



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS
TRÓPICOS

Respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma
macropomum*) de cativeiro exposto à concentrações subletais
de paration-metílico

RENATA SYALLEN DE SOUSA VEIGA

MANAUS
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS
TRÓPICOS

RENATA SYALLEN DE SOUSA VEIGA

Respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma
macropomum*) de cativeiro exposto à concentrações subletais
de paration-metílica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas; como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras; Área de concentração em Ecologia de Recursos Pesqueiros e Ambientes.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue
Co-Orientador (a): Prof^a Dra. Andrea Viviana Waichman

MANAUS
2012

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V426r Veiga, Renata Syallen de Sousa
Respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*)
de cativeiro exposto à concentrações subletais de paration-metílica
/ Renata Syallen de Sousa Veiga. 2012
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue
Coorientadora: Dra. Andrea Viviana Waichman
Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Organofosforado. 2. *Colossoma macropomum*. 3.
Ecotoxicidade. 4. glutatona S-transferase. 5. Concentração Letal
(CL50%). I. Inoue, Dr. Luís Antônio Kioshi Aoki II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

RENATA SYALLEN DE SOUSA VEIGA

Respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) de cativeiro exposto à concentrações subletais de paration-metílica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas; como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras; Área de concentração em Ecologia de Recursos Pesqueiros e Ambientes.

Aprovada em: 04 de maio de 2012.

Banca examinadora:


Dra. Andrea Viviana Waichmam (Presidente – UFAM)


Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto (Membro – UERJ)


Dra. Cheila de Lima Boijink (Membro – EMBRAPA)

*“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando;
a certeza de que precisamos continuar;
a certeza de sermos interrompidos antes de terminar.*

*Portanto, devemos:
fazer da interrupção um novo caminho;
da queda, um passo de dança;
do medo, uma escada;
do sonho, uma ponte;
da procura, um encontro.”*

Fernando Pessoa

*Aos meus pais, Antonio e Nazaré, pelo amor incondicional, dedicação,
incentivo e pelos valores que norteiam
a minha vida por todos esses anos.*

*Aos meus irmãos Roberta, Renato, Rarissa e Lili
pelo amor, carinho, paciência e compreensão.*

*Ao Paulo Ricardo
que viveu este momento e tantos outros, ao meu lado, me
motivando sempre com sua paciência.*

*Com amor,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai todo poderoso, por guiar meus passos, pela inspiração, força e fé, por tudo que tem me proporcionado e pela oportunidade de concluir mais esta etapa.

A minha maravilhosa família, especialmente aos meus pais Antonio Ayres Veiga e Maria de Nazaré de Sousa Veiga, minha fonte de inspiração, motivação e formação, por seu amor, pelo respeito, por acreditar nos meus sonhos e por serem meu porto seguro. Aos meus irmãos, Renato, Roberta, Rarissa e Ilaine, pela paciência e pela colaboração. Aos meus primos-irmãos Nilma, Raimunda, Nazaré, Kaity, Jamerson e Lucas pelos momentos de descontração. Ao meu tio Ocian Ayres, pela compreensão na ausência da rotina cartorária em dois anos de mestrado. Aos primos, Fernando, Waldir, Samara, Tuanny, Eline e Eliedna, por terem suprido essa ausência cartorária, pelo carinho e respeito.

Ao meu Orientador, Dr. Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue, pela oportunidade, confiança, ensinamentos transmitidos, pela dedicada orientação, paciência e correções, por nunca ter hesitado em me ajudar no que fosse preciso, muito obrigada pela sua amizade.

A minha Co-Orientadora, Dr.^a Andrea Viviana Waichman, pela oportunidade de estágio de docência, por ter aceitado meu convite, pois por oito anos você tem sido meu referencial na área da pesquisa científica, muito obrigada pela sua amizade.

Ao Dr. Thierry Gasnier, pelo empréstimo de um pequeno espaço valioso no Laboratório de Ecologia.

Agradeço ao Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto e a Prof. Dr.^a Vera Lucia Freire da Cunha Bastos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela oportunidade de desenvolver parte das minhas análises.

Ao Paulo Ricardo Isolino Sampaio, pela paciência, companheirismo, pelo carinho, cooperação e o suporte emocional nos momentos mais críticos. Obrigada por estar ao meu lado nesse momento da minha vida, me apoiando e incentivando no meu crescimento científico e profissional.

Aos inesquecíveis amigos da pós: Maria, Rafael, Alfredo, Daniel, Ronã, Heitor, Socorro, Herlon, Fabíola, Flávia, Simon, Charles e Joel.

