SÍLVIO CESAR DE OSTI

Toxicidade aguda, comportamento e análises anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina

SÃO PAULO

2005

SÍLVIO CESAR DE OSTI

Toxicidade aguda, comportamento e análises anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

SÃO PAULO
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1520 Osti, Sílvio Cesar de
FMVZ Toxicidade aguda, comportamento e análise anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina / Sílvio Cesar de Osti. – São Paulo : S. C. Osti, 2005.
111 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matishima.

1. Ecotoxicologia. 2. Histopatologia animal. 3. Peixes. 4. Comportamento animal. 5. Piretróides em animal. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome : OSTI, Sílvio César de

Título- Toxicidade aguda, comportamento e análises anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____Instituição :_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição :_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição :_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição :_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição :_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

À Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, amiga e orientadora, pela confiança em uma jornada por novos caminhos, pelo entusiasmo pela pesquisa e pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho.

À Alessandra, por todo amor, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, pela orientação e incentivo durante todo esse trabalho.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e confiança.

À Profa. Dra. Franci Mari Fantinati Varoli e as biólogas Carol Curti e Alessandra Panza, pelo precioso auxílio nos testes de comportamento.

Ao amigo Prof. Dr. Paulo Sérgio Cardoso da Silva, pela preciosa ajuda nas análises estatíticas.

Aos amigos Azael e Elisa Von Ah e Osvaldo Minoru Orikassa pelos peixes utilizados nos testes.

A todos os amigos do Departamento de Patologia Experimental e Comparada pela ajuda e incentivo.

RESUMO

OSTI, S. C. de **Toxicidade aguda, comportamento e análises anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina.** [Acute toxicity, behavior and anatomopathological analysis in different species of fish exposed to the commercial formulation containing deltamethrin]. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A toxicidade da formulação comercial contendo o praguicida piretróide deltametrina foi testada nas espécies de peixe *Danio rerio, Hyphessobrycon bifasciatus, Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus* por meio de testes de toxicidade aguda, avaliação de alterações comportamentais e análises anatomopatológicas do fígado e das brânquias. A espécie *D. rerio* apresentou CL50;48h igual a 0,078µg L^{-1}, a espécie *H. bifasciatus* apresentou CL50;48h igual a 0,082µg L^{-1}*, a* espécie *G. brasiliensis* apresentou CL50;48h igual a 0,594µg L^{-1} e *O. niloticus* apresentou CL50;48h igual a 0,954µg L^{-1}. As análises de comportamento realizadas com as espécies *D. rerio* e *H. bifasciatus* mostrou ser a segunda mais sensível ao praguicida, revelando alterações significativas nas menores doses de exposição. As análises anatomopatológicas realizadas com a espécie *G. brasiliensis* quando exposta à concentrações subagudas do praguicida mostrou vacuolização e degeneração nuclear hepática e nas brânquias a ocorrência de hiperplasia lamelar e fusão nas lamelas secundárias que aumentaram em função da concentração do praguicida e do tempo de exposição. Os resultados demonstraram elevada toxicidade do praguicida para todas as espécies testadas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Histopatologia animal. Peixes. Comportamento animal. Piretróides em animal.

ABSTRACT

OSTI, S. C. de **Acute toxicity, behavior and anatomopathological analysis in different species of fish exposed to the commercial formulation containing deltamethrin.** [Toxicidade aguda, comportamento e análises anatomopatológicas em diferentes espécies de peixes expostos à formulação comercial contendo deltametrina]. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The toxicity of the commercial formulation containing the pesticide pirethroid deltamethrin was tested in the species of fish *Danio rerio, Hyphessobrycon bifasciatus, Geophagus brasiliensis* and *Oreochromis niloticus* through tests of acute toxicity, evaluation of behavioral alterations and anatomopathological analysis of the liver and of the gills. The species *D. rerio* presented LC50;48h equals to 0,078µg $L^{-1,}$ the species *H. bifasciatus* presented LC50;48h equals to 0,082µg L-1, the species G. brasiliensis presented LC50;48h equals to 0,594µg L-1 and O. niloticus presented LC50;48h equals to 0,954µg L-1. The analysis of behavior accomplished with the species *D. rerio* and *H. bifasciatus* showed that the second one was more sensitive to the pesticide, and revealed significant alterations in the exhibition of fewer doses. The anatomopathological analysis accomplished with the species *G. brasiliensis,* when exposed to underacute concentrations of the pesticide, showed vacuolization and hepatical nuclear degeneration and the occurrence of lamellar hyperplasia in the gills plus fusion in the secondary lamellas which were increased due to the concentration of the pesticide and of the time of exposition. The results demonstrated high toxicity of the pesticide for all of the tested species.

Key words: Ecotoxicology. Animal histopathology. Fish. Animal behavior. Pirethroids in animal.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	11
1.1	PIRETRÓIDES	12
1.1.1	**Classificação**	12
1.1.2	**Mecanismos de ação**	14
1.1.3	**Deltametrina**	23
1.1.3.1	Metabolismo da deltametrina	25
1.1.3.2	Toxicidade do praguicida deltametrina	27
1.2	TESTES DE TOXICIDADE	28
1.2.1	**Organismos utilizados em testes de toxicidade**	31
1.2.1.1	Espécies de peixes autóctones	33
1.2.1.2	Espécies de peixes exóticas	34
2	**OBJETIVOS**	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	37
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA DE MANUTENÇÃO E CULTIVO	37
3.2	CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS	37
3.2.1	**Manutenção de *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus***	37
3.2.2	**Manutenção de *Oreochromisanio niloticus* e *Geophagus brasiliensis***	39
3.3	PRAGUICIDA UTILIZADO	40
3.4	TESTES DE TOXICIDADE	40
3.4.1	**Toxicidade aguda para *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus***	40
3.4.2	**Toxicidade aguda para *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromisanio niloticus***	41
3.5	ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA PARA *Geophagus brasiliensis*	42
3.5.1	**Histopatologia**	43
3.6	AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO DAS ESPÉCIES *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus* EXPOSTOS À DELTAMETRINA	43
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	**RESULTADOS**	46

4.1 TOXICIDADE AGUDA DO PRAGUICIDA DELTAMETRINA 46
4.2 RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO E LETALIDADE NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA 51
4.3 ANÁLISE DE COMPORTAMENTO 54
4.3.1 Freqüência de comportamentos das espécies *D. rerio* e *H. bifasciatus* durante exposição à deltametrina 54
4.3.2 Alteração na movimentação de *D. rerio* e *H. bifasciatus* 59
4.4 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA 67
4.4.1 Fígado 67
4.4.2 Brânquias 71
5 DISCUSSÃO 75
6 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 92

1 INTRODUÇÃO

Para o controle significativo de organismos capazes de prejudicar a produção agrícola ou que podem transmitir doenças aos homens e animais, empregam-se praguicidas (ou pesticidas), denominação esta dada ao grupo de substâncias que servem para matar, controlar ou combater as pragas (insetos, ácaros, roedores,etc). Praguicidas são utilizados pela humanidade há milhares de anos, desde a queima de enxofre para fumigar os lares gregos por volta de 1000 a.C., passando pelos compostos de arsênio, utilizados como inseticidas nas décadas de 1930 e 1940 (BAIRD, 2002). O emprego de praguicidas em escala mundial ocorreu após a Segunda Guerra Mundial, sendo a substância diclorofenil-tricloroetano, sintetizada em 1872 por Ottmar Zeidler e com ação inseticida verificada em 1939 por Paul Müller, utilizada para o combate de insetos transmissores de doenças como malária, febre amarela e doença do sono, com a designação de DDT. Esse composto controlou a população de pragas agrícolas, permitindo um salto de produção nunca visto. Posteriormente, notou-se que o DDT, assim como outros praguicidas do grupo dos organoclorados, é altamente lipossolúvel e persiste no meio ambiente por um período muito longo após seu uso. No final da década de 1930, foram também sintetizados os praguicidas organofosforados e, mais tarde, os carbamatos, ambos com alto potencial de toxicidade para seres humanos e animais, sendo que alguns organofosforados foram sintetizados, inclusive para serem utilizados como armas de guerra (sarin, tabun e somam).

1.1 PIRETRÓIDES

A busca por praguicidas com toxicidade seletiva para pragas e que não persistissem muito tempo no meio ambiente fez com que surgissem os piretróides, obtidos a partir do estudo de alterações na estrutura química das piretrinas. Esta é uma classe de inseticidas botânicos utilizados pelos chineses antes da era Cristã, extraídos das folhas secas do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (HARTLEY; WEST, 1969). As piretrinas não possuem estabilidade à luz e ao calor, sendo facilmente degradadas; por outro lado os piretróides são mais estáveis e possuem grande poder inseticida. Os pesticidas piretróides foram introduzidos no mercado em 1980 e em 1982 já representavam 30% dos inseticidas utilizados no mundo.

1.1.1 Classificação

A partir de observações em ratos, Verschoyle e Aldridge (1980) classificaram esses praguicidas em dois tipos: Tipo I e Tipo II, designando respectivamente os sinais e sintomas da intoxicação produzida pelos mesmos de síndrome T e CS.

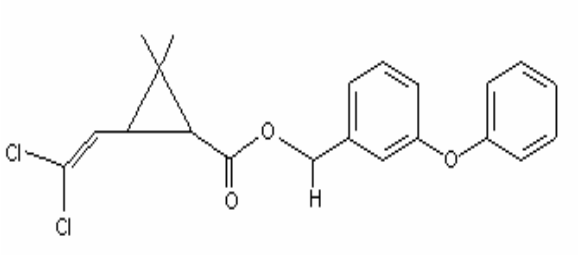
A síndrome T, com efeitos neurológicos periféricos, caracteriza-se pela presença de comportamento agressivo e aumento da sensibilidade a estímulos externos, surgindo, em seguida, um tremor fino que se torna mais severo até que

os animais fiquem prostrados e com tremores generalizados por todo o corpo. Ocorre aumento da temperatura interna, provavelmente devido à excessiva atividade muscular associada aos tremores (WHITE et al., 1988). Estão incluídos nesta classe os compostos aletrina, permetrina, resmetrina, fenotrina, bifentrina, bioaletrina, teflutrina e tetrametrina.

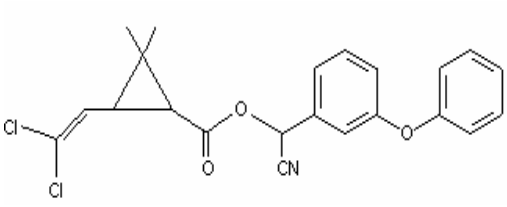
A síndrome CS, com efeito central, é caracterizada inicialmente pelo aparecimento de comportamento de escavar e fazer tocas, seguidos por profusa salivação, tremores grosseiros generalizados, aumento das respostas de sobressalto, locomoção anormal envolvendo rigidez do trem posterior e diminuição da temperatura corporal. O tremor grosseiro progride até a coreatetose (RAY; CREMER, 1979) e gradualmente até convulsões clônicas, que podem ser potenciadas pelo estímulo sonoro. Sinais análogos a essas duas síndromes foram observados em camundongos (LAWRENCE; CASSIDA, 1982; STAATZ et al., 1982) e baratas (GAMMON et al, 1981; SCOTT; MATSUMURA, 1983) após exposição a piretróides.

Estruturalmente, os piretróides do tipo II apresentam um grupo 2-α-ciano – fenoxibenzil e os do tipo I não o apresentam (Figura 1). Observa-se que a síndrome CS ocorre sempre que o piretróide apresenta esse grupo ciano. Estão incluídos nessa classe os compostos deltametrina, ciflutrina, cialotrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, fenvalerato, esfenvalerato e flumetrina.

Alguns piretróides, como a fenpropatina, induzem a uma síndrome intermediária (síndrome TS) com sintomas predominantemente do tipo I e, em menor escala, alguns do tipo II (VERCHOYLE; ALDRIDGE, 1980; GAMMON et al., 1981)



permetrina



cipermetrina

Figura 1 - Estrutura de piretróide do tipo I (permetrina) sem presença do grupo 2-α-ciano – fenoxibenzil e de piretróide do tipo II (cipermetrina) com presença do grupo2-α- ciano – fenoxibenzil

1.1.2 Mecanismos de ação

Os piretróides atuam sobre a permeabilidade iônica, nos canais de sódio da membrana de células nervosas (MIYAMOTO et al,, 1995). Narahashi (1984) demonstrou que os piretróides podem provocar a abertura dos canais de sódio nas células nervosas, levando a um pós-potencial positivo ou supressão do período refratário após o potencial de ação; essa alteração promove disparos neuronais repetitivos na presença de um único estímulo. Vijverberg e Van Der Bercken (1990) relacionaram muitos dos sintomas neuroexcitatórios dos piretróides com sua capacidade de modificar a atividade elétrica em várias partes do sistema nervoso central. A atividade nervosa repetitiva, particularmente no sistema nervoso sensorial, e a despolarização de membranas, seguida eventualmente pelo bloqueio da excitação, resultaria do prolongamento da corrente de sódio durante a excitação da membrana e seria o sítio primário de ação dos piretróides. Desta forma, o sítio de ação principal destes agentes é o

canal de sódio dessas células, aumentando a condutância deste íon, mas parece que outros canais de íons também estão envolvidos (FORSHAW et al.,1993). Assim, piretróides do tipo II causam descargas repetitivas em neurônios sensoriais e distúrbios na transmissão sináptica (NARAHASHI, 1986). Gamoon et al. (1982) mostraram também que piretróides do tipo II interagem quer com os sítios para benzodiazepínicos, quer com os da picrotoxina barbiturato do complexo receptor GABA-ionóforo de cloreto, bem como atuam nos receptores colinérgicos e nicotínicos (JOY, 1994). Narahashi et al. (1996) afirmam que a diferença de toxicidade dos piretróides entre mamíferos e insetos deve-se a cinco fatores: à sensibilidade dos canais de sódio, às modificações nos canais de sódio devido à diferença de temperatura, à reversibilidade dos canais de sódio, à detoxificação dos piretróides e ao tamanho do corpo do animal.

A comparação dos efeitos da cismetrina, piretróide do tipo I, e deltametrina, piretróide do tipo II, mostrou que ambos os praguicidas administrados agudamente diminuíram de forma dose-dependente a atividade motora, no entanto a exposição aos mesmos por 30 dias não produziu efeitos cumulativos. A latência para a resposta de sobressalto ao estímulo acústico foi reduzida após administração aguda de deltametrina, enquanto que a cismetrina não foi capaz de alterá-la; quanto à amplitude dessa resposta, observou-se decréscimo após à exposição à deltametrina e aumento após a cismetrina. (CROFTON; REITER, 1987). Essas diferença foram atribuídas ao efeito da deltametrina em sítios gabaérgicos, que estão relacionados à resposta de sobressalto (GALLAGER et al., 1983).

Hijzen e Slangen (1988) verificaram que piretróides do tipo I aumentam a amplitude da resposta de sobressalto, tanto na presença, como na ausência de

sinais claros de toxicidade aos praguicidas, entretanto apresentaram efeitos menos uniformes que a permetrina, isto é, a deltametrina reduziu a amplitude do sobressalto e a cipermetrina aumentou a mesma. Os autores relacionaram essas variações com um efeito indireto dos piretróides do tipo II no metabolismo e por uma ação direta dos mesmos no músculo. Assim, estaria explicado o aumento da resposta na vigência de toxicidade baixa e seu decréscimo quando a toxicidade é relativamente alta.

Segundo Gammon et al. (1982), o pré-tratamento com diazepam (agonista de receptores GABA) protege camundongos e baratas da convulsão induzida pela deltametrina e pelo fenvalerato, o que reforça a idéia que piretróides do tipo II tenham uma ação em sistemas gabaérgicos centrais (RAO et al., 1995).

Bradbury et al. (1981) observaram que a mefenesina, um relaxante muscular que bloqueia a excitabilidade dos reflexos espinais, foi capaz de proteger ratos da morte induzida pela cismetrina e deltametrina. Esse efeito, provavelmente, reflete ações não específicas do relaxante muscular no SNC desde que a dose utilizada foi bastante grande (BERGER; BRADLEY, 1946).

A estrutura química dos piretróides afeta a resposta de sono induzida pelo pentobarbital. Desta forma, piretróides que contêm o grupo ciano diminuem, enquanto os que contém o grupo etinil prolongam o tempo de sono induzido pelo pentobarbital (TSUJI et al., 1996).

Crofton e Reiter (1987) propõem que os efeitos tóxicos centrais dos piretróides do tipo II sejam conseqüência da interação com os sítios da picrotoxina, fato que não exclui efeitos desses praguicidas em outros locais. Assim, existem muitas similaridades entre os efeitos dos piretróides do tipo II e da a picrotoxina. De fato, observa-se potenciação dos efeitos de ambos na atividade motora e na resposta

acústica. Somente piretróides do tipo II são capazes de competir com radioligantes pelo sítio da picrotoxina. A picrotoxina induz salivação (HAHN, 1960), hiperexcitação, estimulação respiratória, convulsões tônico-clônicas, convulsões clônicas “incoordenadas” (FRANZ,1980), hiperglicemia (TATUM, 1922) e hipotermia (ROSENTHAL, 1941). Da mesma forma, a deltametrina, bem como outros piretróides do tipo II, eliciam salivação, tremores corporais, coreatetose, convulsões clônicas (RAY; CREMER, 1979; VERCHOYLE; ALDRIDGE, 1980), hiperglicemia (CREMER; SEVILLE, 1982) e hipotermia (RAY; CREMER, 1979).

Com relação à sistemas colinérgicos, a permetrina inibe a atividade da acetilcolinesterase em todo o cérebro do rato, enquanto a cipermetrina aumenta a atividade da enzima, o que sugere que a permetrina, a cipermetrina e o substrato da acetilcolina interagem com sítios hidrofóbicos e são capazes de se ligar simultaneamente à enzima (RAO; RAO, 1995).

Alguns trabalhos da literatura preocupam-se, em particular, com alguns dos sintomas das síndromes dos tipos I e II produzidas por piretróides. Assim, Ray e Cremer (1979) verificaram que o pré-tratamento com atropina foi capaz de antagonizar a salivação, a bradicardia transitória e a miose induzida pela administração da deltametrina. Todavia, foi observada apenas proteção parcial da coreatetose pelo anticolinérgico e o exame da atividade anticolinesterásica não indicou quaisquer alterações na atividade da colinesterase no cérebro total ou no cerebelo. Esses fatos sugerem que não se pode associar os efeitos motores produzidos pelo piretróide diretamente com mecanismos colinérgicos, sendo provável que os mesmos dependam do balanço deste sistema com outros sistemas centrais em relação aos gânglios da base (RAY; CREMER, 1979).

Acrescenta-se ainda que Crofton e Reiter (1987) sugerem que piretróides do tipo II afetam a atividade motora, pelo menos em parte, devido a mecanismos semelhantes aos da picrotoxina.

Fato adiciona foi a verificação de que as alterações eletroencefalográficas corticais produzidas pela administração de praguicidas, não se correlacionam com os sinais e sintomas da intoxicação, fato que sugere origem subcortical para as descargas produzidas por piretróides (RAY, 1980).

Por outro lado, piretróides tanto do tipo I quanto do tipo II produzem aumento de movimentos não ambulatórios (tremor, levantar, *grooming* e outros), diminuindo por vezes os movimentos ambulatórios (CROFTON; REITER, 1984; CROFTON; REITER, 1988; HIJZEN, 1988 HUDSON, 1986; MITCHEL et al., 1988). Os piretróides dos tipos I e II provocam aumento no conteúdo estriatal de DOPAC, que é um metabólito da dopamina, mas não são conhecidas diferenças específicas na forma de interação destes inseticidas com o sistema estriatal dopaminérgico (DOHERTY, 1988).

Existem evidências de que a coreatetose induzida pela deltametrina está associada à hiperexcitabilidade extrapiramidal (RAY, 1982), e que esse praguicida, aplicado diretamente nas vias nigroestriatais ou mesolímbicas, produz comportamento de girar, o qual parece não estar relacionado causalmente com a dopamina estriatal (BRODIE; OPACKA, 1985). Segundo Lock e Berry (1981), os sinais da intoxicação aguda que culminam na coreatetose não se assemelham àqueles produzidos pela picrotoxina.

Rose e Dewar (1983) mostraram que a piloereção, a rigidez do posterior, a ataxia, os tremores a e hipersensibilidade aos estímulos sonoros são resultados do efeito farmacológico de piretróides em membranas excitáveis. Em particular, a

ataxia e a rigidez do trem posterior não seriam conseqüências de uma lesão no nervo pelo praguicida. Tilson et al (1985) verificaram que a 5,5-difenilhidantoina, um bloqueador de canais de sódio, foi capaz de reverter os tremores induzidos pela permetrina, falhando porém em atenuar os sinais tóxicos induzidos pela cismetrina ou pela deltametrina.

