.; MISRA, H.P. Reactive oxygen species in *in vitro* pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NF κ B and caspase-3. **Free Radical Biology and Medicine** 42: 288-298, 2007.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry** 202: 384-389, 1992.

KAVITHA, P.; RAO, J.V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 87: 182-188, 2007.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. **Journal Biological Chemistry** 251: 6183-6188, 1976.

KHEIR, R.; IBRAHIM, H.; LEWIS, J.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. Comparison of acetylcholinesterase and glutathione s-transferase activity in *Chironomus riparius* Meigen exposed to chemical-spiked sediments. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 66: 603-610, 2001.

KIM, H.Y., HYUN, C.K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 64: 288-297, 2006.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMAC, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D. FENESH, M.; ISHIDATE, M.; KIRSCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research** 540:153-163, 2003.

LARINI, L. Inseticidas Organossintéticos. In: Larine, L. **Toxicologia dos Praguicidas**, 1^a ed. São Paulo; Editora Manole Ltda,; 1999, p. 19-91.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single-cell gel electrophoresis comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research** 544: 43-64, 2003.

LEVINE, R.L. Carbonyl modified proteins in celular regulation aging in disease. **Free Radicals in Biology and Medicine** 32(9): 790-796, 2002.

LIMA, J.S. e PEREIRA, R.H.B. Intoxicação por organofosforados: Análise crítica e considerações especiais. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 8 (3): 100-101, 1996.

LIONETTO, M.G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M.E. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin** 46: 324-330, 2003.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimuled reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Bulletin Pollution** 42: 656-666, 2001.

MACHEMER, L. H. & PICKEL, M. Carbamates insecticides. **Toxicology**, 91: 29-36, 1994.

MATSUI, K.; SHIBATA, Y.; TATEBA, H.; HATANAKA, A.; KAJIWARA, T. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. **Biosciences Biotechnology Biochemistry**. 61:199-201, 1997.

MEAGHER, E.A.; FITZGERALD, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology and Medicine** 26: 202-226, 2000.

MENDES, R. **Patologia do Trabalho**. 1^a Edição. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1995.

MICHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research** 399:135-147, 1998b

- MIDIO, A. F. & SILVA, E.S. **Inseticidas-Acaricidas - Organofosforados e Carbamatos**. São Paulo, Ed. Roca Ltda, 1995.
- MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Characterization of the cholinesterases present in the head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 1-7, 2004.
- MONTEIRO, D.A.; Almeida, J.A., Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology** 143C: 141-149, 2006.
- MONTINE, K.S.; QUINN, J.F.; ZHANG, J.; FESSEL, J.P.; ROBERTS, L.J.; MORROW, J.D.; MONTINE, T.J. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative disease. **Chemical Physical Lipids** 128: 117-124, 2004.
- MORAES, G.F. Intoxicação Exógena por Chumbinho (Aldicarb?): Abordagem Clínica, Laboratorial e Terapêutica. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 8, (1): 297, 1995.
- MORAES, A.C.L. Intoxicações Agudas por Pesticidas na Infância: Revisão Clínico-Terapêutica. In: I Congresso Internacional de Segurança na Infância e Adolescência Niterói, Rio de Janeiro, 1998. **Anais**, Niterói, 1998.
- MORAES, A. C. L. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro**. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999. 111 p.
- MORGAN, D. P. Carbamate. **International Healthcare Series - POISINDEX. MICROMEDEX**. Colorado, United States of America: Vol 95, 1998a.
- MORTENSEN, M. L. Management of Acute Childhood Poisonings Caused by Selected Insecticides and Herbicides. **Pediatric Clinics of North America**, 33 (2): 421-432, 1986.
- NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology** 35:197-210, 1996.
- NAJIMI, S.; BOUHAIMI, A.; DAUBÈZE, M. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytillus galloprovincialis* as a biomarker of pollution of Agadir marine bay (Soth of Marroco). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 58: 901-912, 1997.
- NAKAGAWA, Y.; NAKAJIMA, K.; SUZUKI, T. Chlorpropham induces mitochondrial dysfunction in rat hepatocytes. **Toxicology** 200: 123-133, 2004.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine** 31: 1287-1312, 2001..
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; FILIPAK NETO, F.; MIRANDA, A.L.; PIMPÃO, C.T. **Primary culture and leukocyte migration as new tools to evaluate the effects of persistent organic pollutants (POPs) in fish**. In: Environmental Research Trends, pp. 231-270, Nova Science Publishers, Inc., 2007.

ORUÇ, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4 D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology** 137: 43-51, 2004.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquatic Toxicology** 65:337-360, 2003.

PESONEN, M.; ANDERSON, T. Primary hepatocyte culture: and important model of xenobiotic metabolism. **Aquatic Toxicology** 67: 39-253, 1997.

PHELPS, B.J.; GARRIOTT, M.L.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the in vitro micronucleus test II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research** 521:103-112, 2002.

PERKINS, E.J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity **Toxicological Sciences** 53: 308-315, 2000.