A minha eterna amiga Paola Campos, pela ajuda, companheirismo, amizade e dedicação nas análises cromatográficas. Muito obrigada pela sua ajuda.

Ao meu amigo Iomar Azevedo e a família da Agroindustrial Tambaqui Ltda, que na fase final, foram grandes parceiros.

A todos os colegas do Aqualab: Willian, Edvânia, Rafael, Patrícia, Bruna, Dayse, Franmir Brandão, Christiane, seu José “Cubiu” e em especial a Irani, por todos seus socorros nos experimentos e análises laboratoriais, sua ajuda foi fundamental e sua amizade um presente. Agradeço a Dr.^a Cheila Boujink, a Dr.^a Edsandra Chagas e a Dr.^a Fernanda Almeida pelo auxílio prestado na coleta do material biológico. Não esquecendo o Dr. Francisco Célio, pelos socorros prestados no Laboratório Úmido durante os fins de semana.

A todos os colegas do Laboratório de Limnologia: Rita Mileni, Zeina Oliveira, Diogo, André, Paulo Amaral, Paulo Roberto, Rosária Carmo, Carlos e a Prof^a Dr.^a Maria Anete Leite Rubim também pelo empréstimo de um pequeno espaço valioso no Laboratório de Limnologia.

A todos os colegas do Laboratório de Combustíveis (LAPEC), pela ajuda nas análises de cromatografia, em especial ao Dr. Jamal Chaar por disponibilizar o laboratório para as minhas análises. Ao Daniel pelas orientações técnicas e a Bianca pelos socorros constantes.

A Universidade Federal do Amazonas, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras, que contribuiu para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

A Embrapa-Amazônia Ocidental pelo espaço cedido para a realização dos experimentos.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O tambaqui é a principal espécie de peixe cultivado na Amazônia Ocidental. Contudo vários produtos químicos tais como herbicidas, algicidas, larvicidas, fungicidas e drogas veterinárias têm sido intencionalmente introduzidas nos ambientes hídricos. Dentre os agrotóxicos comumente utilizados na piscicultura local para o controle de ectoparasitos e insetos aquáticos, destacam-se a paration-metílica (Mentox® 600 CE). O presente estudo foi verificado se o tambaqui (*Colossoma macropomum*) quando exposto a condições subletais do organofosforado paration-metílico (MP) sofre alterações metabólicas. Dentro desse intuito, testes toxicológicos foram realizados para a determinação da concentração letal (CL_{50%}). A toxicidade da paration-metílica apresentou-se menor que 2 mg/L (CL_{50-96h} de 1,456 mg/L e 2,317 mg/L). Portanto, após a determinação da concentração letal, exemplares de tambaqui juvenis, foram separados em grupos de 10 animais em caixas de 390 L: um grupo controle mantido sem a presença do organofosforado e outros quatro grupos foram expostos a 0; 0,5; 0,70; 0,98; 1,37 e 1,92 da paration-metílica/L de água durante 96 horas. Todos os grupos tiveram sua alimentação suspensa 24 horas antes do início do experimento. Foram analisados os seguintes parâmetros: conteúdo de hemoglobina, hematócrito, eritrócito, VCM, HCM, CHCM, concentrações plasmáticas de glicose, amônia, sódio, cloreto e potássio, além da atividade hepática da enzima glutatona-S-transferase (GST). Os indivíduos expostos a estas condições apresentaram diminuição na atividade natatória e errática, foram observadas produção excessiva de muco e expansão do lábio inferior. Os resultados do efeito da exposição a concentrações abaixo de 2 mg/L da formulação comercial do paration-metílico (Mentox® 600 CE) permitiram estabelecer que as alterações dos parâmetros hematológicos ocorreram a partir do primeiro tratamento em relação ao grupo controle, porém não o suficiente para mitigar as respostas de estresse, pois não houve diferença significativa nas variáveis sanguíneas e nem nos índices hematimétricos. Respostas típicas ao estresse não foram detectadas devido ao manuseio imposto aos peixes durante a realização da exposição do *Colossoma macropomum* as concentrações subletais de paration-metílico, elucidados através das alterações das concentrações plasmáticas de glicose, amônia e íons (Na⁺, Cl⁻, K⁺), porém a exposição a paration-metílico causou aumento da atividade de glutatona S-transferase (GST) a partir do tratamento 0.70 mg/L.