Hussain et al. (1994), examinando o mecanismo neurotóxico da deltametrina, observou que esta diminuiu significativamente a massa do cerebelo, ponte, hipotálamo, cortéx frontal e corpo estriado em comparação ao controle. O cérebro dos animais do grupo experimental mostrou alterações na atividade Na^+, K^+-ATPase microssomal, também um aumento na acetilcolinesterase microssomal e na atividade da monoamina oxidase mitocondrial. Observou-se, ainda, aumento na atividade locomotora e prejuízo no aprendizado. Os níveis máximos de espermina e espermidina foram registrados no hipocampo, enquanto as poliaminas estavam diminuídas no córtex frontal. O *binding* das membranas estriatais indicou alterações nas mesmas. A deltametrina levou a desvios nos níveis de poliamina entre as partes do cérebro, podendo ser a causa de alterações patofisiológicas do neurônio.

Bloom et al. (1983), comparando os efeitos da administração aguda de permetrina e deltametrina no comportamento condicionado operante de pressionar a barra, verificaram que ambos praguicidas reduziram, de forma dose-dependente, a taxa de respostas e concomitantemente diminuíram o consumo de alimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Stein et al. (1987) quando testaram, no mesmo modelo, a aletrina, a deltametrina, a permetrina e o fenvalerato em doses de 10 a 100 vezes menores que os valores da DL50 desses praguicidas. Os autores comentaram que esses estudos comportamentais foram

bastante sensíveis para avaliar efeitos tóxicos dos praguicidas em questão. Além disso, ratos submetidos a tarefas com esquemas de múltiplo reforço apresentaram respostas diferenciais a piretróides do tipo I e II (PEELE; CROFTON, 1987).

Moniz et al. (1994) constataram que o pré-tratamento com fenvalerato diminuiu a freqüência de resposta de esquiva ativa e de respostas condicionadas em um esquema operante já estabelecido. Por outro lado, administrações do fenvalerato pré-treino ou pré-teste produziram efeito facilitatório nas respostas de esquiva passiva e prejudicaram as respostas de esquiva ativa. Segundo esses autores, essas alterações podem ser devidas a um aumento de emocionalidade decorrente da ação do fenvalerato no sistema simpatoadrenal. Em adição, Maity (1991) encontrou prejuízo na consolidação da memória, na aquisição e resposta de esquiva passiva com o fluvalinato, que é também um piretróide do grupo II.

Neste sentido, Cremer e Seville (1982) sugeriram que as duas síndromes induzidas pelos piretróides estariam associadas à ativação do eixo medular-simpatoadrenal. Assim, observou-se que o intenso tremor (síndrome do tipo I induzida pela cismetrina) era comparável àquele produzido pelo estresse por corrida. Por outro lado, a coreatetose (síndrome do tipo II), induzida pela deltametrina, apresentou-se associada a altos níveis de noradrenalina e adrenalina, comumente detectados em certas situações de estresse, sendo acompanhada por hiperglicemia e aumento dos níveis séricos de lactato.

Estudos *in vitro* com a célula chromaffin de bovino mostraram que a administração de deltametrina levou a aumento dose-dependente na liberação de catecolaminas (BICKMEYER et al., 1994).

A administração de altas doses de deltametrina libera noradrenalina e adrenalina (CHANH et al., 1984; CREMER; SEVILLE, 1982); além disso, baixas doses deste mesmo praguicida eliciam respostas autonômicas e neuroendócrinas vigorosas, que indicam altos níveis de estresse, provavelmente causadas pelas propriedades neurotóxicas do inseticida (BOER et al., 1988).

Quanto aos efeitos dos piretróides em parâmetros reprodutivos, Abd el Aziz et al. (1994) observaram que ratos machos tratados com deltametrina durante 65 dias apresentaram diminuição do peso dos órgãos genitais, maior porcentagem de morte e anormalidades morfológicas nos espermatozóides, bem como redução nos níveis de testosterona plasmática.

A exposição materna na lactação à cialotrina, contudo, não altera a atividade motora e o peso corporal dos filhotes até 21 dias de idade, porém prejudica as respostas destes animais aprendidas na idade adulta (MONIZ et al., 1990). A exposição a este mesmo piretróide durante a gestação provoca um atraso no nascimento da pelagem, na abertura dos olhos e orelhas e na descida dos testículos. Entretanto, a observação aos 90 dias de idade mostra que não há influência na atividade motora, no aprendizado e memória na tarefa de esquiva, bem como no comportamento sexual (GOMES et al.,1991a, b).

Bhunya e Pati (1990), estudando a administração de deltametrina, identificaram indução de aberrações cromossômicas significantes e uma relação linear entre a dose de deltametrina e a freqüência de aberrações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades no esperma. O fenvalerato, por sua vez, não induziu a efeitos genotóxicos (SURRALLÈS, 1995). Por outro lado, Mlynarcikova (1995), em estudos sobre os efeitos do supermetrina na reprodução de codornas,

bem como no estado geral de saúde, na taxa de resíduos nos órgãos, nos tecidos e ovos, concluiu que este piretróide pode ser considerado seguro.

O tratamento neonatal de camundongos com deltametrina e bioaletrina aumentou a atividade motora e a um decréscimo na densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos no córtex cerebral dos animais tratados com bioaletrina. Também mostrou uma tendência ao decréscimo da densidade desses receptores nos animais tratados com deltametrina (ERIKSSON, 1991). O mesmo autor afirma que distúrbios no sistema colinérgico durante o desenvolvimento neonatal podem levar a alterações permanentes neste sistema e a alterações comportamentais dos animais adultos.

Eriksson (1993) verificou que ratos expostos ao DDT no período neonatal e a bioaletrina quando adultos, apresentam alterações nos receptores muscarínicos colinérgicos, indicando, desta forma, o aumento de susceptibilidade dos receptores colinérgicos muscarínicos nos animais expostos a este tratamento quando comparados aos tratados com o veículo aos 10 dias de idade e à bioaletrina quando adultos.

A administração de fenvalerato e da cipermetrina durante a gestação e lactação eleva os níveis de receptores dopaminérgicos e muscarínicos na membrana estriatal dos animais. Essas alterações são mais evidentes em animais tratados durante a lactação com relação àqueles expostos durante a gestação, esses animais apresentam também um aumento na acetilcolinesterase e uma diminuição na momoanima oxidase e Na^+, K+ ATPase cerebral. Assim, alterações nas vias dopaminérgicas e colinérgicas são mais pronunciadas durante o período de crescimento e podem levar a prejuízos funcionais no cérebro adulto (MALAVIYA, 1993).

O emprego dos inseticidas piretróides em grande escala nas atividades agropecuárias vem aumentando a contaminação das águas por essas substâncias em virtude do arraste a rios e lagos pelas águas pluviais, despejo de restos de soluções de praguicidas ou da limpeza dos recipientes e utensílios utilizados na aplicação, entre outros (FELLENBERG, 1980). No Brasil, o piretróide deltametrina (2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropilcarboxilato de alfa-cianofenoxibenzilo) é muito utilizado, tanto em aplicações agrícolas como domésticas,em particular no combate às pulgas, carrapatos e escabiose em animais de estimação.

Esses fatores, ano após ano, aumentaram o interesse da sociedade em reduzir os danos causados ao meio ambiente, destacando-se, aqui, grande preocupação em relação aos ecossistemas aquáticos, estes de fundamental importância para a preservação da vida no planeta. Esses ecossistemas apresentam uma série de mecanismos físicos, químicos e biológicos para a assimilação dos efeitos de substâncias tóxicas, mas quando estas atingem níveis acima da capacidade assimilativa do corpo receptor, afetam a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos organismos que ali vivem, degradando a qualidade das águas.

1.1.3 Deltametrina

A deltametrina foi sintetizada em 1974 e comercializada pela primeira vez em 1977. Em 1987, o consumo de deltametrina no mundo era de 250 toneladas/ano. Quimicamente, a deltametrina é o 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropilcarboxilato alfa-cianofenoxibenzilo (Figura 2).

A deltametrina em grau técnico contém mais de 98% deltametrina. Apresenta-se como um pó branco cristalino, com densidade 0.5 g cm $^{-3}$ (20 °C), massa molecular relativa de 505.24 u, ponto de fusão 98-101 °C, ponto de ebulição de 300 °C e solubilidade em água menor que 0.002 mg L^{-1} (20°C) e bastante solúvel em solventes orgânicos. É estável à temperatura (6 meses a 40°C), iluminação e em contato com ar, mas instável em meios alcalinos .

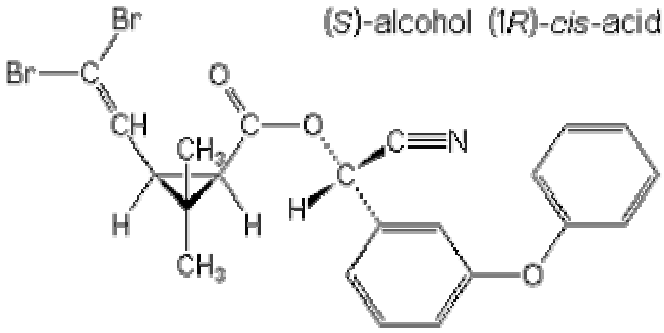


Figura 2 - Fórmula estrutural da deltametrina

A deltametrina é comercializada em formulações como emulsão concentrada, soluções líquidas, suspensões, pó ou detergentes, isolada ou em combinação com outros praguicidas. Sua atividade inseticida é aumentada pela presença de sinergistas.

Sua forma comercial é utilizada, principalmente, em algodão (45% do consumo) e em colheitas como café, milho, cereais, frutas, legumes e em produtos armazenados. A deltametrina também é utilizada em saúde animal, em controle de vetores de doenças e em saúde pública.

1.1.3.1 Metabolismo da deltametrina

A via de biotransformação de maior importância para os compostos piretróides é a hidrólise da molécula pela clivagem na ligação éster por meio das carboxiesterases encontradas em associação à fração microssomal de homogenatos de tecidos e disponíveis no fígado, no cérebro, rins e sangue. Depois da administração oral em ratos, a deltametrina e seus produtos de biotransformação são quase que completamente excretados num período de 8 dias. O ácido crisantemonocarboxílico é excretado sob a forma inalterada e conjugado com o UDPGA (ácido uridindifosfato glicurônico), PAPS (3-fosfoadenosina e 5- fosfosulfato), glicina e taurina. O radical cianeto é excretado mais lentamente, como tiocianato (LARINI, 1999). As rotas metabólicas da deltametrina em mamíferos estão resumidas na Figura 3.

As informações sobre o metabolismo de piretróides em humanos são limitadas a um restrito número de estudos que envolveram pessoas expostas a estes praguicidas em seus trabalhos. Para trabalhadores expostos à deltametrina, os metabólitos identificados em amostras de urina foram consistentes com os

caminhos metabólicos para este praguicida identificados em roedores (SODERLUND et al., 2002).

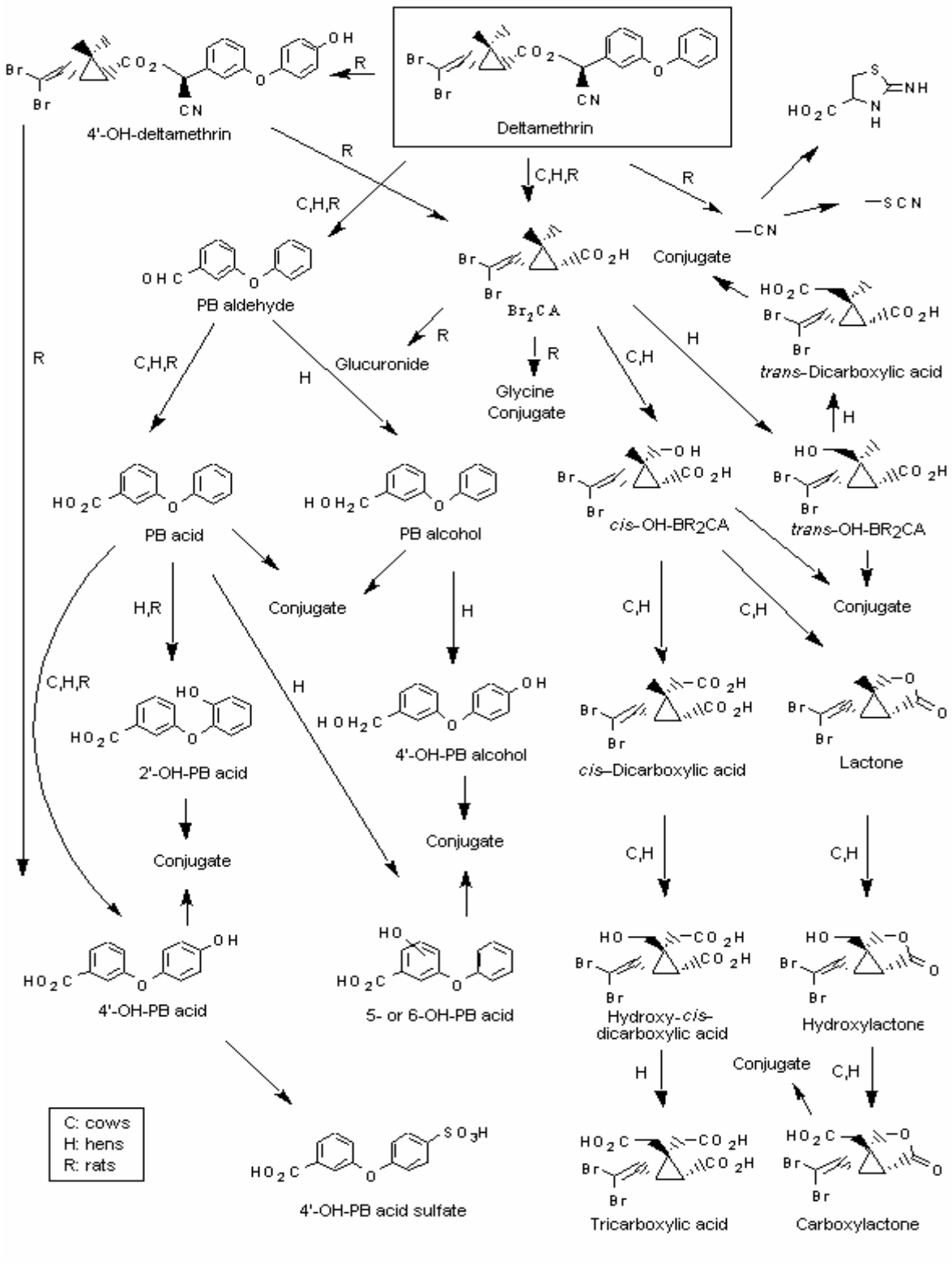


Figura 3 - Principais vias de biotransformação da deltametrina em mamíferos. (SODERLUND et al, 2002)

1.1.3.2 Toxicidade do praguicida deltametrina

Vários estudos foram feitos para que a toxicidade da deltametrina fosse conhecida em várias espécies animais. Os resultados demonstraram toxicidade elevada para peixes, anfíbios e invertebrados se comparada à toxicidade para mamíferos. A tabela 1 apresenta a toxicidade da deltametrina para algumas espécies animais.

Tabela 1 - Toxicidade aguda da deltametrina para várias espécies animais.

Organismo	Toxicidade	Fonte
Rato	DL50 = 50 mg kg^{-1}	KAVLOCH et al (1979)
Cão	DL50 = 100 mg kg^{-1}	GLOMOT et al (1977)
Carpa (C. carpio)	DL50 = 0.86 µg L^{-1}	KNAUF (1977)
Bagre (I. punctatus)	DL50 = 0,63 µg L^{-1}	BUCCAFUSCO et al.(1977)
Girino (*Bufo bufo*)	CL50 = 0,93 µg L^{-1}	L'HOTELLIER (1986)
Lagosta (*H. americanus*)	CL50 = 0.0014 µg L^{-1}	ZITKO et al (1979)
Abelha (*A. mellifera*)	0,051µg / organismo	STEVENSON et al (1978)

1.2 TESTES DE TOXICIDADE

A preocupação em prever efeitos ecológicos provenientes da ação de compostos químicos sintéticos fez com que surgisse a necessidade de desenvolver métodos eficientes, de modo a atender essa nova realidade.

À Toxicologia Aquática, um dos ramos da Ecotoxicologia, cabe o estudo "dos efeitos de químicos manufaturados e de outros materiais, de atividades antropogênicas e naturais sobre os organismos aquáticos em vários níveis de organização, desde o subcelular, com relação aos organismos, até comunidades e ecossistemas" (RAND et al., 1995).

Entende-se por toxicidade, a propriedade inerente do agente químico de produzir efeitos deletérios sobre um organismo (RAND et al.,1995). Seu controle constitui uma abordagem de avaliação há muito adotada por países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, a EPA tem estabelecido programas de pesquisas sobre ecotoxicidade e avaliação de risco, de modo a aumentar o conhecimento nessas áreas, aumentando a qualidade no controle da poluição (EPA, 1991a).

De acordo com Chapman (1989), esse controle, além de fornecer informações importantes sobre a extensão da poluição no ambiente, avalia a eficiência de ações mitigadoras adotadas com o propósito de diminuir, ou mesmo, eliminar sua origem. A realização de testes de toxicidade foi incluída nesses programas, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição. Nesse caso, o monitoramento tradicionalmente realizado com a

avaliação de parâmetros físicos e químicos é complementado com o biomonitoramento, no qual informações sobre as respostas dos organismos frente a modificações ambientais são obtidas. Essa abordagem permite monitorar os efeitos integrados de condições ambientais e contaminantes, além de ser eficiente na detecção dos efeitos de poluentes presentes em níveis abaixo da capacidade de métodos químicos analíticos.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos, tanto em laboratório como em campo, constituem uma prática já adotada em programas de monitoramento ambiental de muitos países, inclusive no Brasil (ABNT, 1992, 1993; CETESB, 1991a; 1991b; 1992; EPA, 1989b; 1991b; GHERARD-GOLDSTEIN et al, 1990; ISO, 1982). Apresentam como objetivo a avaliação dos efeitos de poluentes que potencialmente podem provocar alterações na qualidade da água, prejudicando a biota ali existente (SETAC,1993; RAND,1995). Esses testes de toxicidade, realizados com organismos aquáticos representativos das comunidades biológicas, possibilitam a avaliação da toxicidade conjunta dos constituintes de um meio de natureza química complexa, tanto como suas interações.

Os testes de toxicidade consistem em expor o organismo-teste a várias concentrações do agente tóxico, durante um determinado intervalo de tempo, podendo-se avaliar os efeitos sobre as funções biológicas fundamentais como crescimento, reprodução e sobrevivência.

Na descrição dos efeitos de um agente tóxico, são considerados, entre outros, os efeitos agudos e crônicos. Esta classificação relaciona-se ao ciclo de vida do organismo que está sendo testado com o tempo de exposição do mesmo à amostra durante o teste.

Considera-se como efeito agudo a resposta rápida e severa dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, geralmente, em um intervalo de 0 a 96 horas. O efeito poderá ser a letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, como o estado de imobilidade. Os efeitos agudos em testes de toxicidade são avaliados usando-se geralmente a concentração letal (CL50) ou a concentração efetiva (CE50), ou seja, que causa imobilidade a 50% dos organismos em teste, sendo essa a resposta considerada a mais significativa para se extrapolar a uma população (CETESB, 1992).

Efeito crônico traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por períodos que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo. Esses efeitos são observáveis em casos onde as concentrações de agentes tóxicos permitem a sobrevida do organismo, mas afetam uma ou mais funções biológicas como crescimento, reprodução , desenvolvimento de ovos, etc. Nos testes de toxicidade crônica determina-se, entre outras variáveis, a concentração do agente tóxico que não causa o efeito observado (CENO - Concentração de Efeito Não Observado) e a concentração que causa esse efeito (CEO – Concentração de Efeito Observado) (CETESB, 1992).

No Brasil, os testes ecotoxicológicos já despontam como ferramenta de uso rotineiro, tanto para a avaliação da toxicidade de efluentes líquidos (BASSOI et al., 1990; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990), que recentemente foram regulamentadas para esse uso (SÃO PAULO, 2000), como para o monitoramento de águas superficiais no Estado de São Paulo (BERTOLETTI et al.,
ZAGATTO et al.,1987 ; 1989 ; ZAGATTO; GHERARD GOLDSTEIN, 1991 ; ZAGATTO et al.,1999).