POLAT, H.; ERKOÇ, F.U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere** 49:39-44, 2002.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research** 97: 287-292, 2005.

QUINBY, G.E. & WASH, W. Further Therapeutic Experience With Pralidoximes in Organic Phosphorus Poisoning. **JAMA**, 187 (3): 114-118, 1964.

RADICE, S.; FERRARIS, M.; MARABINI, L.; GRANDE, S.; CHIESARA, E. Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology** 54: 51-58, 2001.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. **Farmacologia**. Guanabara Koogan, 3 ed. 692 pp. 1997.

REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. In vivo inhibition of AChE e ATPase activities in selected tissues of freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to the technical grade cypermethrin. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology** 52:619-626, 1994.

RENDÓN-VON OSTEN, J.; ORTÍZ-ARANA, A.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere** 58: 627-663, 2005.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas-RS. Editora da ULBRA.2003. 356p.

RIOL, M.J.M.; VALIÑAS, M.C.N.; FRENÁNDEZ, M.A.G.; LÓPEZ, M.P. Glutathione S-transferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology** 227-235, 2000.

RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; PEINADO, J.; PUEYO, C.; LÓPEZ-BAREA, J. Biochemical indicador of oxidative stress in fish from polluted litoral areas. **Cant. J. Fish. Aquat. Sci.** 50: 2568-2573, 1993.

SANCHEZ –GALAN, S.; LINDE, A.R.; IZQUIERDO, J.I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity test: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 43: 301-304, 1999.

SANDVIK, M.; BEYER, J.; GOKSOYR, A.; HYLLAND, K.; EGAAS, E.; SKAARE, U. Interaction of benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) **Biomarkers** 2: 153-160, 1997.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F. Investigation of acute toxicity of fenitrothion on peppered Corydoras (*Corydoras paleatus*) (Jenyns, 1842). **Chemosphere** 56:697-700, 2004.

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. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 56:295-301, 2003.

SCHEWE, T.; RAPOPRT, S.M.; KÜHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. **Adv. Enzymol. Relat. Area Mol. Biol.** 58: 191-272, 1986.

SCHMID, W. Micronucleus test. **Mutation Research** 31:9-15, 1975.

SCHVARTSMAN, S. Inseticidas e Produtos Usados Preponderantemente como Inseticidas. In: SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações Agudas**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1991. P. 269-279.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. **Free Radical Biology and Medicine** 29: 306-311, 2000.

SHAONAN, L.; XIANCHUAN, X.; GUONIAN, Z.; YAJUN, T. Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates. **Aquatic Toxicology** 68:293-299, 2004.

SHARMA, B.; GOPAL, K.; KHANNA, Y.P. interaction of carbaryl with acetylcholinesterase of the teleost, *Clarias batrachus*. **Toxicological and Environmental Chemistry** 39 (3-4): 147-152 1993.

SHI, H.; SUI, Y.; WANG, X.; LUO, Y.; JI, L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 140C: 115-121, 2005.

SHIBATTA, O. A.; HOFFMANN, A.C. Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 22, jun. 2005.

SILVA, H.C.; MEDINA, H.S.G.; FANTA, E.; BACILLA, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces:Teleostei). **Comparative Biochemistry and Physiology** 105C: 197-201, 1993.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung von Gewässerverschmutzungen**. 1998, 99 f. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

SOARES, L.F. **Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos**. Rio de Janeiro, 1998. Monografia (Especialização em Pediatria) - Universidade Federal Fluminense.

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: implicatins for cumulative risk assessment. **Toxicology**, 2001.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research** 47:389-398,1999.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*):Application in biomonitoring **Environmental Toxicology and Chemistry** 19: 1607-1615, 2000.

THOMPSON, H. M.; LANGTON, S. D.; HART, A. D. M. Prediction of inter- species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife – a biochemical approach. **Comparative Biochemistry Physiology** 111C:1-12, 1995.

TORTELLI, V.; COLARES, E.P.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; PINHO, G.L.L.; BIANCHINI, A.; MONTESSERAT, J.M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere** 65: 560-566, 2006.

TRUTE, M.; GALLIS, B.; DONEANU, C.; SHAFFER, S.; GOODLETT, D.; GALLAGHER, E. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic Toxicology** 81: 126-136, 2007.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicology Letters** 102 103:649-652, 1998.

VARÓ, I.; NAVARRO, J. C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 75:61-72, 2003.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, Bristol, PA 1996.

WEISS,C.M. The determination of cholinesterase in the brain tissues of three species of freshwater fish and its inactivation *in vivo*. **Ecology** 30: 194-99, 1958.

WHITEHEAD, A; ANDERSON, S.L., RAMIREZ, A. Cholinesterases in aquatic biomonitoring: Assay optimization and species-specific characterization for a California native. fish **Ecotoxicology** 14: 597-606, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO/PCS/98.21**: The WHO recommended classification of pesticides by hazard, WHO, Geneva, 2002.

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

ZHANG, J.F. Effects of water soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 110-116, 2004.