Palavras-chave: Organofosforado, *Colossoma macropomum*, Ecotoxicidade, glutatona S-transferase, Concentração Letal (CL_{50%}), Estresse.

ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is to main fish species cultivated in the Amazonia Western. However several such chemical products as herbicides, algicides, larvicides, fungicides and veterinary drugs have been introduced intentionally in the hydric atmospheres. Among the pesticides commonly used in the local pisciculture for the control of ectoparasites and aquatic insects, they stand out the parathion methyl (Mentox® 600 CE). The present study was verified if the tambaqui (*Colossoma macropomum*) when exposed to conditions sublethal of the organophosphates parathion methyl (PM) UNDERGOES metabolic alterations. Inside of that intention, toxicological tests were accomplished for the determination of the lethal concentration ($CL_{50\%}$). the toxicity of the parathion methyl represented lesser than 2 mg/L (CL_{50-96h} of 1,456 mg/L and 2,317 mg/L). Therefore, after the determination of the lethal concentration, specimens of juveniles tambaqui, were separate in groups of 10 animals in boxes of 390 L: a group control maintained without the presence of the organophosphates and other four groups were exposed to 0; 0,5; 0,70; 0,98; 1,37 and 1,92 of parathion methyl/L of water for 96 hours. All the groups had your feeding suspended 24 hours before initiate the experiment. The following parameters were analyzed: hemoglobin content, hematocrit, erythrocyte, VCM, HCM, CHCM, concentrations glucose plasmatic, ammonia, sodium, chloride and potassium, above the hepatic activity of the enzyme glutathione-S-transferase (GST). The exposed individuals the these conditions presented decrease in the natatorial and erratic activity, excessive production of mucus and expansion of the inferior lip were observed. The results of the effect of the exhibition to concentrations below 2 mg/L of the commercial formulation of MP (Mentox® 600 CE) they allowed to establish that the alterations of the parameters hematologic happened starting from the first treatment in relation to the group it controls, yet they put not enough to mitigate the stress answers, because there was no significant difference in the sanguine variables and nor in the indexes hematimetrics. Typical answers to the stress were not detected due to the handling imposed the fish during the accomplishment of the exhibition of the *Colossoma macropomum* them sublethals concentrations of the parathion methyl, elucidated through the alterations of the concentrations glucose plasmatic, ammonia and ions (Na^+ , Cl^- , K^+), they put the exhibition to the parathion methyl it caused increase of the glutathione activity S-transferase (GST) starting from the treatment 0.70 mg/L.

Keywords: organophosphorus, *Colossoma macropomum*, ecotoxicity, glutathione S-transferase, lethal concentration ($LC_{50\%}$), stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (TOMITA & BEYRUTH, 2002).....	21
Figura 2 Fórmula Estrutural da Paration-metílica e Paraoxon- metílica. Fonte: ANVISA, 2003.	25
Figura 3 Esquema ilustrativo dos efeitos primários, secundários e terciários de estressores ambientais em peixe, segundo (BARTON <i>et al.</i> , 2002).	28
Figura 4 Etapas da biotransformação..	30
Figura 5 Exemplar juvenil de <i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui).....	32
Figura 6 Estação de Piscicultura da Embrapa – Campo Experimental (A) e (B).....	35
Figura 7 Biometria (A) e (B).....	36
Figura 8 Reservatórios de 390L para aclimação dos animais e execução do experimento (A) e (B).	36
Figura 9 Amostra sob agitação (A); Cromatógrafo a gás CG 3800 da Varian com captura e detector de elétrons (ECD) e a fibra PDMS (Polydimethylsiloxano, 100µm) acoplada no Autosampler (8400) (B).....	38
Figura 10 Cromatogramas dos padrões de 1µg/m, 0,5 µg/m, 0,1 µg/m, 0,05 µg/m e 0,01 µg/m de parationa-metílica.	39
Figura 11 Curva analítica obtida para o parationa-metílica.	39
Figure 12 (A) e (B) Determinação do hematócrito (Hct).	41
Figura 13 Determinação da concentração de hemoglobina.	42
Figura 14 Sacrifício por secção medular (A) e Coleta do fígado (B).	44
Figura 15 Esquema do preparo da fração solúvel.....	44
Figura 16 Curva da concentração-resposta obtidas a partir do testes de toxicidade efetuados com o parationa-metílica para o tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>), por meio de análise do Probit, após 96 horas.	47
Figura 17 Curva da concentração-resposta obtidas a partir dos testes de toxicidade efetuados com o parationa-metílica para o tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>), por meio de análise do Probit, após 96 horas.	49
Figure 18 Quantificação do parationa-metílica nos extratos das amostras de água.....	54
Figura 19 (A) Concentração de Hemoglobina ([Hb]); (B) Hematócrito (Ht); (C) Número de Eritrócitos (RBC) no sangue de exemplares de <i>Colossoma macropomum</i> (n=3 cada grupo) do grupo controle e expostos a concentrações subletais de parationa-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.....	57