1.2.1 Organismos utilizados em testes de toxicidade

Apesar da crescente utilização dos testes ecotoxicológicos, no Brasil, poucas espécies de organismos aquáticos são empregadas em métodos padronizados. Destacam-se entre as algas destacam-se *Chorella vulgaris* e *Selenastrum capricornutum,* entre os crustáceos dulciaqüicolas *Daphnia similis, Ceriodaphnia dúbia, Hyalella azteca.*

Para testes de toxicidade realizados com peixes, várias espécies de pequeno porte foram utilizadas como as autóctones *Cheirodon notomelas* (piquira ou canivete), *Hemigrammus marginatus* (lípis ou bandeirinha) , *Hyphessobrycon callistus* (mato-grosso) e as exóticas *Danio rerio* (paulistinha) e *Pimephales promelas.*

Os peixes podem ser descritos, entre os grupos taxonômicos utilizados em testes de toxicidade, como aqueles que despertam maior atenção aos leigos, decorrente da fácil visibilidade desses organismos, bem como do interesse comercial e recreacional de diversas espécies. Também, esses podem ser considerados representativos dos organismos que ocupam o topo da cadeia trófica aquática e, também, apropriados para detectar os efeitos tóxicos de determinados agentes químicos. Em decorrência desses aspectos, tais organismos são fundamentais para avaliação dos efeitos adversos de substâncias e para o estabelecimento de concentrações aceitáveis destas para os ecossistemas onde vivem (BERTOLETTI, 2000).

Apesar da riqueza taxonômica da maioria dos ambientes aquáticos naturais no Brasil, são desconhecidas as características de manutenção e reprodução de

espécies autóctones em laboratório, o que implica no recrutamento dos organismos-teste em ambientes naturais ou na aquisição direta de criadores ou do comércio aquarista

Como alternativa são recomendadas as espécies exóticas (alóctones) *Pimephales promelas* e *Danio rerio* (CETESB,1990). A espécie *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae) é a mais utilizada em função da fácil obtenção (encontrada no mercado como “paulistinha”), manutenção em laboratório e reprodução em cativeiro, características determinantes na escolha de uma espécie a ser utilizadas para testes (ISO, 1982). A espécie *P. promelas,* embora recomendada para testes de toxicidade, tem sua introdução no Brasil controlada pelo IBAMA, sendo o usuário responsável por seu confinamento (BERTOLLETI, 2000). Este fato limita, assim, sua utilização em testes de toxicidade, embora seja a espécie que apresenta maior número de dados sobre toxicidade para peixes, graças à sua constante utilização em testes em países como Estados Unidos e Canadá.

A necessidade da criação de programas de monitoramento ambiental fazendo uso de espécies aquáticas autóctones reside, sobretudo, em dois aspectos: primeiro, no impacto, direto ou indireto que a introdução intencional ou não, de uma espécie exótica teria sobre a dinâmica ambiental; segundo, na qualidade da resposta que uma espécie autóctone podeia fornecer, já que, em geral, suas condições de cultivo, bem como suas condições de teste, estão próximas das características ambientais locais. Tais características, como: dureza da água, pH, temperatura, oxigênio dissolvido têm influência significativa sobre a ação de agentes poluentes (ARENZON, 1996).

O uso de espécies autóctones adaptadas às características ambientais certamente poderia prover resultados muito mais próximos da realidade, quando comparados aos resultados obtidos com espécies exóticas.

1.2.1.1 Espécies de peixes autóctones

Algumas espécies de peixes autóctones podem ser consideradas modelos potenciais para testes de toxicidade por sua presença em um número representativo de corpos aquáticos e pela facilidade de manutenção em cativeiro. Estão descritas a seguir duas espécies autóctones que apresentam as características citadas.

Hyphessobrycon bifasciatus (Pisces, Characidae) (Figura 4), espécie que alcança tamanho máximo de 5 centímetros, de coloração prata, apresenta duas faixas transversais negras próximas ao opérculo. Não apresenta acentuado dimorfismo sexual: o macho apresenta corpo mais alongado e os raios da nadadeira anal mais longos e curvos que na fêmea.

Conhecido popularmente como tetra amarelo, é encontrado em rios, riachos, córregos e lagoas nas regiões Sudeste e Centro Oeste, vivendo em pequenos cardumes, alimentando-se de larvas de insetos, vermes, matéria vegetal e até mesmo alevinos de outras espécies (SANTOS, 1981).

Os criadores de peixes para o mercado aquarista obtiveram êxito na reprodução dessa espécie, embora sem conhecimento detalhado das condições: temperatura de 25ºC, pH 7,0 (±0,2), alimentados com ração de peixes em flocos e

utilizando como local de desova raízes de plantas aquática flutuantes como *Eichhornia sp.*(aguapé) e *Pistia sp.* (alface d'água). Cada fêmea deposita em média 200 ovos, que eclodem após 48 horas (AXELROD,1995).

Geophagus brasiliensis (Pisces, Ciclidae) (Figura 4) apresenta tamanho máximo variando entre 16 e 20 cm, cabeça grande em relação ao corpo, que é comprimido lateralmente, sobre um fundo esverdeado mostra discretas faixas transversais escuras . Uma faixa negra, que desce do alto da nuca, atravessa os olhos até o ângulo pré-opercular. O macho na fase reprodutiva apresenta uma protuberância na cabeça que desaparece após a reprodução. Reproduz-se com grande facilidade, desovando aproximadamente 200 ovas no substrato e garantindo a sobrevivência da maior parte da prole com grande cuidado parental. A espécie pode suportar grandes variações de pH e temperatura, sendo encontrada em ambientes alcalinos, neutros ou ácidos e com temperatura da água entre 10°C e 30°C.

Conhecido como cará, é uma espécie extremamente abundante em ambientes do Brasil, da Bahia ao Rio Grande do Sul (SANTOS, 1981)

1.2.1.2 Espécies de peixes exóticas

Oreochromis niloticus(Pisces, Ciclidae) (Figura 4), a tilápia do Nilo, foi introduzida no Brasil em 1758. É uma espécie que tem sido muito usada na piscicultura mundial devido ao fato de ser bem resistente a doenças, possuir carne rica em proteína, ser bastante apreciada pela população, ter rápido ganho

de peso e aproveitar melhor o resíduo agropecuário, reduzindo assim o custo para cultivo. Essa espécie geralmente é cultivada em tanques sujeitos à contaminação por praguicidas utilizados em plantações próximas.

Danio rerio (Pisces, Cyprinidae) (Figura 7), conhecido como paulistinha no meio aquarista, era denominado como *Brachidanio rerio* até 1993 quando sua denominação foi alterada. É facilmente cultivado em cativeiro e por esse motivo são utilizados em testes de toxicidade na Europa e no Brasil. Apresenta um grande volume de dados sobre níveis de toxicidade a diversas substâncias, embora não seja encontrado dados que se refiram à toxicidade para praguicidas piretróides comerciais.

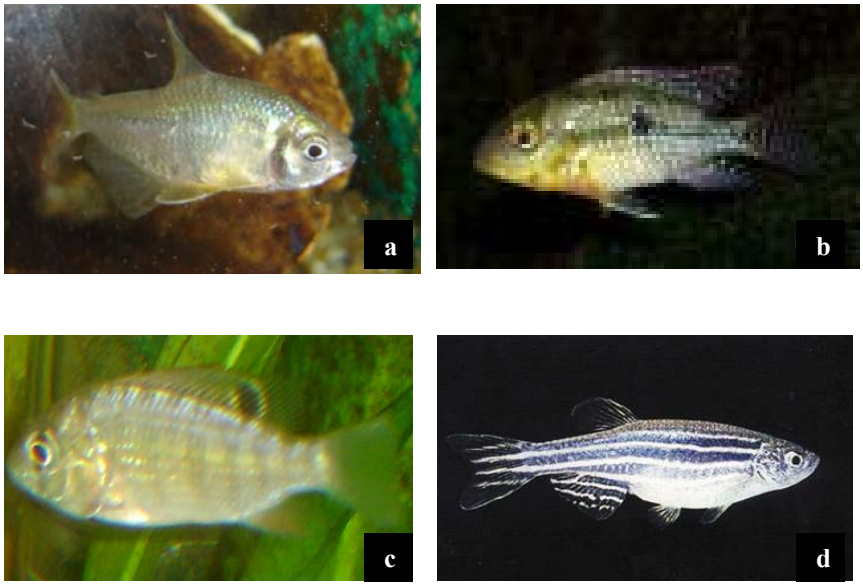


Figura 4 - Espécies de peixes (a) Hyphesobrycon bifasciatus, (b) Geophagus brasiliensis, (c) Oreochromis niloticus e (d) Danio rerio.

Deste modo, considera-se necessário que testes de toxicidade sejam realizados para se possa comparar a toxicidade do praguicida deltametrina para

espécies de peixes autóctones e espécies exóticas, além de se estabelecer a técnica mais adequada para essa comparação, seja por testes de toxicidade aguda ou avaliações mais sensíveis como análise anatomopatológica ou comportamental.

2 OBJETIVOS

Diante do que foi exposto, esse trabalho apresentou os objetivos descritos a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a toxicidade do praguicida deltametrina em formulação comercial para as espécies *Oreochromis niloticus, Danio rerio, Geophagus brasiliensis* e *Hyphessobrycon bifasciatus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Relacionar os valores da toxicidade da deltametrina entre a espécie exótica *Danio rerio* e a espécie autóctone *Hyphessobrycon bifasciatus.*

Estudar as ações do praguicida nos peixes testados por meio de testes comportamentais.

Realizar análises anatomopatológicas nas brânquias e fígado, procurando determinar possíveis alterações causadas pelo praguicida em estudo.

Avaliar a representatividade das espécies *Geophagus brasiliensis e Hyphessobrycon bifasciatus* em testes de toxicidade para avaliar os efeitos agudos de praguicidas piretróides.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos testes e obtenção dos resultados, foram utilizados os materiais e adotados os métodos descritos nesse capítulo.

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA DE MANUTENÇÃO E CULTIVO

Foram efetuadas análises físicas e químicas das amostras - temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido.

- **Temperatura:** Foi determinada utilizando-se termômetro de mercúrio .
- **pH –** Foi determinado com utilização de potenciômetro da marca Quimis, modelo Q400BC.
- **Condutividade elétrica -** Foi determinada com utilização do condutivímetro da marca Quimis, modelo Q795P.
- **Oxigênio dissolvido –** Essa variável foi determinada utilizando-se método iodométrico de Winkler.
- **Dureza** – Esse parâmetro foi determinado conforme Norma CETESB (1991 a).

3.2 CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS

Para realização dos testes com organismos em condições ideais, foram adotados as técnicas de manutenção de acordo com tamanho e hábitos conhecidos de cada espécie.

3.2.1 Manutenção de *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*

Os organismos obtidos diretamente do criador foram dispostos inicialmente em aquários com capacidade total de 100 litros, onde foram colocados 80 litros de água de manutenção obtida da rede de abastecimento e desclorada por aeração intensa durante 24 horas. Em cada recipiente foi colocada uma quantidade de organismos que mantivesse a relação entre massa dos organismos e volume de água de manutenção igual a 1,0 g de peixe por litro de água, conforme recomenda a norma CETESB (1990). Após o período de aclimatação de 48 horas, os organismos que não apresentaram sinais de doença ou comportamento anormal foram transferidos para aquários com capacidade total de 32 litros, mantidos durante uma semana para aclimatação total. Em cada aquário foram colocados apenas exemplares da mesma espécie.

A água de manutenção foi mantida à temperatura de 23ºC (± 2ºC), dureza 42 mg $L^{-1}CaCO_3$, pH 7,0 (± 0, 2), intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 12 horas/luz. A água foi aerada por meio de compressores de ar com saídas

conectadas a sistemas de filtragem com lã acrílica e carvão ativo, auxiliando, assim, a manutenção da qualidade da água, embora 25% do volume total fosse trocado a cada 7 dias.

A alimentação de peixes foi feita com rações destinadas a essa finalidade, observando-se que esta contivesse pelo menos 40% de proteína bruta. Forneceu-se diariamente a média de 4% de ração por massa fresca dos peixes. Foi utilizada a ração Tetramin® e ministrada conforme recomendado pelo fabricante, de acordo com a norma (CETESB,1990) , por corresponder às exigências nutricionais das espécies em questão, já que essa vem sendo criada pelos psicultores e aquaristas com grande êxito quando alimentada com esse produto.

3.2.2 Manutenção de *Oreochromis niloticus* e *Geophagus brasiliensis*

Os organismos obtidos diretamente do criador foram dispostos em aquários com capacidade total de 100 litros, onde foram colocados 80 litros de água de manutenção obtida da rede de abastecimento e desclorada por aeração intensa durante 24 horas. Em cada recipiente foram colocados 25 organismos da mesma espécie, com tamanho máximo de 5 centímetros.

A água de manutenção foi mantida à temperatura de 23ºC (± 2ºC), dureza 42 mg $L^{-1}CaCO_3$, pH 7,0 (± 0, 2), intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 12 horas/luz. A água foi filtrada e aerada por meio de filtro externo Millenium®

2000, com sistema de lã de acrílico e carvão ativo, embora 30% do volume total fosse trocado a cada 7 dias.

Na alimentação dos organismos, foi utilizada a ração Alcon® e ministrada conforme recomendado pelo fabricante, de acordo com a norma (CETESB,1990). Essa ração corresponde às exigências nutricionais das espécies em questão e é utilizada pelos criadores e aquaristas com grande êxito.

3.3 PRAGUICIDA UTILIZADO

Em todos os testes realizados utilizou-se formulação comercial K-Othrine® CE 25 (25g i.a L^{1} de deltametrina).

3.4 TESTES DE TOXICIDADE

A metodologia adotada para os testes de toxicidade aguda com peixes em sistema semi-estático baseia-se nas normas da EPA (1994) e CETESB (1990).

3.4.1 Toxicidade aguda para *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*

Foram utilizados organismos de tamanho homogêneo, obtidos dos lotes mantidos em laboratório. Os testes foram realizados em aquários com capacidade total de três litros. Em cada recipiente foram acondicionados 2,0 litros da amostra e 5 peixes, desse modo utilizaram-se três recipientes para cada solução-teste para que cada concentração fosse testada em 15 organismos. Os testes tiveram duração de 48 horas, sendo mantidos na temperatura normal de manutenção dos organismos. Durante esse período, os peixes não foram alimentados e as variáveis de pH, condutividade e oxigênio dissolvido foram analisadas no início e no final de cada teste.

A letalidade ocorrida durante o teste foi anotada após 3, 6, 24 e 48 horas após à exposição, sendo que os peixes mortos foram retirados e conservados em formaldeído 4%, para posterior obtenção de dados biométricos. Foram considerados mortos os peixes que não demonstraram reação após serem tocados no pedúnculo caudal.

Com a finalidade de estabelecer o intervalo de concentração para o teste de toxicidade definitivo, foram realizados testes agudos de 48 horas a fim de conhecer a toxicidade da amostra, determinando-se o intervalo entre a menor concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a maior concentração que não causou imobilidade.

3.4.2 Toxicidade aguda para *Geophagus brasiliensis* e *Oreocrhomis niloticus*

A metodologia adotada para os testes de toxicidade aguda com peixes em sistema semi-estático baseia-se nas normas da EPA (1994) e CETESB (1990).

Foram utilizados organismos de tamanho homogêneo , obtidos dos lotes mantidos em laboratório, onde os organismos alcançavam comprimento máximo de 5 centímetros. Os testes foram realizados em aquários com capacidade total de quatro litros. Em cada recipiente foram acondicionados 3,0 litros da amostra e 5 peixes, desse modo utilizou-se três recipientes para cada solução-teste para que cada concentração fosse testada em 15 organismos. Os testes tiveram duração de 48 horas, sendo mantidos na temperatura normal de manutenção dos organismos. Durante esse período, os peixes não foram alimentados e as variáveis de pH, condutividade e oxigênio dissolvido foram analisadas no início e no final de cada teste.

A letalidade ocorrida durante o teste foi anotada após 3, 6, 24 e 48 horas após a exposição, sendo que os peixes mortos foram retirados e conservados em

formaldeído 4%, para posterior obtenção de dados biométricos. Foram considerados mortos os peixes que não demonstraram reação após serem tocados no pedúnculo caudal.

Com a finalidade de estabelecer o intervalo de concentração para o teste de toxicidade definitivo, foram realizados testes agudos de 48 horas, determinando-se o intervalo entre a menor concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a maior concentração que não causou imobilidade.

3.5 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA PARA *Geophagus brasiliensis*

Para os testes anatomopatológicos, foi utilizada a espécie *Geophagus brasiliensis*, em função de sua maior resistência ao praguicida, o que permitiu maior tempo de exposição, e do tamanho dos indivíduos, que permitiu melhor coleta de material para preparação histológica.

Foram utilizados cinco aquários com 32 litros de capacidade e 10 peixes cada; um controle e os demais nas concentrações 0,1CL50 , 0,25 CL50 e 0,5Cl50 e 1,0CL50.

Como água de diluição utilizou-se água de cultivo. As soluções foram mantidas à temperatura de 23ºC (± 2ºC), intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 12 horas/luz. A água foi aerada por meio de bombas de ar e pedra porosa. Na alimentação dos organismos, foi utilizada a ração Alcon®.

Nos períodos 24 horas, 48 horas e 168 horas um organismo foi submetido à eutanásia em solução 50 mgL^{-1} de benzocaína e foram coletadas amostras de

brânquias e fígado para análise histológica. Não foram considerados para coletas das amostra os organismos mortos durante o teste em função da toxicidade do praguicida.

3.5.1 Histopatologia

Os órgãos coletados foram mantidos em soluções de formaldeído 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes; diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Para realização dos cortes foi utilizado micrótomo e após serem deparafinados em xilol, foram hidratados e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), sendo montados em lâmina e lamínula.

3.6 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO DAS ESPÉCIES *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus* EXPOSTOS À DELTAMETRINA

Foram empregadas nos testes para as espécies *D. rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus,* mais sensíveis nos testes de toxicidade aguda e, portanto, com alterações de comportamento facilmente observáveis em menor período de tempo.

Foram utilizadas quatro concentrações do praguicida, sendo a menor 0,1CL50, as intermediárias 0,4CL50 e 1,0CL50 e a maior 10CL50. Os experimentos constaram de 5 animais no controle e 10 animais por concentração e por espécie de peixe. A água destes aquários foi submetida a controle físico–químico (IBAMA, 1990). Os animais foram colocados nos aquários-teste com capacidade para três litros de água e foram demarcados, na parte frontal, quadrados proporcionais ao dobro do tamanho do peixe, totalizando seis quadrantes, três superiores e três inferiores. Esse procedimento foi adotado para facilitar a marcação da movimentação dos indivíduos durante o teste.

Após o período de 15 minutos, para estabilização das condições do peixe, a deltametrina foi dissolvida diretamente na água dos aquários, utilizando micropipetas e com diluições a partir de solução padrão 1000μg L^{-1} de deltametrina. Os parâmetros do comportamento dos peixes foram: subida à superfície, tremor e corrida, freqüência de aumento brusco da amplitude opercular, Os batimentos operculares dos peixes foram medidos nos intervalos 0-15, 30-35 e 45-50 minutos após a exposição às diferentes concentrações do piretróide. Os animais foram filmados por 1 hora e seus comportamentos avaliados posteriormente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da toxicidade aguda, no qual determina-se a CL(I)50; 24 ou 48 horas, ou seja, a concentração de agente tóxico que causa imobilidade para 50% dos organismos expostos no período de 24 ou 48 horas (CETESB,1992), foi utilizado o programa computacional “LC50 Programs JSPear test” (HAMILTON,1977). Para comparar os valores de CL50;48h das diferentes espécies, foi utilizado o teste comparativo múltiplo ANOVA paramétrico. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes para $P < 0.05$.

Os parâmetros físico-químicos e as mortalidades foram relacionados por análise de agrupamento, utilizando o programa computacional Statistica. Esta análise é utilizada para organizar conjuntos de objetos ou dados em grupos cada vez maiores usando medidas de similaridade ou distância.

Os resultados obtidos nos testes de comportamento foram analisados utilizando o programa GraphPad - Instat, sendo empregada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet para comparação dos grupos com o grupo controle, tanto para as latências quanto para as freqüências dos comportamentos.

4 RESULTADOS

Os testes realizados apresentaram os resultados apresentados nesse capítulo.

4.1 TOXICIDADE AGUDA DO PRAGUICIDA DELTAMETRINA

Os testes realizados demonstraram toxicidade do praguicida semelhante para *D. rerio* e *H. bifasciatus.* Os valores de CL50;48h assim estimados foram 0,078 ug L^{-1} para *D. rerio* (Tabela 2 e Figura 5) e 0,082 ug L^{-1} para *H. bifasciatus* (Tabela 3 e Figura 6), com intervalos de confiança de 95% de probabilidade 0,05-0,11 ug L^{-1} para ambas.

Tabela 2 - Valores de CL50;48h do praguicida deltametrina para *Danio rerio.* Dados obtidos de 5 testes com 15 animais/teste.

Número do ensaio	**CL50;48h (µg L^{-1})**	**Intervalo de Confiança**
1	0,08	0,07-0,10
2	0,07	0,06-0,09
3	0,07	0,05-0,09
4	0,08	0,07-0,10
5	0,09	0,07-0,11
CL50;48h médio	0,078	
Faixa de toxicidade (±2σ)	0,05 a 0,11	
Desvio-padrão	0,008367	
Coeficiente de Variação	10,73%	

P<0,05

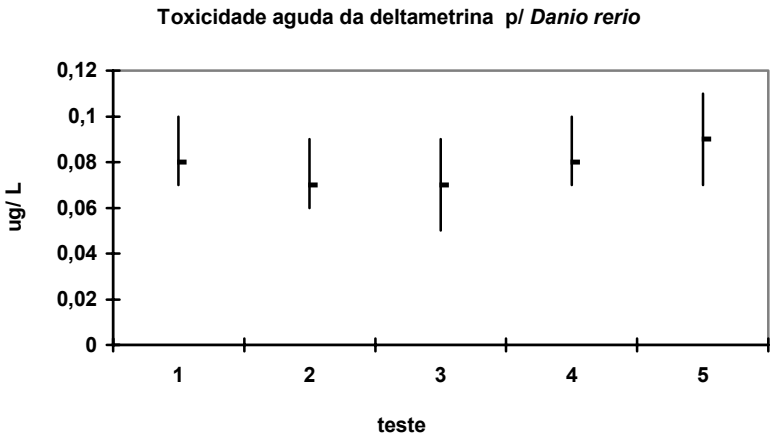


Figura 5 - Toxicidade aguda do praguicida deltametrina para *Danio rerio*

Tabela 3 - Valores de CL50;48h do praguicida deltametrina para *Hyphessobrycon bifasciatus.* Dados obtidos de 5 testes com 15 animais/teste.

Número do ensaio	CL50;48h (µg L^{-1})	Intervalo de Confiança
1	0,09	0,08-0,11
2	0,07	0,05-0,10
3	0,08	0,07-0,10
4	0,08	0,07-0,10
5	0,09	0,08-0,11
CL50;48h médio	0,082	
Faixa de toxicidade ($\pm 2\sigma$)	0,05 a 0,11	
Desvio-padrão	0,008637	
Coeficiente de Variação	10,53%	

$P<0,05$

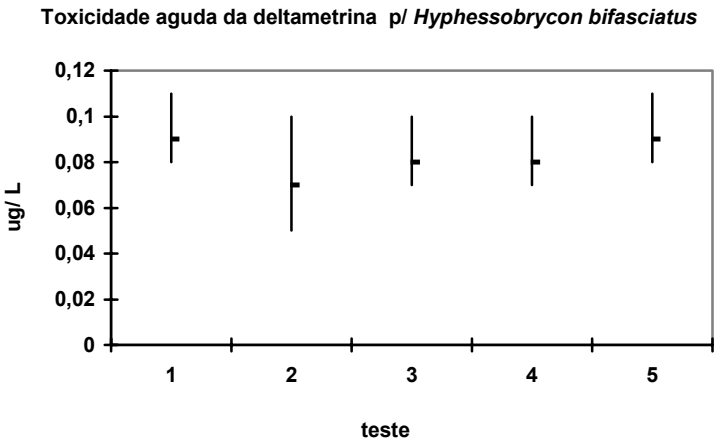


Figura 6 - Toxicidade aguda do praguicida deltametrina para *Hyphessobrycon bifasciatus*

Os testes realizados com as espécies *G. brasiliensis* apresentaram valores de CL50;48h médios estimados em 0,594 ug L^{-1} com intervalos de confiança de 95% de probabilidade de 0,33-0,94 ug L^{-1} (Tabela 4 e Figura 7).

Tabela 4 - Valores de CL50;48h do praguicida deltametrina para *Geophagus brasiliensis.* Dados obtidos de 5 testes com 15 animais/teste.

Número do ensaio	CL50;48h (µg L^{-1})	Intervalo de Confiança
1	0,66	0,51-0,85
2	0,45	0,33-0,61
3	0,63	0,46-0,85
4	0,71	0,53-0,94
5	0,52	0,39-0,69
CL50;48h médio	0,594	
Faixa de toxicidade (±2σ)	0,33 a 0,94	
Desvio-padrão	0,106442	
Coeficiente de Variação	17,91%	

P<0,05

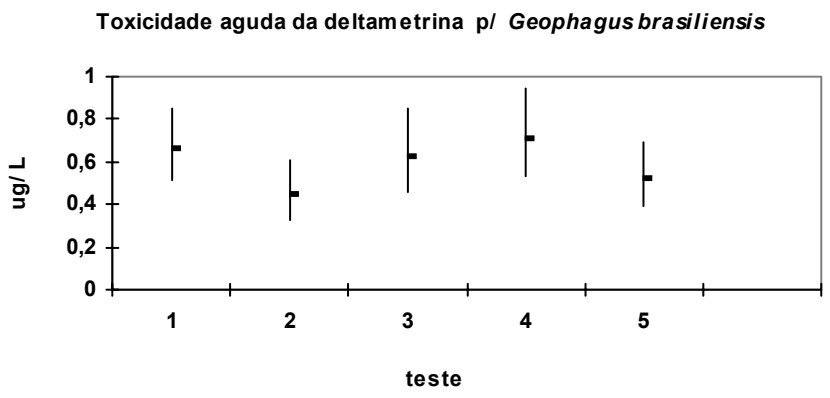


Figura 7 - Toxicidade aguda do praguicida deltametrina para *Geophagus brasiliensis*

A espécie *O. niloticus* apresentou nos testes os maiores valores de CL50;48h entre as espécies utilizadas, estimados em 0,954 ug L^{-1} com intervalos de confiança de 95% de probabilidade de 0,71-1,22 ug L^{-1} (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5 - Valores de CL50;48h do praguicida deltametrina para *Oreochromis niloticus.* Dados obtidos de 5 testes com 15 animais/teste.

Número do ensaio	CL50;48h (µg L^{-1})	Intervalo de Confiança
1	0,97	0,80-1,19
2	0,95	0,81-1,12
3	1,02	0,85-1,22
4	0,90	0,71-1,13
5	0,93	0,79-1,10
CL50;48h médio	0,954	
Faixa de toxicidade (±2σ)	0,71 a 1,22	
Desvio-padrão	0,045056	
Coeficiente de Variação	4,72%	

P<0,05

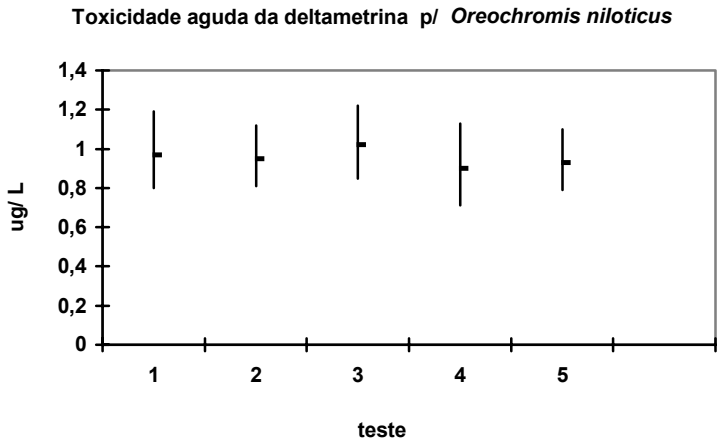


Figura 8 - Toxicidade aguda do praguicida deltametrina para *Oreochromis niloticus*

Nenhuma mortalidade foi observada em grupo de controle durante as experiências.

O teste ANOVA mostrou diferenças significativas entre os valores de CL50;48h das espécies de peixes utilizadas ($F(3/19) = 269,85$, $P < 0,0001$). O teste Turkey-Kramer mostra que os valores de CL50;48h das espécies *D. rerio* e *H bifasciatus* são semelhantes (Figura 9).

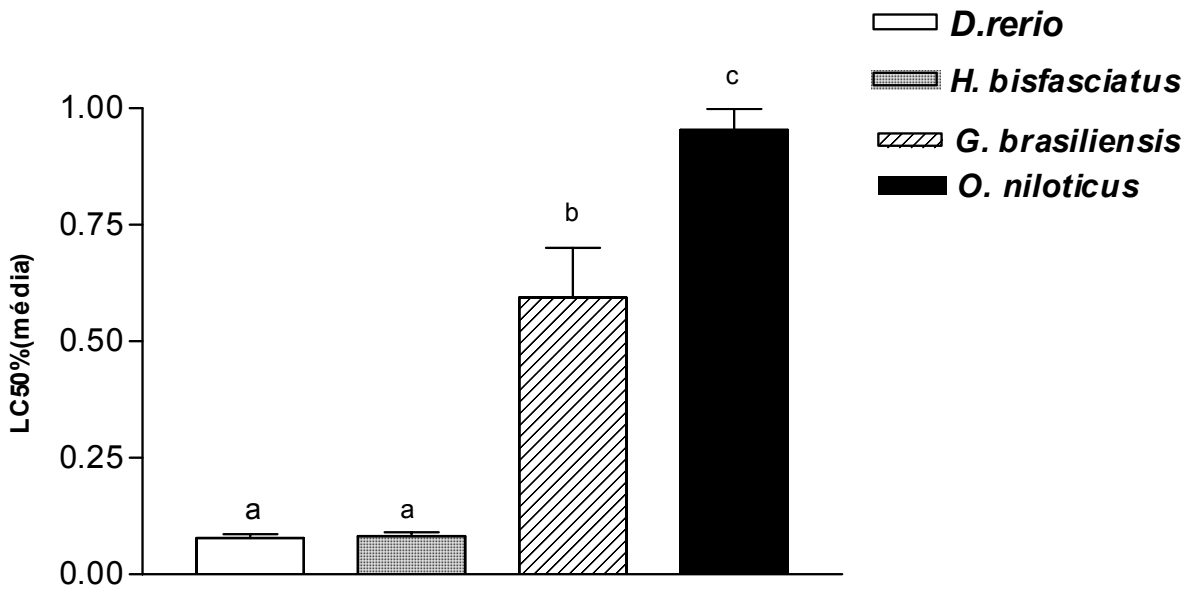


Figura 9 - Concentração letal a 50% dos organismos testados com deltametrina para as diferentes espécies de peixes. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão . N= 5. Anova seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tuckey –Kramer. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre os dados.

4.2 RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO E LETALIDADE NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

As análises de agrupamento realizadas com os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda com as quatro espécies de peixes demonstraram relações diretas entre as concentrações do praguicida deltametrina e a letalidade. O agrupamento demonstrado entre os valores de pH e oxigênio dissolvido evidência as pequenas variações demonstradas entre todos os testes realizados com cada espécie.

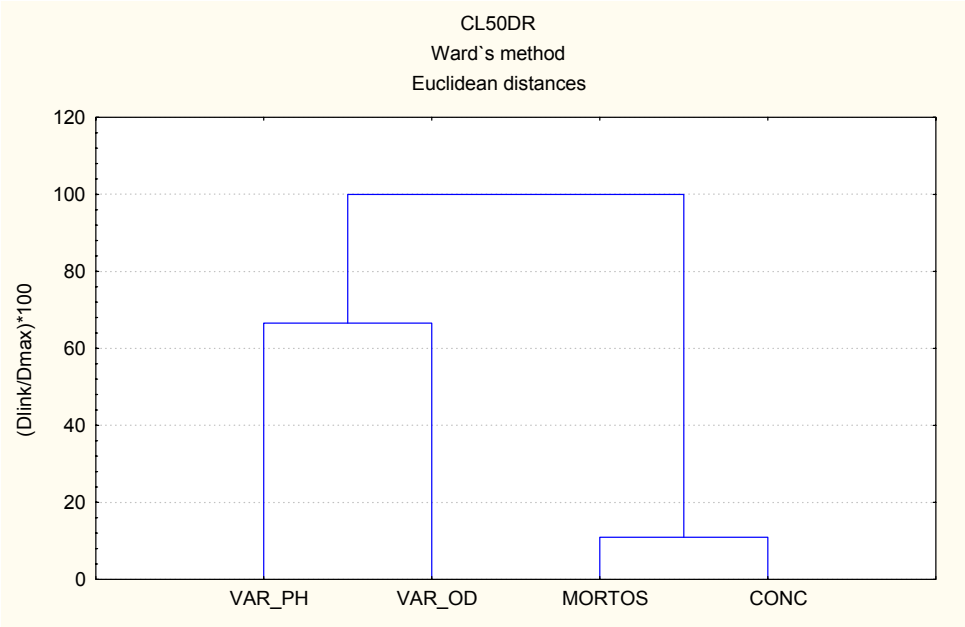


Figura 10 - Teste de análise de agrupamento realizado com as variações de pH, oxigênio dissolvido, letalidade e concentrações de deltametrina para a espécie *Danio rerio.* Os testes demonstram semelhança entre as variações de mortalidade e concentração de praguicida.

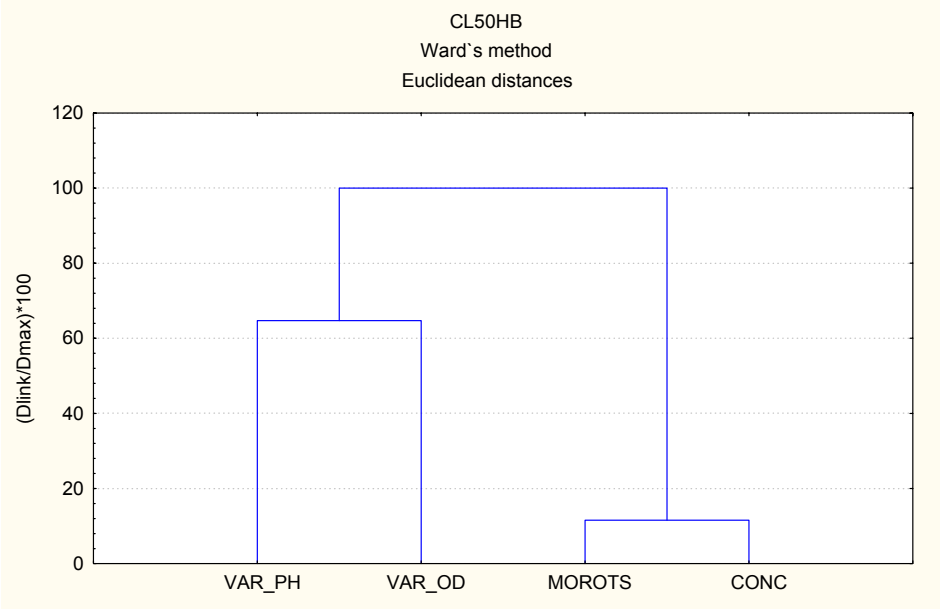


Figura 11 - Teste de análise de agrupamento realizado com as variações de pH, oxigênio dissolvido, letalidades e concentrações de deltametrina para a espécie *Hiphessobrycon bifasciatus* nos cinco testes de toxicidade realizados. Os testes demonstram semelhança entre as variações de mortalidade e concentração de praguicida.

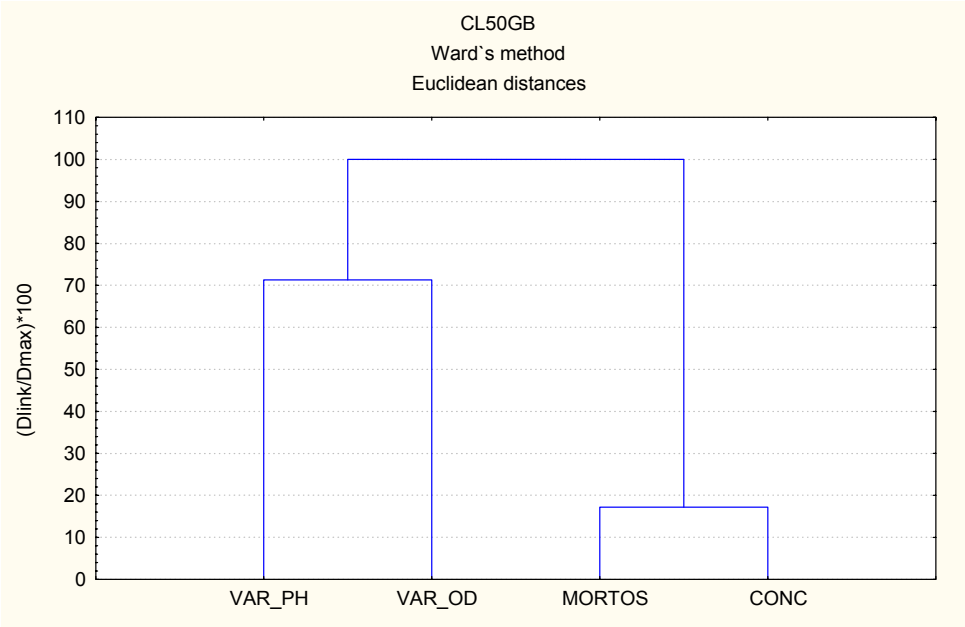


Figura 12 - Teste de análise de agrupamento realizado com as variações de pH, oxigênio dissolvido, letalidades e concentrações de deltametrina para a espécie *Geophagus brasiliensis* nos cinco testes de toxicidade realizados. Os testes demonstram semelhança entre as variações de mortalidade e concentração de praguicida.

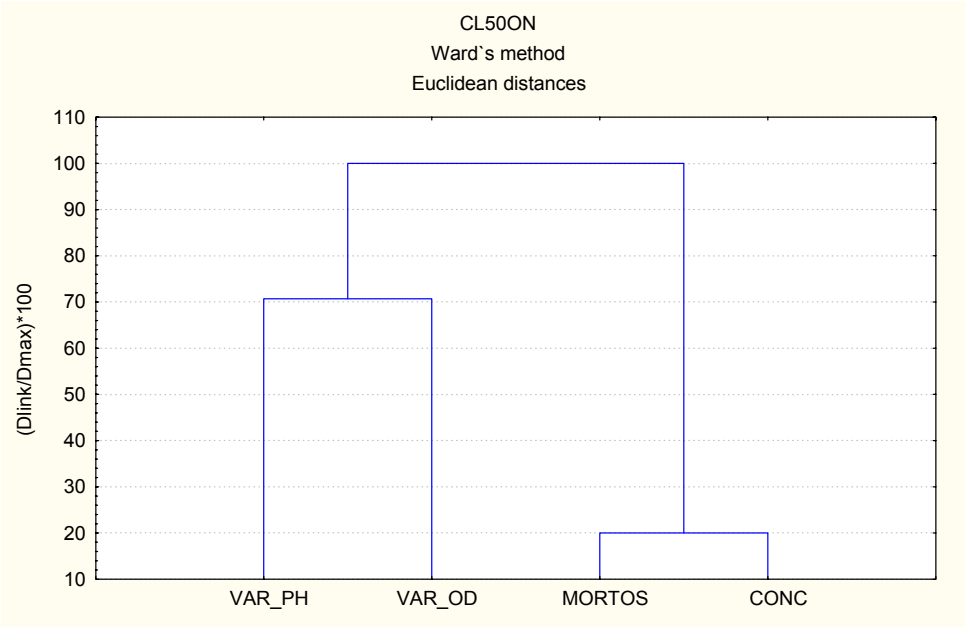


Figura 13 - Teste de análise de agrupamento realizado com as variações de pH, oxigênio dissolvido, letalidades e concentrações de deltametrina para a espécie *Oreochromis niloticus* nos cinco testes de toxicidade realizados. Os testes demonstram semelhança entre as variações de mortalidade e concentração de praguicida.

4.3 ANÁLISE DE COMPORTAMENTO

Os parâmetros de comportamento analisados, freqüência de subida à superfície, tremor/corrida, freqüência opercular e perda de equilíbrio, apresentaram os resultados:

4.3.1 Freqüência de comportamentos das espécies *D. rerio* e *H. bifasciatus* durante exposição a deltametrina.

A freqüência de comportamentos de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina que foram observados por 60 minutos, sendo apresentadas às médias e respectivos erros-padrão das freqüências na Tabela 6.

Com relação à freqüência de subida a superfície, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 4,302$, $p = 0,0060$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de subida a superfície ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de perda de equilíbrio, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 4,326$, $p = 0,0059$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1 CL50 e 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de perda de equilíbrio ($p < 0.05$), indicando

também, que os animais expostos a CL50 apresentaram aumento muito significante desta freqüência ($p < 0.01$).

Com relação à freqüência de tremor/corrida, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 7,446$, $p = 0,0002$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a CL50 apresentaram aumento significativo da freqüência de tremor/corrida ($p < 0.01$).

Com relação à freqüência de amplitude opercular, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (2/20) = 11,516$, $p = 0,0005$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de amplitude opercular ($p < 0.01$).

Tabela 6 - Freqüência de comportamentos de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Comportamentos	**Controle 5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
Subida á Superfície	12,80 ± 3,76	9,11 ± 1,36	16,44 ± 3,79	15,78 ±2,84	36,89 ± ,5*
Perda de Equilíbrio	0,40 ± 0,40	18,67 ± 5,0*	26,89 ± 3,7**	15,11 ±2,53	20,67 ±4,8*
Tremor/Corrida	21,80 ± 5,40	39,44 ± 5,19	52,78 ± 5,6**	24,56 ± ,68	18,78 ±5,35
Amplitude Opercular	11,60 ± 3,07	42,78 ± 5,7**	21,33 ± 2,82		

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle
** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle

A latência dos comportamentos de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, que foram observados por 60 minutos, estão apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das latências na tabela 7.