Figura 20 (A) Volume Corpuscular Médio (VCM); (B) Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); (C) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de parationa-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.58

Figura 21 (A) Potássio [K⁺]; (B) Sódio [Na⁺]; (C) Cloreto [Cl⁻] plasmático no sangue de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de parationa-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.62

Figura 22 (A) Níveis de Glicose e (B) Níveis de Amônia no plasma de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de parationa-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.64

Figura 23 Atividade geral das GST (Glutathione S-Transferase) com cloro-dinitrobenzeno (CDNB) no fígados de tambaqui *Colossoma macropomum*, expostos a concentrações subletais de parationa-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados da análise Probit do experimento 1: concentrações eficazes do ensaio e os intervalos de confiança 95% e 99%.	47
Tabela 2 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 1 na determinação da CL_{50-96} horas do parationa-metilica.	48
Tabela 3 Resultados da análise Probit do experimento 1: concentrações eficazes do ensaio e os intervalos de confiança 95% e 99%.	50
Tabela 4 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 2 na determinação da CL_{50-96} horas do parationa-metilica.	50
Tabela 5 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 3 em que o parationa-metilica foi exposto em concentrações subletais.	51
Tabela 7 Valores médios e desvio padrão das variáveis hematológicas de <i>Colossoma macropomum</i> (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de parationa-metilica durante 96 horas.....	56
Tabela 8 Valores médios e desvio padrão dos parâmetros iônicos do plasma do sangue de <i>Colossoma macropomum</i> (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de parationa-metilica durante 96 horas.	61
Tabela 9 Valores médios e desvio padrão das concentrações de glicose e amônia plasmáticas de <i>Colossoma macropomum</i> (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de parationa-metilica durante 96 horas.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl ⁻	Íons de Cloreto
CL _{50-96hs}	Concentração Média Letal em 96 horas
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetros Quadrados
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ECD	Captura e Detector de Elétrons
EDTA	Ethylenodiaminotetracetic acid
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
G	Gramas
g/dL	Gramas por decilitros
g/L	Gramas por litro
GST	Glutathione S-Transferase
Hb	Hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
Hct	Hematócrito
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
K ⁺	Íons de Potássio
Kg	Kilograma
Kgf	Quilograma-força
LAPEC	Laboratório de Pesquisas e Ensaios de Combustíveis
LD ₅₀	Dose Letal que Causa a Mortalidade de 50% Dos Organismos

m ²	Metros Quadrados
mEq	Miliequivalentes
mg/dL	Miligramas por Decilitros
mg/kg	Miligrama por Kilograma
mg/L	Miligramas por litro
Min	Minutos
mM	Milimolar
Na ⁺	Íons de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
Nm	Nanômetros
OECD	Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
RBC	Red Blood Cells (Numero de Células Vermelhas)
RPM	Rotações por minuto
SPME	Micro-Extração em Fase Sólida
TCA	Tricloro Acético
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
VCM	Volume Corpuscular Médio
x10 ⁶ /mm ³	Milhões De Células Por Milímetro Cúbico
µm	Micrometro
µL	Microlitros
µmol	Micromol

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. CONTEXTUALIZAÇÃO	19
2.1. Importância do tema.....	19
2.2. Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos	21
2.3. Importância da aplicação dos testes de toxicidade	23
2.4. Efeitos agudos e sub agudos do paration-metílica em peixes.....	24
2.5. Respostas ao estresse utilizando o tambaqui como biomarcador.....	26
2.6. A Espécie <i>Colossoma macropomum</i>	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo Geral.....	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Testes preliminares de toxicidade aguda (CL ₅₀ ; 96h) do parationa-metílica..	35
4.1.1. Condições cromatográficas.....	37
4.2. Experimento para avaliar as respostas metabólicas do tambaqui em condições subletais de paration-metilica.....	40
4.2.1. Coleta de sangue	40
4.2.2. Parâmetros Hematológicos	41
4.2.2.1. Hematocrito (Hct)	41
4.2.2.2. Concentração de hemoglobina ([Hb]).....	41
4.2.2.3. Contagem do numero de eritrócitos (RBC)	42
4.2.2.4. Determinação das constantes corpusculares.....	42
4.2.3. Parâmetros Iônicos.....	43
4.2.3.1. Concentração de Na ⁺ , Cl ⁻ e K ⁺	43
4.2.4. Avaliação de Estresse	43
4.2.4.1. Glicose	43
4.2.4.2. Amônia	43