Com relação à latência de subida a superfície, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 2,009, p = 0,1141).

Com relação à latência de perda de equilíbrio, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 2,432, p = 0,0652).

Com relação à latência de tremor/corrida, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 1,315, p = 0,2829).

Com relação à latência de amplitude opercular, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (2/20) = 1,517, p = 0,2436).

Tabela 7 - Latência dos comportamentos de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das latências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Comportamentos	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
Subida á Superfície	119,20 ± 35,57	289,78 ± 141,71	225,78 ± 47,20	55,00 ± 12,18	68,56 ± 18,91
Perda de Equilíbrio	331,00 ± 331,00	960,56 ± 195,40	451,00 ± 73,25	307,89 ± 175,34	362,67 ± 166,25
Tremor/Corrida	230,00 ± 77,30	409,11 ± 117,04	204,67 ± 52,31	150,78 ± 94,26	431,44 ± 163,66
Amplitude Opercular	264,80 ± 92,53	242,67 ± 80,64	425,00 ± 80,77		

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* p < 0.05 em relação ao grupo controle

A freqüência de comportamentos de peixes *Hiphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina que foram observados por 60 minutos, sendo apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências, estão demonstrados na tabela 8.

Com relação à freqüência de subida a superfície, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 5,68, p = 0,0012). O teste de

Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de subida a superfície em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de perda de equilíbrio, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 4,245$, $p = 0,0065$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1 CL50 e CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de perda de equilíbrio ($p < 0.05$), indicando também, que os animais expostos a CL50 apresentaram aumento muito significante desta freqüência ($p < 0.01$).

Com relação à freqüência de tremor/corrida, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 4,479$, $p = 0,0049$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de tremor/corrida ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de amplitude opercular, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (2/20) = 4,390$, $p = 0,0263$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 e CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de amplitude opercular ($p < 0.01$).

Tabela 8 - Freqüência de comportamentos de peixes *Hyphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Comportamentos	**Controle(5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
Subida á Superfície	0,40 ± 0,40	32,33 ± ,54*	21,22 ± 7,03	18,22 ± 5,71	3,67± 1,47
Perda de Equilíbrio	0,00 ± 0,00	16,22 ± ,86*	20,00 ± 5,11*	9,56 ± 0,71	5,44 ± 2,23
Tremor/Corrida	9,20 ± 4,66	34,89 ± ,97*	18,11 ± 5,46	24,44 ± 6,24	4,00 ± 1,62
Amplitude Opercular	8,60 ± 3,66	2,67 ± 0,01*	1,67± 0,73*		

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
*p < 0.05 em relação ao grupo controle

A tabela 9 mostra a latência dos comportamentos de peixes *Hyphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos, sendo apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das latências.

Com relação à latência de subida a superfície, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 1,165, p = 0,3422).

Com relação à latência de perda de equilíbrio, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 2,811, p = 0,0396). No entanto, não foi detectada pelo teste de Dunnet diferenças entre os animais do grupo controle e aqueles expostos ao praguicida.

Com relação à latência de tremor/corrida, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 1,908, p = 0,1303).

Com relação à latência de amplitude opercular, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas (F (2/20) =1,076, p = 0,3599).

Tabela 9 - Latência dos comportamentos de peixes *Hyphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das latências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Comportamento	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
Subida á Superfície	213, 80 ± 213,80	740,44 ± 321,37	246,78 ± 79,12	757,11± 339,37	233,11 ± 223,17
Perda de Equilíbrio	1056,00 ± 651,10	842,56 ± 250,42	714,33 ± 297,25	147,22 ± 65,65	27,33 ± 5,00
Tremor/Corrida	959,40 ± 561,96	973,00 ± 227,17	623,44 ± 350,12	923,89 ± 320,15	27,11 ± 10,30
Amplitude Opercular	244,20 ± 167,88	473,33 ± 189,32	780,22 ± 291,47		

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle

4.3.2 Alteração na movimentação de *D. rerio* e *H. bifasciatus*

Nos experimentos realizados com a espécie *D. rerio,* a Tabela 10 demonstra a freqüência de movimentação nos quadrantes superiores de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos, sendo apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores nos primeiros 10 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 3,779$, $p = 0,0115$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores nos primeiros 10 minutos ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 20 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 0,3251$, $p = 0,8593$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 30 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 0,6610$, $p = 0,6231$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 40 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 1,124$, $p = 0,3604$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 50 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 4,730$, $p = 0,0036$). O teste de Dunnet não indicou significância da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 60 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 3,907$, $p = 0,098$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 60 minutos ($p < 0.05$).

Tabela 10 - Freqüência de movimentação nos quadrantes superiores de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Minutos	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
10	5,40 ± 0,87	5,44 ± 0,93	7,22 ± 0,60	7,22 ± 1,08	9,22 ± 0,22*
20	6,20 ± 0,80	5,33 ± 1,25	6,89 ± 1,06	6,78 ± 1,54	7,00 ± 1,13
30	5,00 ± 0,84	6,56 ± 0,96	7,11 ± 1,02	6,11 ± 1,56	4,44 ± 1,76
40	5,20 ± 1,62	5,44 ± 1,45	7,33 ± 1,20	5,89 ± 1,57	3,22 ± 1,41
50	5,60 ± 1,03	4,67 ± 1,26	7,56 ± 1,18	5,78 ± 1,68	0,55 ± 0,55
60	5,80 ± 1,59	4,00 ± 1,55	6,78 ± 1,42	5,56 ± 1,58	0,11 ± 0,11*

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle

A tabela 11 demonstra a freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos, sendo apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 10 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 3,942$, $p = 0,0094$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 10 minutos ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 20 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 0,3251$, $p = 0,8593$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 30 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 0,5739$, $p = 0,6833$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 40 minutos, a ANOVA não indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 1,112$, $p = 0,3661$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 50 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 4,833$, $p = 0,0032$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 50 minutos ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 60 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F(4/36) = 4,083$, $p = 0,0079$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 10CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 60 minutos ($p < 0.05$).

Tabela 11 - Freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Minutos	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
10	5,00 ±1,09	4,56 ± 0,93	2,78 ± 0,60	2,78 ± 1,08	0,78 ± 0,22**
20	3,80 ± 0,80	4,67 ± 1,25	3,11 ± 1,06	3,22 ± 1,54	3,00 ±1,13
30	5,00 ± 0,84	3,89 ± 1,14	2,89 ± 1,02	3,89 ± 1,56	5,56 ± 1,76
40	4,80 ± 1,63	4,67 ± 1,49	2,67 ± 1,20	4,11 ± 1,57	6,78 ± 1,41
50	4,20 ± 0,86	5,33 ± 1,26	2,44 ± 1,18	4,22 ± 1,68	4,44 ± 0,56*
60	4,20 ± 1,59	6,00 ± 1,55	3,11 ± 1,36	4,44 ± 1,58	9,89 ± 0,11*

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle
** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle

Nos experimentos realizados com a espécie *H. bifasciatus,* a tabela 12 demonstra a freqüência de movimentação nos quadrantes superiores de peixes *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos, sendo apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores nos primeiros 10 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 5,005$, $p = 0,0024$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores nos primeiros 10 minutos ($p < 0.05$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 20 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) =

0,3,118, p = 0,0266), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 30 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 3,422, p = 0,0180, porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 40 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 4,773, p = 0,0036), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 50 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 3,463, p = 0,0171). O teste de Dunnet não indicou significância da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 60 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 4,757, p = 0,035). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes superiores em 60 minutos ($p < 0.05$).

Tabela 12 - Freqüência de movimentação nos quadrantes superiores de peixes *Hyphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Minutos	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
10	0,00 ± 0,00	2,89 ± 0,98	4,67 ± 1,13*	0,33 ± 0,17	1,78 ± 0,78
20	1,60 ± 1,17	5,00 ± 1,27	5,89 ± 1,57	0,56 ± 0,56	3,33 ± 1,40
30	1,60 ± 1,36	5,22 ± 1,09	6,33 ± 1,59	1,33 ±1,09	1,78 ± 1,16
40	1,80 ± 1,80	6,56 ± 1,39	5,89 ± 1,33	3,00 ± 1,53	0,00 ± 0,00
50	3,00 ± 2,00	6,33 ± 1,16	3,56 ± 1,44	4,44 ± 1,55	0,00 ± 0,00
60	0,80 ± 0,80	6,11 ± 1,18*	2,33 ± 1,37	4,78 ± 1,56	0,00 ± 0,00

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle

Na avaliação da movimentação nos quadrantes inferiores para a espécie *H. bifasciatus*, a ANOVA de duas vias aplicada entre os tratamentos e as sessões de observação indicou que os tratamentos alteraram os resultados ($F(1,74/216) = 1,74$, $p < 0,0$) enquanto que as sessões de observação não modificaram os resultados ($F (5/216) = 0,85$, $p = 0,5157$). Houve interação entre os fatores ($F (20/216) = 1,74$, $p= 0,0288$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 10 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) = 4,306$, $p = 0,0060$). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 10 minutos ($p < 0.01$).

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 20 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas ($F (4/36) =$

3,1901, p = 0,0243), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 30 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 3,466, p = 0,0170), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 40 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 3,982, p = 0,0089), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 50 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 3,463, p = 0,0171), porém o teste de Dunnet não detectou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos.

Com relação à freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 60 minutos, a ANOVA indicou a existência de diferenças significativas (F (4/36) = 5,209, p = 0,0020). O teste de Dunnet indicou que os animais expostos a 0,1CL50 e 10 CL50 apresentaram aumento significante da freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores em 60 minutos ($p < 0.05$).

Tabela 13 - Freqüência de movimentação nos quadrantes inferiores de peixes *Hyphessobrycon bifasciatus* expostos a diferentes concentrações de deltametrina, observados por 60 minutos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das freqüências. ( ) = número de animais.

	Grupos				
Minutos	**Controle (5)**	**0,1CL50 (9)**	**CL50 (9)**	**4 CL50 (9)**	**10 CL50 (9)**
10	10,00 ±0,00	7,11 ± 0,98	5,22 ± 1,14*	9,67 ± 0,17	7,33 ± 1,11
20	8,40 ± 1,17	5,00 ± 1,27	4,11 ± 1,57	9,44 ± 0,56	5,89 ± 1,39
30	8,40 ± 1,36	4,78 ± 1,09	3,67 ± 1,59	8,67 ± 1,09	8,33 ± 1,18
40	7,40 ± 1,78	3,44 ± 1,39	4,44 ± 1,53	7,00 ± 1,53	10,00 ± ,00
50	7,00 ± 2,00	3,67 ± 1,16	6,44 ± 1,44	5,56 ± 1,55	10,00 ± ,00
60	9,20 ± 0,80	3,89 ± 1,18*	6,67 ± 1,52	4,11 ± 1,53*	10,00 ± ,00

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.
* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle

Tabela 14 - Relação de indivíduos vivos e mortos da espécie *Danio rerio*, ao término dos experimentos, nas diferentes concentrações de deltametrina.

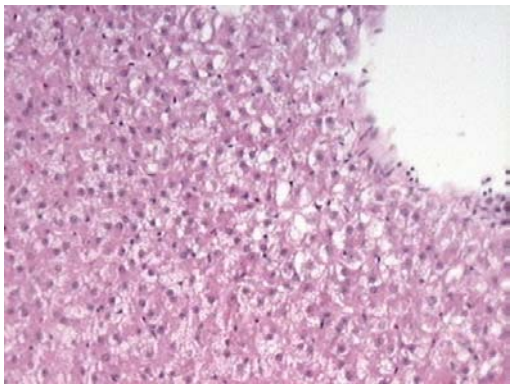
Concentrações	Vivos	Mortos	Total
Controle	5	0	5
0,1 CL50	9	0	9
CL50	9	0	9
4 CL50	7	2	9
10 CL50	4	5	9

4.4 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

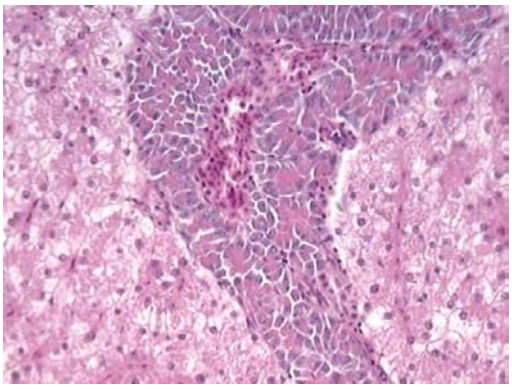
As alterações histopatológicas estão apresentadas em ordem crescente de concentração de deltametrina em cada órgão avaliado na espécie *Geophagus brasiliensis.*

4.4.1 Fígado

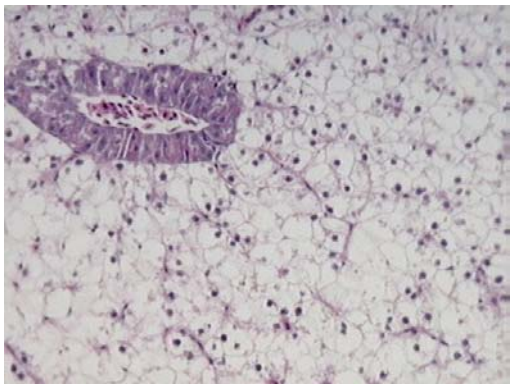
Ao exame histopatológico, o grupo controle apresentou parênquima hepático preservado, com a manutenção das estruturas lobulares e contendo núcleos centrais esféricos. Após 24 horas de exposição à solução de deltametrina, observa-se alterações morfológicas como degeneração nuclear, vacuolização citoplasmática, macrogotículas e perda de individualização celular em todas as concentrações. O número de alterações, após 48 e 168 horas aumentou significativamente (Figuras 14, 15 e 16).



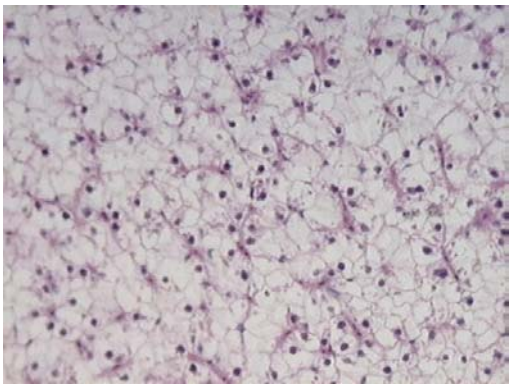
CONTROLE



0,1CL50 24h

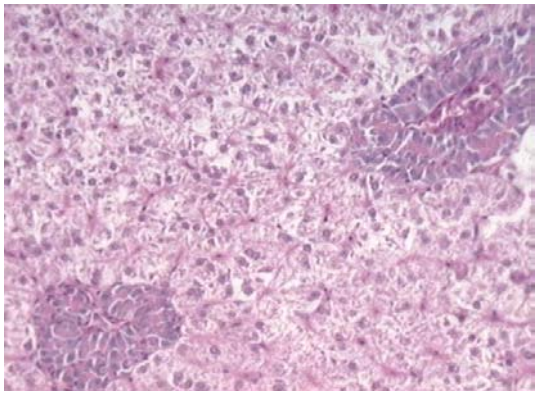


0,1CL50 24h

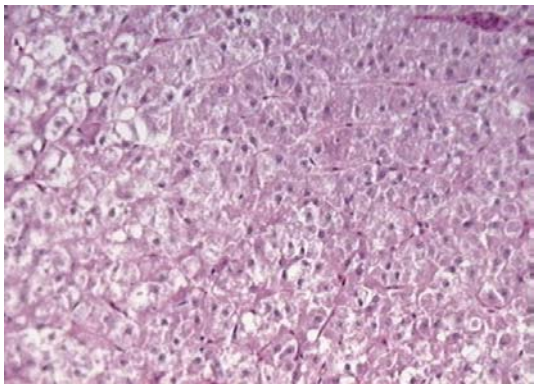


0,1CL50 168h

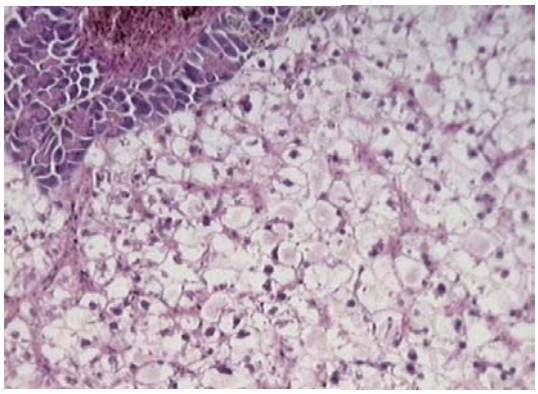
Figura 14 - Fotomicrografia do tecido hepático de *Geophagus braziliensis* do grupo controle e após exposição à dose de deltametrina equivalente a 0,1CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Notar degeneração hepática caracterizada por intensa vacuolização citoplasmática, que se acentua com a evolução do tempo. (HE X 20)



0,4CL50 24h

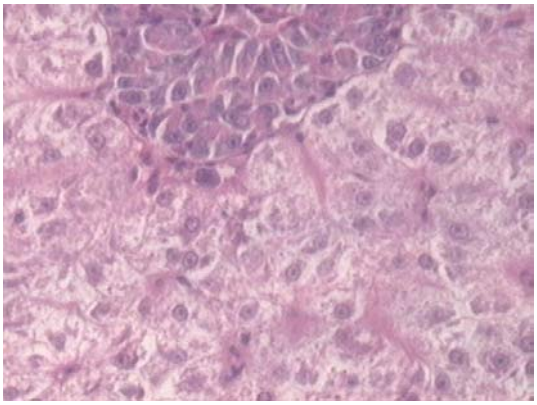


0,4CL50 48h

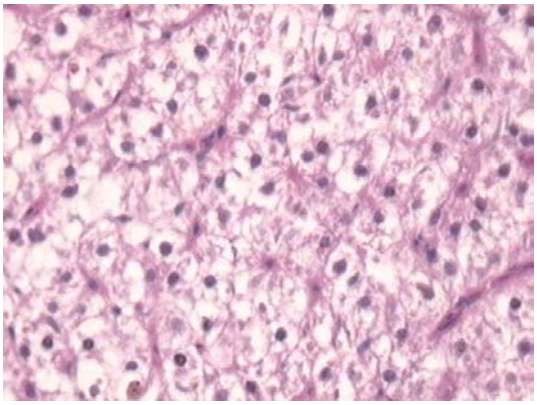


0,4CL50 168h

Figura 15 : Fotomicrografia do tecido hepático de *Geophagus braziliensis* após exposição à dose de deltametrina equivalente a 0,4CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Observa-se intenso processo de degenerativo caracterizado por degeneração nuclear e vacuolização citoplasmática. (HE X 20)



1,0CL50 24h

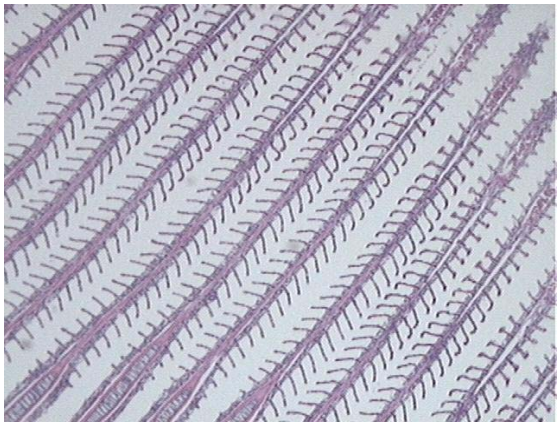


1,0CL50 48h

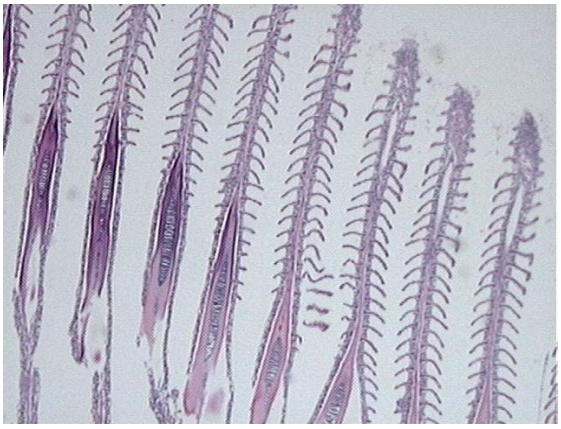
Figura 16 - Fotomicrografia do tecido hepático de *Geophagus braziliensis* após exposição à dose de deltametrina equivalente a 1,0CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Observa-se intenso processo degenerativo (vacuolização citoplasmática, degeneração nuclear e perda dos limites celulares. (HE X 40)

4.4.2 Brânquias

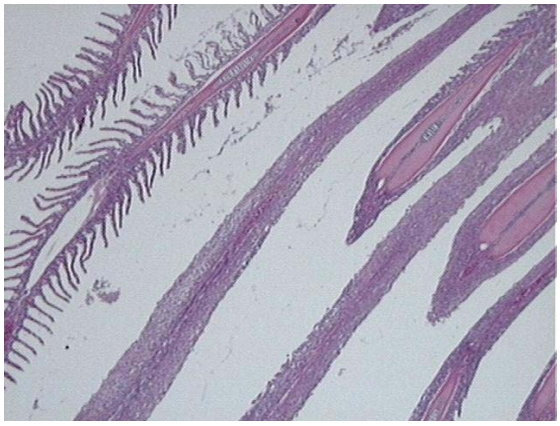
Durante a exposição à doses crescentes de deltametrina por períodos de 24, 48 e 168 horas, observou-se uma resposta celular caracterizada por proliferação interlamelar hiperplásica na superfície epitelial do ápice dos filamentos. Alterações morfológicas como hiperplasia do epitélio circundante e distorção do eixo filamentar são observados freqüentemente em todas as concentrações de deltametrina em que os peixes foram expostos, aumentando sempre em função do tempo de exposição e da concentração de praguicida, e culminando com a fusão das lamelas branquiais (Figuras 17, 18 e 19).