4.2.5.	Atividade de glutathiona S-transferase (GST)	43
4.2.5.1.	Preparação da fração citosol (solúvel)	43
4.2.5.2.	Determinação de proteínas	45
4.2.5.3.	Determinação das atividades de GST	45
4.3.	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Concentração letal aguda (CL _{50;96h}) do parationa-metílica.....	46
5.2.	Considerações analíticas para quantificação de paration-metilica.....	53
5.3.	Efeitos das concentrações subletais do parationa-metílico sobre o metabolismo do Colossoma macropomum	55
5.3.1.	Parâmetros hematológicos	55
5.3.2.	Parâmetros iônicos.....	60
5.3.3.	Avaliação de Estresse	63
5.3.4.	Avaliação da enzima glutathiona-S-transferase (GST).....	65
6.	CONSIDERACOES FINAIS	68
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui é a principal espécie de peixe cultivado na Amazônia Ocidental, devido a sua importância regional e demanda crescente nos mercados nortistas do Brasil. É uma espécie onívora relativamente bem adaptada às condições de cativeiro, aceitando rações artificiais e completas com índices desejáveis de crescimento e conversão alimentar. Ainda alcança preços atrativos nos exigentes mercados das grandes cidades amazônicas como Manaus, principal pólo consumidor dessa espécie (ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005).

O aumento da atividade aquícola tem despertado a atenção da comunidade científica e de órgãos de gestão quanto aos riscos relacionados a esta atividade (BOYD & MASSAUT, 1999). Esses riscos incluem os danos ambientais e a saúde dos consumidores (WINKALER, 2008). Observa-se crescente interesse por parte dos produtores no que diz respeito à busca de soluções para evitar os prejuízos causados por mortalidade e problemas na produção. Entre os aspectos importantes para a otimização da atividade estão aqueles que afetam o desempenho e a resistência dos animais às doenças, e para os quais se têm voltado os esforços científicos na busca de soluções (BARTON & IWAMA, 1991).

No regime de confinamento, os peixes ficam submetidos a um ambiente diferente do seu habitat natural e, dessa forma, expostos a fatores bióticos e abióticos adversos, tais como: manuseio, alimento artificial, altas densidades de estocagem, entre outros. Sabe-se que a aquisição de qualquer adaptação a uma nova situação experimentada por um organismo envolve modificações de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em resposta ao estímulo, o qual é considerado estresse (SANTOS, 2007). Sabe-se da relação entre o estresse e a sua ação imunossupressora, tanto em mamíferos, quanto em vertebrados inferiores (WEYTS *et al.*, 1998). Isso é frequentemente associado à diminuição da resistência dos peixes aos oportunistas patogênicos resultando em doenças e mortalidades (ANDERSON, 1990).

Diante dos possíveis casos de enfermidades, é comum o uso de algumas formas de tratamento que utilizam medicamentos de uso agrícola ou veterinário. Sabe-se que no Brasil não existe uma legislação regulamentadora para registro destes produtos na aquíicultura. Diante da ameaça à produtividade empregam-se muitas vezes quimioterápicos não registrados e sem especificações técnicas do fabricante para uso nos setores aquícolas (MAXIMIANO *et al.*, 2005).

Os organofosforados são largamente utilizados devido à propriedade de se degradarem rapidamente no ambiente depois de aplicados. Entretanto, esses compostos são rapidamente biotransformados *in vivo* por isoformas de citocromo P-450 (CYP) para a sua forma ativa de organofosfato, ou forma oxon, a qual é capaz de produzir efeitos danosos nos organismos vivos e não alvos (CASARETT & DOULL, 2008).

O uso de produtos químicos em tanques de cultivo como inseticidas e bactericidas podem ter ação cumulativa e representar risco à segurança alimentar (BOYD & MASSAUT, 1999). A aplicação destes inseticidas pode resultar em altos níveis de resíduos nos peixes, inclusive no momento do consumo, pois normalmente os períodos de carência não são respeitados pelos piscicultores, geralmente aplicados sem orientação técnica adequada e indiscriminadamente (MATAQUEIRO, 2002; RODRIGUES *et al.*, 1997).