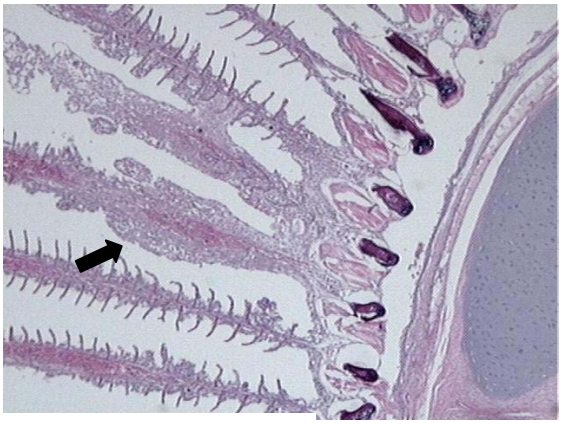
Controle



0,1CL50 24h

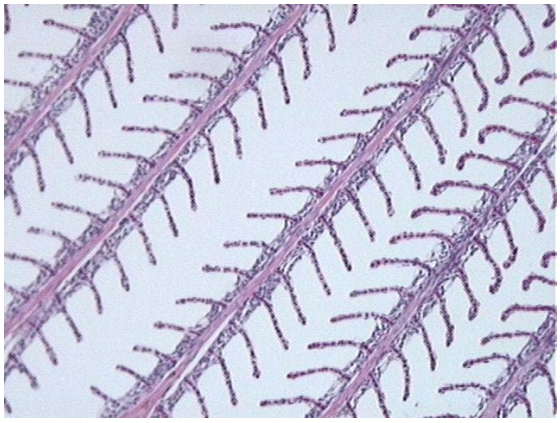


0,1CL50 48h

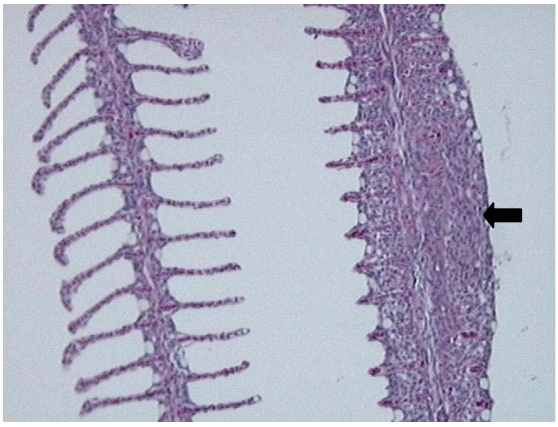


0,1CL50 168h

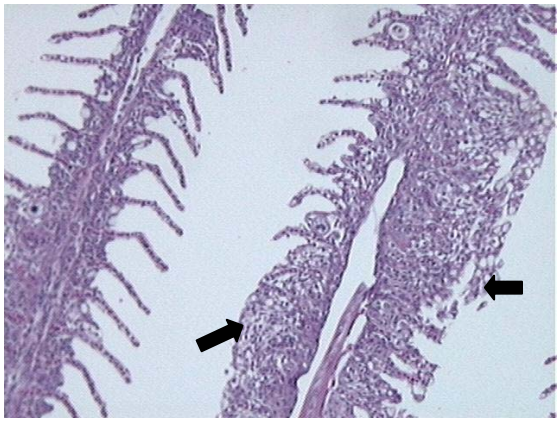
Figura 17 - Fotomicrografia da brânquia de *Geophagus braziliensis* do grupo controle e após exposição à dose de deltametrina equivalente a 0,1CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Nota-se hiperplasia das células do epitélio branquial, que chegam à fusão no período de 168 horas (seta). (HE X 4)



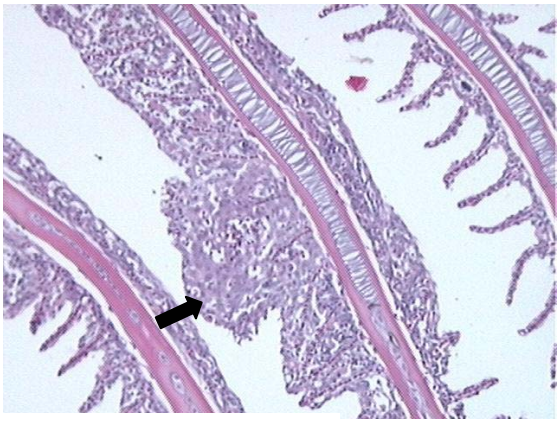
Controle 10X



0,4CL50 24h 20X



0,4CL50 48h 20X



0,1CL50 168h 20X

Figura 18 - Fotomicrografia da brânquia de *Geophagus braziliensis* do grupo controle e após exposição à dose de deltametrina equivalente a 0,4CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Observa-se fusão das lamelas branquiais em decorrência da hiperplasia das células epiteliais (seta). (HE X 20)

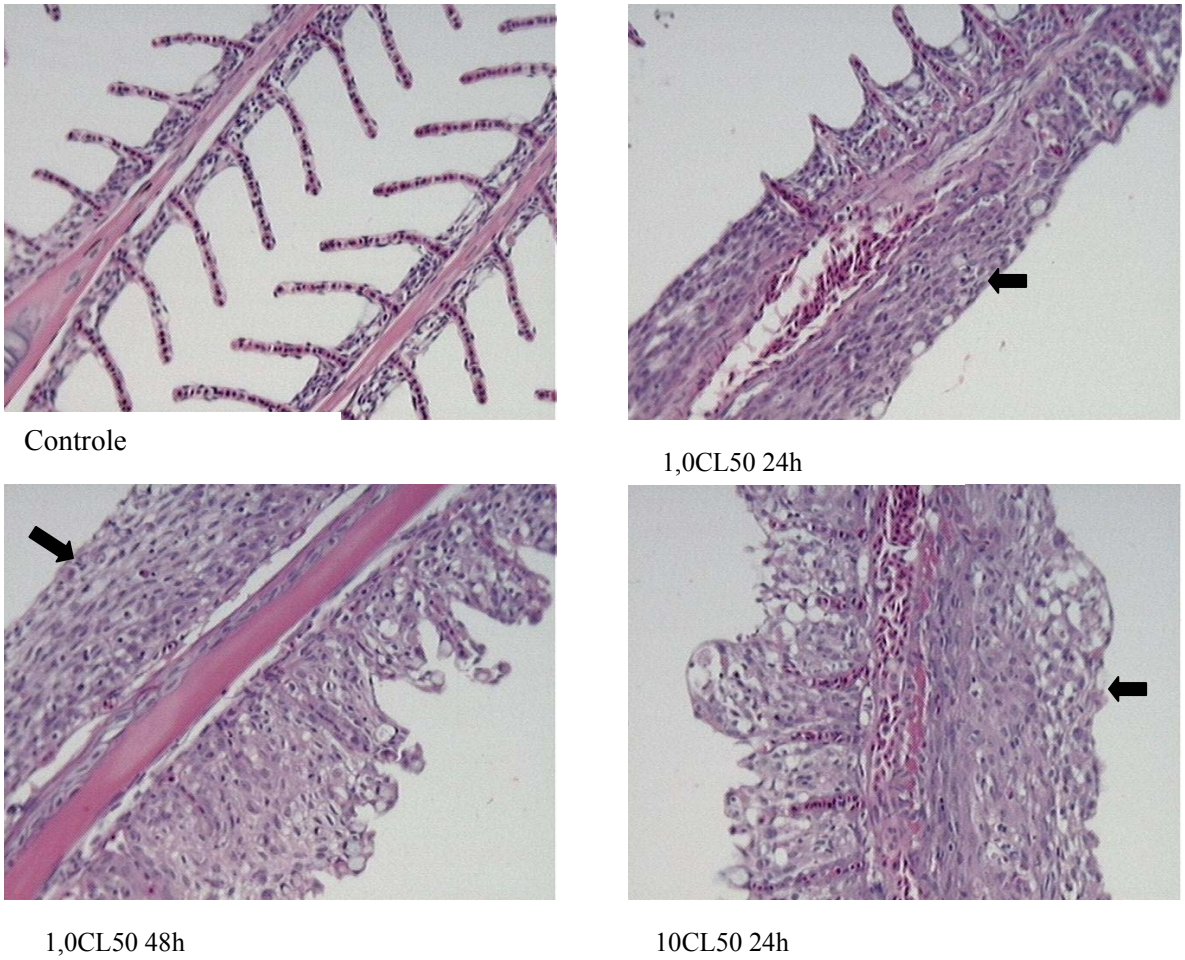


Figura 19 - Fotomicrografia da brânquia de *Geophagus braziliensis* do grupo controle e após exposição à dose de deltametrina equivalente a 1,0CL50 por períodos de 24, 48 e 168 horas. Nota-se intenso processo de fusão das lamelas em curto período de tempo (seta). (HE X 40)

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a DTM em estudo é altamente tóxica para todas as espécies de peixe testadas. A baixa toxicidade da deltametrina para mamíferos pode causar sérios enganos quando extrapolada para espécies aquáticas.

O Programa Nacional de Avaliação de Impacto de Praguicidas Agrícolas (do inglês, *USDA National Agricultural Pesticides Impact Assesment Program´s EXTOXNET*), relata valores de CL50 para deltametrina em peixes entre 1,0 e 10 µg L^{-1}, porém tais dados possivelmente se referem à substância em grau técnico com 99,9% de princípio ativo, sendo que as formulações comerciais apresentam o composto 2-(2-butoxietoxi)-etoxi-4,5-metilenodioxi-2-propiltolueno, conhecido como piperonilbutóxido (PPB). O PPB tem a propriedade de inibir a biotransformação hepática dos piretróides, assim aumentando sua meia-vida no organismo animal (LARINI,1999). Wheelock et al. (2004) alertam quanto à necessidade de testes para piretróides que avaliem a toxicidade potencial para invertebrados aquáticos e peixes na presença de sinergistas. Formulações de praguicidas piretróides contendo sinergistas aumentam significativamente a toxicidade para truta (*Salvelinus frontinalis*), mostrando grande aumento na mortalidade no período de 6 horas de exposição em relação à formulação técnica sem piperonilbutóxido (PAUL et al., 2005).

Diante dos motivos expostos, revela-se a importância da realização de testes de toxicidade com a fórmula comercial do produto quando o objetivo é conhecer de fato o impacto possível no meio ambiente, pois a fórmula comercial e

o produto técnico apresentam grandes diferenças no que se refere à toxicidade aguda.

Na literatura os valores de toxicidade da deltametrina para várias espécies de peixe apresentam grandes diferenças de valores de CL50. Viran et al. (2003) estimam a CL50;48h para *Poecilia reticulata* igual a 5,13 µg L^{-1}. Para larvas e embriões de *Cyprinus carpio* são relatados valores de CL50;48h de 0,213 µg L^{-1} e 0,074 µg L^{-1}, respectivamente, demonstrando os efeitos adversos da deltametrina na reprodução e no crescimento da espécie (KÖPRÜCÜ; AYDM, 2004). Um inseticida contendo deltametrina como princípio ativo (K-Othrin 1UVL), para controle de mosquitos, é apontado como um dos responsáveis pela grande mortalidade de enguias (*Anguilla anguilla*) no Lago Balaton entre 1991 e 1995, além de ter sido encontrado nos tecidos de outras espécies não-alvo como *Abramis brama, Stizostedion lucioperca* e *Larus canus* (BALINT et al., 1997).

Durante os testes, os peixes submetidos às diversas concentrações de praguicidas, já nos instantes iniciais, apresentaram comportamento diferente daqueles do grupo controle, observando-se: aumento da freqüência opercular, nado irregular e presença freqüente na superfície do recipiente-teste, além da formação de muco, o que se sabe, tornaria os peixes sobreviventes vulneráveis a doenças e predadores em seus habitats. Comportamento semelhante é relatado em peixes da espécie *P. reticulata,* submetidos a ensaios com o praguicida beta-cipermetrina (POLAT et al., 2002).

Embora a espécie *D. rerio* seja largamente utilizada em testes de toxicidade por várias vantagens como baixo custo de manutenção, pouco espaço requerido por organismo, curto período de desenvolvimento e reprodução (LELE,1996), é importante que se determine a toxicidade de poluentes potenciais

para espécies autóctones, para comparar os valores obtidos com a espécie padrão. Os valores de CL50;48h obtidos para a espécie *H. bifasciatus* demonstraram ser essa espécie adequada para testes de toxicidade com deltametrina, pelo fato de ser tão sensível quanto *D. rerio*, sendo útil como bioindicador de poluição em ecossistemas aquáticos nacionais.

As toxicidades encontradas para *G. brasiliensis* e *O. niloticus* demonstraram, nesse caso, não haver sensibilidade semelhante ao praguicida para peixes da mesma família, mesmo com a utilização de espécimes de lotes homogêneos e tamanhos semelhantes. A grande diferença de sensibilidade à deltametrina observada entre as quatro espécies utilizadas, era de certa forma esperada, pois as espécies *O. niloticus* e *G brasiliensis* são encontradas em locais com níveis de contaminação que não permitem a sobrevivência da espécie *H. bifasciatus,* a qual apresenta grande sensibilidade a alterações na qualidade da água.

Cumpre salientar a existência de poucos trabalhos na literatura científica sobre toxicidade de praguicidas piretróides em peixes, especialmente deltametrina, portanto faz-se necessário maior número de pesquisas que permitam conhecer a toxicidade dessa relevante substância para diversas espécies, permitindo que se conheça melhor os riscos ecológicos associados à contaminação ambiental por esse praguicida.

Os valores de CL50;48h encontrados nos testes demonstram que a contaminação de ambientes aquáticos por esse praguicida pode causar grande mortalidade de peixes em um curto período de tempo, indicando que devem ser tomados cuidados importantes com sua utilização.

As espécies exóticas *D. rerio* e *H. bifasciatus* mostraram grande sensibilidade à deltametrina, sendo indicadas para testes de toxicidade que tenham como objetivo avaliar o impacto de sua contaminação ambiental, além de demonstrarem os efeitos da contaminação logo após a exposição, com alterações respiratórias e de equilíbrio, mesmo nas doses mais baixas.

Já as espécies *G. brasiliensis* e *O. niloticus* apresentaram valores de CL50;48h maiores que as outras espécies utilizadas, embora esses valores sejam ainda extremamente baixos em relação a outras espécies de peixes encontradas na literatura, que nem sempre revela se o praguicida utilizado está apresentado na forma comercial ou técnica. A espécie *O. niloticus* , além de apresentar a menor sensibilidade ao praguicida, não demonstrou alterações de comportamento nos instantes iniciais dos testes de toxicidade aguda em concentrações inferiores ao CL50;48h, portanto foi considerada menos adequada para testes de toxicidade, sejam agudos ou comportamentais.

Deve-se ressaltar que a CL50 é um valor calculado estatisticamente, a partir de procedimentos protocolares, que representa a melhor estimativa da dose na produção de morte para 50% dos organismos (CHASIN, 2003), mas não indica a dose segura para utilização de determinada substância quando há risco de que esta entre em contato com o organismo e não permite conhecer os efeitos sub-letais como alterações comportamentais, morfológicas e desreguladoras. No entanto, quando não existem dados sobre a toxicidade de um organismo a uma gente químico, pode-se, com os testes de toxicidade aguda, estudar os efeitos e variabilidades de respostas entre diferentes espécies e indicar a toxicidade comparativa (USEPA, 1986).

Deve-se ainda notar que, mesmo numa única espécie, ocorrem diferenças significativas dos resultados, que embora possa ser minimizada com a escolha de lotes de mesmo tamanho e idade, seja relativa à sensibilidade individual de cada organismo no que se refere a fatores como genética e saúde.

Pelo conhecimento da biologia de um grande número de espécies, pela facilidade de serem mantidos em laboratório por ocuparem pouco espaço e pelo tamanho variável entre as diferentes espécies que podem ser escolhidas de acordo com as características dos testes a seres realizados, os peixes são excelentes modelos para análise de comportamento.

A escolha das espécies *D. rerio* e *H. bifasciatus* nos testes realizados neste trabalho para determinar alterações no comportamento, deveu-se as observações realizadas durante os testes de toxicidade aguda já nos primeiros instantes de exposição ao praguicida e nas menores concentrações, o que indica a possibilidade de conhecer efeitos tóxicos antes que ocorra mortalidade para essas espécies e para outras menos sensíveis que demonstrariam tais alterações em doses maiores ou em maiores períodos de exposição. As alterações notadas durante os testes preliminares já indicavam mudanças no comportamento em função de respostas, como alterações na freqüência respiratória, na velocidade de natação, na perda de equilíbrio e nos saltos, que são, sem dúvida, os primeiros sinais de intoxicação (REICHENBACH-KLINKE, 1980).

O comportamento normal de um peixe segue seqüências fisiológicas específicas que são despertadas por estímulos externos pela ação de sua rede neural (Figura 20) e pode ser alterado por estímulos ambientais e fisiológicos resultando severas implicações para sua sobrevivência (SCOTT; SLOMANN, 2004).

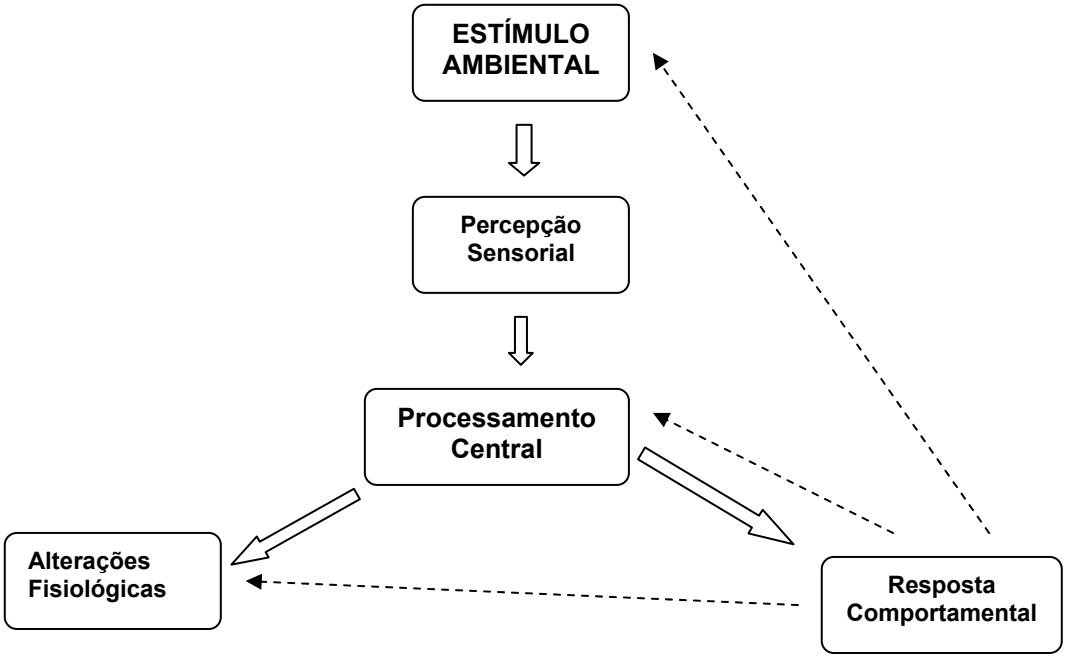


Figura 20 - Após percepção de estímulos ambientais, informações sensoriais são integradas e respostas fisiológicas centrais e periféricas determinam a resposta comportamental ao estímulo. Este estímulo será percebido de modo diferente após cada exposição ao estressor ambiental. (modificado de Scott e Sloman, 2004)

As alterações de comportamento são muito importantes para avaliar as respostas de um organismo a doses sub-letais. Podem, portanto, ser uma ferramenta útil para avaliar a habilidade dos peixes em detectar presença de substâncias químicas na água em concentrações relativamente baixas (LLOYD, 1989). Os resultados obtidos por estes testes fornecem um número significativo de dados sobre alterações fisiológicas, neurais e bioquímicas de um modo não-invasivo.

Mesmo que algumas alterações de comportamento em testes de laboratório sejam passageiras, quando são causadas no meio ambiente, diminuem as chances de sobrevivência do indivíduo e da espécie, pois as respostas a estímulos externos são de grande importância na fuga de predadores, na defesa de territórios e na reprodução (SCOTT,2004).

Não existem ainda testes considerados padrão para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas no comportamento de peixes, mas considerando que exposições a concentrações de magnitudes inferiores àquelas que causam letalidade podem causar alterações significativas às comunidades de peixes, vários pesquisadores têm apresentado modelos de análise de comportamento.

Kane et al. (2004) utilizam vídeos de peixes filmados durante exposição a estressores ambientais para quantificar alterações no comportamento. Fotografias de alterações do nado são utilizadas para determinar alterações causadas pelo herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)cloreto de cádmio em *Cyprinus carpio* (SARIKAYA; YLMAZ, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a composição comercial de praguicida piretróide deltametrina produz uma série de sinais e sintomas tóxicos que puderam ser observados nos diferentes comportamentos analisados.

Nos testes realizados, foi observado aumento significativo do número de subidas à superfície para a espécie H. bifasciatus em concentração de praguicida equivalente a 0,1CL50 nos 10 primeiros minutos de observação, enquanto a espécie *D. rerio* apresentaM esse comportamento no mesmo período na concentração de 10CL50, demonstrando sua menor sensibilidade desta espécie. Este comportamento evidenciou os primeiros sinais de toxicidade e está ligado à dificuldade de obtenção de oxigênio pela diminuição da capacidade respiratória causada pelo praguicida, já que é um comportamento característico de peixes encontrados em corpos aquáticos com baixo índice de oxigênio dissolvido ou contaminados com substâncias tóxicas. As respostas fisiológicas ao estresse causado pelo praguicida envolve a formação de muco nas brânquias, que

também pode conduzir à hipóxia, porque diminui a superfície de contato com a água (PLAYLE; WOOD, 1989).

O aumento da freqüência de subida à superfície nas duas espécies mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da dose de deltametrina indicando uma relação dose-dependente.

A busca de ar superficial pode ser indicativa de neurotoxicidade, pois esta causa prejuízo nas funções vitais do organismo, gerando déficit na captação de oxigênio, mesmo este gás estando em constante concentração no meio.

Segundo Viran et al. (2003), a exposição aguda à deltametrina impediria o influxo eletrolítico nas branquias ou na função renal. A deltametrina pode alterar os mecanismos homeostáticos do cálcio e fosfato e, portanto a efetividade das brânquias em absorver oxigênio.

Quando os receptores branquiais detectam a carência de oxigênio, a primeira opção do peixe é mudar para outro ambiente ou para outra parte da coluna d´água. Caso não exista essa possibilidade, o peixe tende a aumentar a ventilação branquial por meio do aumento da freqüência ou amplitude respiratória.

O aumento da freqüência opercular revela-se em movimentos rápidos e de difícil visualização, por este motivo adotou-se nesse trabalho a observação da amplitude opercular, que consiste na expansão mais evidente das brânquias.

Essa expansão evidencia uma dificuldade respiratória do peixe, que realiza esse movimento na tentativa de aumentar a perfusão de água através das brânquias com o objetivo de aumentar a captação de oxigênio e, também, na tentativa de desobstrução das brânquias do muco formado em resposta à ação do toxicante. Não se conhece, entretanto, se este mecanismo pode garantir que a câmara possa permanecer limpa e deve-se considerar que a hiperventilação

resulta um trabalho adicional para suprir a demanda de O_2 (LICHTENFELS, 1996).

Nos testes realizados com *H. bifasciatus*, notou-se variação significativa nas concentrações 0,1CL50 e CL50, o mesmo ocorrendo em *D. rerio* também ocorreu alteração significativa nesse comportamento em 0,1CL50, demonstrando que as brânquias são muito sensíveis às alterações ambientais pelo fato de serem os primeiros órgãos a entrarem em contato com o meio externo.

Os peixes teleósteos possuem uma bexiga natatória que propicia a sustentabilidade necessária para que atinjam a flutuabilidade neutra e desse modo evitem o gasto de energia que seria necessário para evitar que afundem (SCHIMIDT-NIELSEN, 1999). A dificuldade em manter a flutuabilidade foi definida neste trabalho como perda de equilíbrio, ocorrência observada em *H. bifasciatus* na concentração 0,1CL50, enquanto *D. rerio* somente apresentou essa alteração na concentração DL50. Como já foi citado, o efeito neurotóxico da deltametrina, provocando alteração na troca Na^+/K^+, causa prejuízo de origem nervosa que pode acarretar esse efeito. Kolok (2001) utiliza alterações no nado para avaliar mudanças no comportamento de *Carassius auratus*, porém ressalta que existem dúvidas sobre a susceptibilidade dos mesmos indivíduos a novas exposições.

Um dos parâmetros mais evidentes em nossos experimentos foi a presença de tremores/corridas. Os tremores ocorriam temporalmente muito próximos a amplitude opercular. Ele acontece também em mamíferos e pode estar correlacionado aos estímulos repetitivos nervosos, induzidos pelas ações do piretróide em canais de sódio (NARAHASHI, 1984).

Esse comportamento foi evidente nos peixes submetidos a CL50, todavia em *H. bifasciatus* já podia ser notado na concentração 0,1CL50. Em ambas

espécies , conforme o aumento da dose notou-se a diminuição dos tremores/corridas.A freqüência aumentou até a CL50, sofrendo grande redução nas concentrações maiores, atingindo níveis inferiores ao controle resultando em uma curva bifásica. Essa redução provavelmente foi em decorrência da morte dos peixes.

Em mamíferos, o início dos sintomas de intoxicação ocorre aproximadamente após 30 minutos da ingestão. Envenenamentos graves com os praguicidas à base de piretróides são raros, entretanto injeção ou inalação de grande quantidade desse produto podem causar náuseas, vômitos, diarréias, cefaléias, vertigens, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, tremores, incoordenação motora, fraqueza e paralisia muscular, além de falência respiratória levando ao óbito. Constatamos que as latência dos comportamentos analisados não foram significativas, resultado este que pode ser explicado por uma insuficiência amostral ou por alta variabilidade individual dos peixes.

A espécie *H. bifasciatus*, em comparação à espécie *D. rerio*, demonstrou maior sensibilidade ao praguicida deltametrina no que se refere a alterações no comportamento, já que, em todos os fatores analisados, observoaram sinais significativos de alterações comportamentais na menor concentração testada, ou seja, 0,1CL50, enquanto D. rerio apresentou menor sensibilidade nas subidas à superfície e tremor/corrida.

Em relação à freqüência de movimentação nos quadrantes superiores e inferiores, deve-se considerar que a espécie *D. rerio*, em condições normais, nada por toda a coluna d`água, enquanto *H. bifasciatus* passa a maior parte do tempo em meia água (AXELROD, 1995). Essas características, próprias de cada

espécie, devem ser levadas em consideração quando se pretende determinar alterações em frequências de movimentação.

Ao analisarmos a concentração 0,1DL50 não foram observadas alterações significativas nas duas espécies, permanecendo em igual proporção nos dois quadrantes.

Na dose CL50 predominou a movimentação nos quadrantes superiores para *D. rerio*, entretanto, após a aplicação do teste de Dunnet, não se verificou diferenças significativas. Já na concentração 4CL50, observamos que nos trinta primeiros minutos houve sobretudo permanência dos peixes nos quadrantes superiores, porém o estado de comprometimento neurológico que provocou imobilidade parcial. Após esse período, os organismos permaneceram nos quadrantes inferiores. Na concentração 10CL50, *D. rerio* passa tempo integral nos quadrantes inferiores, mostrando que essa concentração causa toxicidade em período de tempo menor que 10 minutos.

A espécie *H. bifasciatus* apresentou maior sensibilidade ao praguicida também no que se refere às freqüências de movimentação, pois houve alteração, em relação ao controle, na maioria das concentrações durante o período de teste. Os peixes desta espécie apresentaram maior freqüência estatisticamente significativa nos quadrantes superiores já na menor concentração testada, isto é, 0,1CL50 e no menor tempo medido de teste, isto é, 10 minutos quanto ao nado nos quadrantes superiores, pois aparecem diferenças significativas em relação ao controle já nos 10 minutos iniciais. Nos testes utilizando concentrações na ordem de CL50, os peixes apresentaram freqüência inicial nos quadrantes superiores até 30 minutos e posteriormente apresentaram-se mais nos quadrantes inferiore. Nas concentrações 4CL50 e 10 CL50, *H. bifasciatus* apresentou maior freqüência nos

quandrantes inferiores desde os primeiros instantes de teste, demonstrando elevado comprometimento pelo praguicida. Saglio et al. , estudando alterações em *Carassius auratus* pela exposição ao fungicida imidazol utiliza nado horizontal e latência como parâmetros de análise comportamental demonstrando relação dose-dependente entre eles.

A espécie *Geophagus brasiliensis*, utilizada nas análises anatomopatológicas após exposição a doses subagudas de praguicida com deltametrina, é conhecida por sua capacidade de adaptação a ambientes com características físico-químicas diversas no que se refere ao pH, dureza, salinidade e oxigênio dissolvido. São encontrados exemplares desta espécie em ambientes aquáticos com índices de poluição de origem doméstica e industrial elevados, que provavelmente causariam morte à maioria das espécies ali presentes. Pelas características expostas, a espécie *G. brasiliensis* tem grande potencial de utilização em testes que pretendam demonstrar as respostas fisiológicas de um organismo aquático exposto a um estresse ambiental, já que o peixe sobrevive por um período de tempo suficiente para que as alterações morfológicas possam ser observadas, e em concentrações de toxicantes elevadas se comparadas às demais espécies utilizadas em testes de toxicidade, além de ser uma espécie autóctone e encontrada em boa parte do corpos d'água das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

É importante salientar que, em testes realizados com objetivo de conhecer as alterações morfológicas causadas por determinado composto químico, todos os demais parâmetros físico-químicos sejam controlados para que se possam garantir respostas somente em função do composto testado. Os peixes testados neste trabalho foram expostos apenas a soluções contendo deltametrina em

solução comercial, assegurando, deste modo, que os resultados obtidos fossem provenientes do praguicida. Em testes realizados *in loco*, não se pode garantir que a contaminação seja originada por um único composto, ficando demostrado somente o impacto como um todo.

As relações entre o aumento de concentração de agentes químicos e o aumento de alterações morfológicas nas brânquias e no fígado são comumente relatadas na literatura científica. São contaminações com metais pesados (CALZA, 2004), herbicidas trifluralin (POLEKSIC, 1998) e atrazine (NESKOVIC, 1993), dioxinas e praguicidas, sejam por ação direta no organismo ou pela indução de respostas fisiológicas compensatórias.

A avaliação anatomopatológica não especifica por si só o tipo de toxicante presente, entretanto apresenta respostas de estresse em concentrações mais baixas que o CL50 e em períodos menores de tempo, como ficou demonstrado nos resultados obtidos neste trabalho, revelando-se uma preciosa ferramenta em ensaios de laboratório nos quais se conhece a composição da solução-teste e também para avaliação de impacto em ambiente natural, quando se pretende analisar o efeito da contaminação de forma mais complexa em função da gama de compostos presentes e as associações sinérgicas e antagônicas entre estes (LICHTENFELS, 1996).

Foram observadas alterações nos índices hematológicos de *Cyprinus carpio* em exposição à doses subagudas de praguicida a base de deltametrina (SVOBODOVA et al.,2003), porém os efeitos para brânquias e fígado não são apresentados na literatura.

As brânquias, assim como a pele dos peixes, são os órgãos de primeiro contato com o ambiente, mas a pele é praticamente impermeável à água,

tornando as brânquias, em função de sua grande superfície de contato e pequena distância de difusão entre a água e o sangue, os principais sítios de captura e absorção de substâncias dissolvidas (HUGHES, 1966). Uma vez expostas a condições ambientais adversas, é esperado que haja vários tipos celulares em seu epitélio que se adaptem, modifiquem ou especializem de modo mais ou menos pronunciado, apresentando os seguintes aspectos: proliferação celular com fusão das lamelas secundárias; palidez; hemorragias, geralmente de pequena extensão e edema, provocando descamação do epitélio (PAVANELLI et al.,1998). Essas alterações fazem parte de processos crônicos observados em diversas alterações ambientais, como exposição à amônia, sólidos orgânicos e inorgânicos, elevada densidade populacional, baixas concentrações de oxigênio dissolvido e alterações de pH (KLONTZ et al.,1985) e são citadas em diversos diagnósticos de doenças branquiais (REICHENBACH-KLINKE,1976, 1982).

A formação de muco no epitélio branquial é uma resposta freqüentemente observada quando peixes teleósteos são expostos a estresse ambiental, pois o muco exerce uma função protetora, atuando como filtro, coagulando e precipitando partículas em suspensão, diminuindo o traumatismo causado nas lamelas (SHEPARD, 1981), mas por ser uma camada não conectiva sobre a lamela, o muco pode diminuir a difusão de oxigênio, podendo predispor o peixe à hipóxia (ULTSCH ; GROS, 1979).

Quando ocorre estresse ambiental que cause aumento de secreções nas brânquias, os peixes tentam desobstruí-las por um processo de abertura e fechamento abrupto do opérculo em uma amplitude maior que a observada na respiração normal, comportamento observado freqüentemente nos testes de

alteração de comportamento supra citados e tido como parâmetro para avaliação de toxicidade antes da ocorrência de óbito.

A análise anatomopatológica do fígado é comumente empregada na avaliação dos efeitos de toxicantes em organismo aquáticos, pois o fígado é o principal órgão de biotransformação, onde as alterações químicas produzidas, geralmente por processos enzimáticos, têm como objetivo a formação de derivados mais polares e solúveis em água, facilitando sua eliminação renal. Deve-se considerar que nem sempre ocorre redução da atividade tóxica, pois existem vários exemplos de substâncias que devem seus efeitos aos produtos de biotransformação (AZEVEDO, 2004).

As alterações apontadas por este trabalho, com a espécie estudada em todas as concentrações testadas, demonstram a elevada hepatotoxicidade do praguicida, porque mesmo na concentração equivalente a 0,1CL50 os peixes já apresentavam alterações morfológicas significativas, que foram se agravando em função do tempo de exposição e da concentração de deltametrina.

Fanta et al. (2003) demonstra que a concentração de 0,58μL. L^{-1} de praguicida metil-paration (Folidol 600) acarreta vacuolização e necrose no fígado de *Corydora paleatus* no período de 24 horas, demonstrando que doses subletais, apontadas como “seguras” para aplicação agrícola, podem causar sérios danos aos peixes, comprometendo assim sua sobrevivência, o que ressalta a importância da utilização das análises anatomopatológicas na avaliação de efeitos não letais nos peixes.

6 CONCLUSÃO

A toxicidade do praguicida com princípio ativo deltametrina (K-Othrine CE 25®) para as quatro espécies de peixe testadas demonstrou-se elevada. Os valores de CL50;48h encontrados demonstram que a contaminação de ambientes aquáticos por esse praguicida pode causar grande mortalidade de peixes em curto período de tempo, indicando que devem ser tomados cuidados importantes com sua utilização.

As espécies *D. rerio* e *H. bifasciatus* mostraram grande sensibilidade à deltametrina, sendo indicadas para testes de toxicidade aguda que tenham como objetivo avaliar o impacto de contaminação ambiental com o praguicida.

As espécies *G. brasiliensis* e *O. niloticus* apresentaram valores de CL50;48h maiores que as outras espécies utilizadas, embora esses valores sejam ainda extremamente baixos em relação a outras espécies de peixes encontradas na literatura.

Os testes que avaliam alterações no comportamento mostraram-se importantes ferramentas na avaliação da toxicidade em doses agudas e subagudas do praguicida deltametrina, indicando os efeitos da toxicidade já nos primeiros sinais de contaminação.

A espécie *H. bifasciatus* demonstrou maior sensibilidade ao praguicida em relação à espécie *D. rerio* nos testes de comportamento realizados, indicando que mesmo quando os valores de CL50;48h são iguais, existe diferença na sensibilidade de cada espécie para o praguicida testado.

O praguicida causa lesões no fígado já nas 24 horas iniciais de exposição em todas as doses testadas. Essas lesões agravam-se em função do tempo de exposição.

As análises anatomopatológicas das brânquias mostraram que o praguicida provoca alterações morfológicas adaptativas em função das doses e do tempo de exposição.

As análises anatomopatológicas mostraram-se de grande utilidade na avaliação das respostas fisiológicas causadas pela intoxicação pelo praguicida deltametrina em doses subagudas.

Pelos resultados obtidos, a espécie *H. bifasciatus* apresenta grande potencial para ser utilizada em testes de toxicidade como espécie padrão, representante da ictiofauna nacional, pois apresenta características como facilidade de manutenção em laboratório e alta sensibilidade a alterações causadas por toxicantes. Necessita-se, porém, de maiores estudos quanto à reprodução em cativeiro e sensibilidade à substâncias de referência.

REFERÊNCIAS

ABD EL AZIZ M. I.; SAHLAB, A. M.; ABD EL KHALIK, M. I. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive argans and fertility of male rats. **Deutsche-Tierarztliche-Wochenschift,** v. 101, p. 230-232, 1994.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes.** Rio de Janeiro, 1992. **NBR** 12648. 8 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**. Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes- Parte II – sistema semi-estático.** Rio de Janeiro, 1993. **NBR** 12715. 15 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standar methods for the examination of water and wasterwater**. Byrd Pepress Springfield. Washington. 1985. 1134 p.

ARENZON, A. **Biologia e ecologia do peixe annual *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae).** 1996, 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

AXEROLD, H.; BURGESS, W.; EMMENS, C. **Atlas of freshwater aquarium fishes.** Boston: TFH Publications, 1995. 992 p.

AXEROLD, H.; VORDERWINKLER, W. **Enciclopedia of tropical fishes.** Boston: TFH Publications, 1995. 630 p.

AZEVEDO, F.A de.; LIMA, I.V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A de **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa, 2003. p. 27-126.

BAIRD, C. **Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BALINT, T. Similarities and Differences between the Massive Eel (*Anguilla anguilla L.*) devastation that ocurred in Lake Balation in 1991 and 1995. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 37, p. 17-23, 1997.

BERGER, F.M.; BRADLEY, W. The pharmacological properties of alfa and beta dihidroxy-gama (2-methilfenoxy) propane (myanesin) **British Journal of Pharmacology,** v. 1, p. 265-272, 1946.

BASSOI, L. J.; NIETO, R.; TREMAROLI, D. **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 1990. (Séries Manuais). 7p.

BERNARDI, M. M.; FERREIRA, V.; SPINOSA,H.S. **Considerações sobre a toxicologia de praguicidas pietróides.** São Paulo: Cadernos de Veterinária da Uniabc, ano II. v. 31, 2000.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae).** 2000. 118 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BERTOLETTI, E.; GHERALDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P. A. Variabilidade de testes de toxicidade com peixe. **Ambiente**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 52.58, 1989.

BHUNYA, S. P.; PATI, P. C. Effects of deltamethrin on catecholamine secretion of bovine chromatoffin cells. **Toxicology,** v. 5, p. 229-232, 1990.

BICKMEYER, U.; WEINSBERG, F.; WEIGAND, H. Effects of deltamethrin on catecholamine secretion of bovine chromatoffin cells. **Toxicology**. v.68, p. 532-534, 1994.

BLOOM, A. S.; STAATZ, C. G.; DIERINGER, T. Pyrethroid effects on operant responding and feeding. **Neurobehavior Toxicology and Teratology,** v. 5, p. 231-234, 1983.

BOER, S.V.; GUGTEN, J. L. ; SLAGEN, J. L. ; HIJZEN, T. H. Changes in plasma corticosterone and catecholamine contends induced by low doses of deltamethrin in rats. **Toxicology.** v. 46, p .263-270, 1988.
BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: Resolução CONAMA n° 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 jul, 1986.

BROADBURY, J. E.; GRAY, A. J.; FORSHAW, P. Protection against pyrethroid toxicity in ratswith mephenesin. **ToxicologynApllied Pharmacolgy,** v. 60 ,p. 382-384, 1981.

BRODIE, M. E.; OPAKA, J. Dissociation between circlin behavior and estriatal doppami ne activity following unilateral deltamethrin administration to rats. **Naunyn-Shmiedeberg´s Archives Pharmacology,** v. 66, p.124-133, 1985.

BUCCAFUSCO R. J., ELLS, S. J., & CARY, G. A. Acute toxicity of NRDC 161 (Decamethrine) to Channel Catfish *(Ictalurus punctatus)*, In: **Bionomics Aquatic Toxicology Laboratory**, E.G. & G . 1977. 7p

CALZA, C.; ANJOS, M. J.; CASTRO, C. R. F.; BARROSO, R. C.; ARAÚJO, F.G.; LOPES, R.T. Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul river by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 71, p. 787-788, 2004.

CETESB. Água – Avaliação da toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea). São Paulo: CETESB, 1991b. 25p. **Norma Técnica** L5 022.

CETESB. Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). São Paulo: CETESB, 1991a. 28p. (**Norma Técnica** L5 018).

CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.** São Paulo: CETESB, 1992. 74p.

CETESB. **Métodos para avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.** São Paulo: CETESB, 1997. v. 2.

CETESB.1990. **Programa bioenssaios.** Relatório de atividades. São Paulo: 1990. 55 p.

CHANH H. P.; NAVARRO-DELMASURE C. H.; ZIADE F.; SAMAHA F. Pharmacological effects of deltamethrin on the central nervous sistem. **Drug Research.** v. 34, p. 245-263, 1984.

CHAPMAN, P.M. Sediment quality criteria from the Sediment Quality Triad - an example. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 5, p. 957-967, 1989.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa, 2003. p. 127-165.

CRAFT, B. B., VELKEY, A. J., SZALDA-PETREE, A. Instrumental conditioning of choice behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behaviuoral Processes**. v. 63, p. 171-175, 2003.

CREMER, J. E.; SEVILLE, M. P. Comparative effects the two pyrethroids, deltamethrin and cysmethrin on plasma catecholamines and bloods glucose and lactate. **Toxicology Apllied Pharmacology**. v. 66, (s.n.) p. 124-133, 1982.

CROFTON, K. M.; REITER, L. W. Effects of two pyrethroids insecticides on motor activity and acoustic startle response in the rat. **Toxicology Applied Pharmacology**. v. 75, p. 318-327, 1984.

CROFTON, K. M; REITER, L. W. Effects of two pyrethoids insecticides on motor activity and the acoustic startle response in the rat. **Fundaments Applied Toxicology,** v. 10, p. 624- 629, 1988.

CROFTON, K. M; REITER, L. W. Pyrethroid insecticides and the gama-aminobutyric acid receptor complex: motor activity and the acoustic startle response in rat. **Pharmacology Experimental atherapeutics.** v.243, p. 946-954, 1987.

DOHERTY, J. D.; MORII, N. ; HIROMORI, T.; OHNISHI, J. Pyrethroids and the striatal dopaminergic sistem in vivo. **Comparative Biochemistry and Physiology,** v.91,p. 371-375, 1988.

EELS, J.T., RASMUSSEN,P.A., PROPP, J.M. Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. **Toxicology and Apllied Pharmacology**. v. 123. p. 107-119. 1993.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organism.** 3. ed. Washington D.C. : EPA, 1994. EPA 600-4-91-002. 341p.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** 4.ed. Washington, D.C.: EPA, 1991. EPA - 600/4 – 90/027. 293 p.

EPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** 4.ed. Cincinnati, OH : EPA, 1989b. EPA – 600/4-89/001.250p.

EPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Quality Criteria for Water.** Washington DC: EPA, 1986. **EPA** – 440/5-86/001

ERIKSSON P.; FREDRIKSSON, A. Neurotoxic effects of the two different pirethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor and behavioral variables. **Toxicology and Apllied Pharmacology,** v. 108, p. 78-85, 1991.

ERIKSSON, P.; FREDRIKSSON, A. Neonatal exposure to DDT induces increased susceptibility to pyrethroids (biosllethrin) exposure at adult age changes in cholinergic muscarinic recptor and behavioral variables. **Toxicology**, v. 77, n.1-1, p. 21-30, 1993.

ESHLEMAN, A.J., MURRAY. T.F. Dependence on GABA of pyrethroid and 4'choldiazepan modulation of the binding os TBPS in piscine brain. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 641-648, 1990.

ESHLEMAN, A.J., MURRAY. T.F. Pyrethroid insecticides indirectly GABA-dependent 36Cl-influx in synaptoneurossomes from the rout brain. **Neuropharmacology,** v. 30, p. 1333-1341, 1991.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide Information Profiles**. Disponível em: <http://www.ace.orst.edu/info/extoxnet/ghindex.html> Acessado em: 01 set 2004.

FANTA, E.; RIOS, F.S.A; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119-130, 2003.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental.** São Paulo: EPU. 1980.

FORSHAW, P.J.; LISTER,T.; RAY, D.E. Inibition of neuronal voltage-dependent chloride channel by tupe I pyrethroid deltrametrin. **Neuropharmacol**, v. 32, p. 105-111, 1993.

FRANZ, D.N. Central nervous stimulants. In: GOODMAN, A. G.; GILMAR, A. **The pharmacological basic of terapeutics**. New York: Macmillan, 1980. p.585-591.

GALLAGER, D. W.; KEHNE, J. H.; WAKEMAN, E.A.; DAVIS, M. Developmental changes in pharmacological responsivity of the acoustic startle reflex: effects of picrotoxin. **Psichopharmacology**. v. 79, p. 87-93, 1993.

GAMMON, D.W.; BROWN, M.A; CASIDA, J.F. Two classes of pyrethoid action in the cochroach. **Pesticide Biochemistry and Phisiology,** v. 15, p. 181-191, 1981.

GAMMON, D.W.; LAWRENCE, L.J.; CASIDA, J.F. Pyrethoid Toxicology: protective effects of diazepan and phenobarbital in the mouse and cochoach. **Toxicology Apllied Pharmacology**, v. 66, p. 290-296, 1982.

GHERARD-GOLDSTEIN, E.G.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.; ARAÚJO, R.P. ; RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB/PROCOP. Séries Manuais/SMA, 1990. 17 p.

GLOMOT, R., AUDEGOND, L., & COLLAS, E. **Single administration study by oral route in the dog** (Decis Wettable Powder, 2.5%o) (Proprietary report RU 80194/A, submitted to WHO by Roussel Uclaf). 1980.

GOMES, M. S; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. Effects of prenatal pyrethroid insecticides on sexual development of rats. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 33, p. 427-428, 1991b.

GOMES, M. S.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. Pyrethroid insecticides and pregnancy effects on physical and behavioural development of rats. **Veterinary and Human Toxicology**. v.33, p.315-317, 1991a.

GULLEY, D. D.,BOELTER, A. M., BERGMAN, H.L. **TOXTAT 3.3 Computer Program,**1991.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Karber method for stimating median lethal concentrations in toxicity bioassys. **Environmental Science Technologu** 1977. Correction 12(4): 417, 1978.

HARTLEY, G.S.; WEST, T.F. **Chemical for pest control**. Oxford: Pergamon Press, 1969, p. 26.

HIJZEN, T. H.; SLANGEN, J. L. Effects of type I and type II pyrethroids on the startle response in rats. **Toxicology Letters**, v. 40, p. 141-152, 1988.

HUDSON, P. M.; TILSON, H. A.; CHEN, P.H.; HONG, J.S. Neurobehavioral effects of permethrin are associated with alterations in regional levels of biogenic amine metabolites and aminoacids neurotransmitters. **Neurotoxicology**, v.7, p. 143-158, 1986.

HUGHES, G. M. The dimension of fish gills in relation to their function. **Journal of Experimental Biology**, v.45, p. 447-460, 1976.
HUSSAIN, R.; MALAVIYA, M.; SETH, P. K. Effects of deltamethrin on regional brain polyamines ans behaviour in young rats. **Pharmacology Toxicology**, v.74, p. 211-215, 1994.

IBAMA. **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** Ministério do Interior. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Secretaria de Tecnologia e Controle Ambiental. Coordenadoria de Toxicologia Ambiental. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis. Brasília. [s.n.] 1990. 351 p.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Determination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).** Premiére édition, ISO 6341 – Qualité des Eaux. Paris 1982. 9p.

JOY, R. M.; ECOBICHON, I. D. **Pesticides and neurological Diseases,** S.l: Ann Arbr, 1994. 302 p.

KANE, A.S.; SALIERNO, J.D.; GIPSON, G.T.; MOLTENO, T.C.A.; HUNTER, C. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. **Water Research**. v.38, p. 3993-4001, 2004.

KAVLOCh, R., CHERNOFF, N., BARON, R., LINDER, R., ROGERS, E. & CCARVER, B. Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v. 2, p. 751–765, 1999.

KLONTZ, G. W.; STEWART, B.C.; EIB, D. W. On the etiology and pathophysiology of environmental gill disease in juvenile salmonids. In: ELLIS, A. E. **Fish and shellfish pathology**, New York: Academic Press, 1985. p. 199-210.

KNAUF, W.; SCHULZE, E. F. **Effect of decamethrine on *Cyprinus carpio***. Frankfurt: Hoechst AG, 9 pp (Unpublished proprietary report 15/77, submitted to WHO by Roussel Uclaf), 1977.

KÖPRÜCÜ, K.; AYDM, R. The toxic effects of pyrethroid deltemethrin os the common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos and larvae**. Pesticide Biochemistry and Physiology.** v. 80, p. 47-53, 2004.

LARINI L. **Toxicologia dos praguicidas.** São Paulo: Manole, 1999. p. 21-29.

LAWRENCE, L. J.; CASIDA, J, E, Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v. 18,p. 9-14, 1982.

LE CREN, E. D. The length-weight relatioship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the pewrch *Perca fluvialitis*. **Journal Animal Ecologu,** v. 20, n.2, p 201-219, 1951.

LELE, Z; KRONE, P.H. The zebrafish as a model in developmental toxicological and trangenic research. **Biotechnology advances.** v. 14, p. 57-72, 1996.

L'HOTELLIER, M.; VINCENT, P**.** Assessment of the impact of deltamethrin on aquatic species. In: **British Crop Protection Conference - Pests and Disease**. p. 1109-1116, 1986.

LICHTENFELS, A. J. F. C. **Efeitos da poluição aquática sobre a estrutura branquial.** 1996. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LOCK, E. A; BERRY, P. M. Biochemical changes in the rat cerebellun following cypermethrin administration. **Toxicology Applied Pharmacology**. v.59, p. 508-514, 1981.

LLOYD, R. **Pollution and freshwater fish.** Oxford: Buckland Founddation Book, 1989. 176 p.

MAITY, N. K.; PUNIA, J. S. Effects of fluvanilate, a syntetic pyrethroid on learning and memory traces in rats. **Indian Journal Experimental Biology**. v.2, p.178-179, 1991.

MALAVIYA, M.; HUSAIN, R.; STETH, P.K. HUSAIN, R. Perinatal effects of two pyrethroid insecticides on brain neurotransmittre function in the neonatal rat. **Veterinarian and Human Toxicology**. v. 35, n.2, p. 119-122, 1993.
MITCHELL, J. A.; WILSON, M.C.; KALLMAN, M. J. Bevioral effects of Pydrin and Ambush in male mice. **Neurotoxicology Teratology**. v.10, p. 113-129, 1988.

MIYAMOTO, I.; KANEKO, H.; TSUJI; OKUNO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. **Toxicology Leters**, v. 82/83, p.933-940, 1995.

MLYNARCIKOVÁ, H.; LEGÁTH, J.; SOKOL, J. Chronic influence of pyrethroid supermethrin on some reproductive features in japanese quail (140 days long avian reproduction test). **European Journal Public Hearth**. v. 3, n. 3, p.132-143, 1995.

MONIZ, A. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Effects of pyrethoid type II pesticide on conditioned behaviors of rats. **Biotemas,** v. 46, n. 2, p. 120-124, 1994.

MONIZ, A. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S; PALERMO-NETO, J. Effects of exposure to a pyrethroid insecticide during lactation on the behavior of infant

and adult rats. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 23, p. 120-124, 1994.

MOREIRA, J. S. **Elementos de estatística.** 9 ed. São Paulo : Ed. Atlas, 1972. 170 p.

NARAHASHI, T. **Cellular and molecular neurotoxicology.** New York: Raven Press, 1984, p. 85-108.

NARAHASHI, T.; CARTER, D. B.; FREY, J.; GINSBURG, K.; HAMILTON, B. J.; NAGATA, K.; ROY. M. L.; SONG, J. H.; TATEBAYASHI,H. Sodium channels and GABA receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. **Toxicology Letters.** v. 82-83, p. 239-245, 1996.

NESKOVIC, N. K.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; POLESKSIC, V.; BUDIMIR, M. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 25, p. 173-182, 1993.

NORBERG, T. J.; MOUNT, D. I. A new feathed minnow (*Pimephales promelas)* subcronic toxicity test. **EnvironmetalToxicology Chemistry,** v. 4, p. 711-718, 1985

OSTI, S. C. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do efluente de diuranato de amônio proveniente do ciclo de reconversão de urânio do IPEN/CNEN-SP.** 2001. 126 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PARRISH, P.R. Acute toxicity tests**.** In: RAND, G. M., PETROCELLI, S. R. (Ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology.** Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 31 -57.

PAUL, E. A.; SIMONIN H. A.; TOMAJER, T. M. A comparison of the toxicity of synergized and technical formulations of permethrin, sumithrin and resmethrin to trout. **Arch Environ Contam Toxicol**, New York, 48 (2), p. 251-259, 2005.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes:** profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: EDUEM: Nupélia, 1998. 264 p.

PEELE, P. B.; CROFTON, K.M. Pyrethroids effects shedule-controlled behavior: time and dosage relationships. **Neurotoxicology and teratology**, v.9, p.387-394, 1987.

PLAYLE, R. C.; WOOD, C. M. Water chemistry changes in the gill micro-environmental of rainbow trout – experimental observations and theory. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology,** v. 159, p. 527-537, 1989.

POLAT, H., ERKOC, F.U.; KOCAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere.** v. 49, n. 1, p. 39-44, 2002.

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifularin on carp: biochemical and histological evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 43, p. 213 - 221, 1998.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology.** Princenton: Hemisphere Publishing Corporation, 1995. 666 p.

RAO, G. V.; RAO, K. S. Modutation in acetylcholinesterase of rat brain by pyrethroids in vivo and an in vitro kinetic study. **Journal Neurochemistry**. v. 65, n. 5, p. 2259-2266, 1995.

RAY, D. E.;CREMER, J. E. The action of decamethrin (a syntetic pyrethoid) on de rat. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v.10, p. 333-340, 1979.

RAY, D. E. An EEG investigation of decamethrin induced choreoathetosis in the rat. **Experimental Brain Research**. v. 38, p. 221-227, 1980.

RAY, D. E. Changes in brain bloodflow associated with deltamethrin – induced choreoathetosis in the rat. **Experimental Brain Research**. v. 45, p.269-276, 1982.

REICHENBACH-KLINKE, H. H. **Claves para el diagnostico de las enfermedades de los peces.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1976. 89 p.

REICHENBACH-KLINKE, H. H.; AHNE, W.; NEGELE, B.; OLLENSCHLAGER, W. P.; SPIESER, O. H.; WOLF, K. **Enfermedades de los peces.** Zaragoza: Ed. Acribia. 1982. 507p.

ROSE, G. P.; DEWAR, A. J. Intoxication with four synthetic pyrethroids fails to show any correlation between neuromuscular dysfunction and neurobiochemical abnormalites in rat. **Archives Toxicology**. v. 53, p. 297-316, 1983.

ROSENTHAL, J. E. Cooling drugs and coolings centrees. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v. 7, p. 305-314, 1941.

RUE, W. J.; FAVA, J. A.; GROTHE, D. R. A review of inter and intralaboratory effluent toxicity test method variability. In: ADAMS, W, J.; CHAPMAN, G. A. e LANDS, W. G. (Ed.) A**quatic toxicology and Hazard Assesment: 10 vol. STP 971.** Philadelphia: ASTM. 1988. p. 190-203.

SANTOS, E. P. **Dinâmica de populações aplicada à pesca e psicultura**. São Paulo: HUCITEC-EDUSP, 1981. 129 p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA-3, de 22/02/2000. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 25 fev. 2000. p.24

SARIKAYA, R., YLMAZ, M. Investigation of acute toxicidade and the effect of 2,4D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio L.*), 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere**.v. 52, p. 195-201, 2003.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal:** adaptação e meio ambiente. São Paulo: Santos Livraria Editora, 1999. 600 p.

SCOTT, J. G.; MATSUMURA, F. Evidence for two types of toxic action of pyrethroids on susceptible and DDt- resistent German cockroaches. **Pesticides Biochemistry and Physiology.** v.19, p. 141-150, 1983.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integratins bahavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**. v. 68, p. 369-392, 2004.

SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - USA. **Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts**. Ed. GROTHE, D. R. et al. SETAC, 1993. 346p.

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of ions across the esophagus of fish. **Physiological Zoology**. v. 55, p. 23-34, 1981.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 17, p. 3-59, 2002.

STAATZ, C. G.; BLOOM, A. S.; LECH, J. J. A pharmacological study of pyrethroid neurotoxicity in mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v. 17, p. 287-292, 1982.

STEIN, E. A.; WASHBURN, M.; WALCZAK, C.; BLOOM, A. S. Effects of pyrethroids insectides on operant responding maintained by food. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 9, p. 27-31, 1987.

STEVENSON, J. H., NEEDHAM, P. H., & WALKER, J. Poisoning of honey bee by pesticides: investigations of the changing pattern in Britain over 20 years. **Rothamsted Exp. Stn Rep**., Part 2**: 55**-72p. 1978.

SURRALLÈS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPPA, H.; MARCOS, R. Introduction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**. v. 341, p. 169-184, 1995.

SVOBODOVA, Z.; LUSKOVA, V.; DRASTICHOVA, J.; SVOBODA, M.; ZLABEK, V. Effects of deltramethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Vet. Brno**. v. 72, p.79-85, 2003.

TATUM, A .L. Picrotoxin hiperglycemia. **Journal Pharmacology**. v. 20, p. 285-392, 1922.

TILSON, H. A.; HONG, J.S.; MACTUTUS, C.F. Effects of 5,5-dephenylhydantoin (Dilantin) on neurobehavioral toxicity of organochorine insecticides and permethrin. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**. v. 233, p. 285-289, 1985.

TSUJI, R.; ISOBE, N.; KAWASAKI, H. Effects of pyrethroids on pentobarbital-induced sleeping time in relatin to the chemical structure. **Toxicology**. v. 106, n. 1-3, p.131-137, 1996.

ULTSCH, G. R.; GROS, G. Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in O_2 uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio)* gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 62, p. 685-689, 1979.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Guidelines for the health: risk assessment of chemical mixtures of 1986. 1986. Disponível em: <http://www.epa.gov./ncea/cfm/records>.Acesso em 15 nov.2004.

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

VIJVERBERG, H. P. M; VAN DERBERKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode the action of pyrethroid insecticide. **Toxicology**, v. 21, p.105-125, 1990.

VIRAN, R.; ERKOÇ, F. U.; POLAT, H.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata)*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 55, p. 82-85, 2003.

WHEELOCK, C. E.; MILLER J. L.; MILLER, M. J.; GEE, S. L.; SHAN, G.; HAMMOCK, B. D. Development of toxicity identification evaluation produceres for pyrethroid detection using esterase activity. **Environmental Toxicology Chemistry,** Califórnia, 23 (11), p. 2699-2708, 2004.

WHITE, J. M.; RUMBOLD, G. R. Behavioural effects of histamine and its anatagonists: a review. **Psycopharmacology,** v. 95, p 1-14, 1988.

YILMAZ, M.; GÜL, A.; KARAKÖSE, E. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($CdCl_2$. H_2O) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). **Chemosphere,** v. 56, p. 375-380, 2004.

ZAGATTO, P. A.; GHERARD-GOLDSTEIN, E. Toxicidade das águas do estado de São Paulo. **Ambiente**. v. 5 (1) : 13-20 p, 1991.

ZAGATTO, P. A.; GHERARD-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E. ; LOMBARDI, C .C.; MARTINS, MHRB E RAMOS, M.L.C.C. Bioassays with aquatic organisms: toxicity of water and sediment from Cubatão river basin. **Water Science Technology,** v. 19 (11), p. 95-106, 1987.

ZAGATTO, P. A.; LORENZETTI, M. L.; LAMPARELLI,M. C. ; MENEGON J. R. E BERTOLETTI, E. Aperfeiçoamento de um índice de qualidade de águas. **Acta Limnology,** v. 11 (2), p. 111-126, 1999.

ZITKO, V., MCLEESE, D. W., METCALFE, C. D. ; CARSON, W. G. Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. **Bull. Environmental Contaminant Toxicology,** v. 21, p. 338-343, 1979.