O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas fontes. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Nesse caso, além da diminuição da produção de peixes e aumento de doenças, pode haver bioacumulação do produto com conseqüências ainda desconhecidas ao consumidor da carne dos peixes (ZANATTA *et al.*, 2007). Entretanto, a aplicação destes inseticidas pode resultar em altos níveis de resíduos nos peixes, inclusive no momento do consumo, pois normalmente os períodos de carência não são respeitados pelos piscicultores (RODRIGUES & FANTA, 1998).

O paration-metílica é um organofosforado amplamente utilizado no Brasil para evitar perdas agrícolas pelo ataque de moscas e insetos as plantas e também uso em aquicultura para controle de parasitas de brânquias e pele de peixes (ALMEIDA, 2005; AGUIAR & MORAIS, 1999). Na piscicultura, o inseticida do grupo químico dos organofosforados, é um dos mais empregados no controle de predadores aquáticos em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe, com o objetivo de maximizar a produção de rotíferos (SENHORINI *et al.*, 1991).

Apesar das semelhanças morfológicas entre os peixes, as diferenças bioquímicas e fisiológicas são numerosas e cada espécie possui um conjunto de

adaptações características que permite a sua sobrevivência frente às pressões do meio (FRAGA, 2010).

O estresse é uma resposta que fornece energia ao organismo, energia usada para ajustes necessários para o organismo se equilibrar. Essas respostas acarretam outras, como aumento do consumo de oxigênio e da respiração, junto com outras respostas motoras, psicológicas, bioquímicas e fisiológicas. Se a situação persiste (fica mais crônica), outros processos passam a ser comprometidos: reduz o crescimento, inibe reprodução e diminui a resistência a doenças, suprimindo o sistema imunológico (CECCARELLI *et. al.*, 2000).

O uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como biomarcadores têm apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes (MARTINEZ & SOUZA, 2002).

Neste contexto, contaminação ambiental por agrotóxicos causam efeitos deletérios sobre os organismos aquáticos e como a piscicultura vem atualmente tomando impulso, e uma vez constatada a presença desses produtos nos viveiros de piscicultura, torna-se necessário obtenção de dados para se efetuar um maior controle do seu uso devido as suas eventuais implicações nos ambientes.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1. Importância do tema

A piscicultura, entendida como a produção racional de peixes em quaisquer de suas fases de desenvolvimento, é uma atividade importante e viável economicamente atualmente. O Brasil tem um dos maiores potenciais do mundo para o desenvolvimento da piscicultura, particularmente devido ao seu clima, diversidade de espécies, quantidade de água, tipo e extensão de solo e facilidade de acesso aos locais de produção. Essas condições e a carência alimentar da maioria dos brasileiros tornam a exploração desse potencial praticamente uma exigência social (CECCARELLI *et. al.*, 2000).

A criação de peixes em cativeiro é praticada há pelo menos três décadas no estado do Amazonas e, nesse tempo esta atividade vinha se desenvolvendo lentamente. Atualmente existe uma grande demanda por peixe no Estado, devido ao aumento da densidade demográfica na cidade de Manaus e ao grau elevado de urbanização que a cidade vem alcançando. Entretanto, espera-se que a

produtividade de peixes por lâmina da água de cultivo ainda se tenha um incremento (CAVERO *et. al.*, 2003).

O aumento da atividade aquícola tem despertado a atenção da comunidade científica e de órgãos de gestão quanto aos riscos relacionados a esta atividade (BOYD & MASSAUT, 1999). Esses riscos incluem os danos ambientais e à saúde dos consumidores (WINKALER, 2008). Observa-se crescente interesse por parte dos produtores, no que diz respeito à busca de soluções para evitar os prejuízos causados por mortalidade e problemas na produção. Entre os aspectos mais importantes para a otimização da atividade estão aqueles que afetam o desempenho e a resistência dos animais às doenças, e para os quais se têm voltado os esforços científicos na busca de soluções (PICKERING, 1981; BARTON & IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997, HONTELA, 1997; BARNETT, 1998).

Diante dos possíveis casos de enfermidades na piscicultura, é comum o uso de algumas formas de tratamento que utilizam medicamentos de uso agrícola ou veterinário. Sabe-se que no Brasil ainda não existe uma legislação regulamentadora para registro destes produtos na aquicultura. Diante da ameaça à produtividade empregam-se muitas vezes quimioterápicos não registrados e sem especificações técnicas do fabricante para uso nos ambientes aquícolas (CAMPOS, 2005). Estas enfermidades ocorrem devido ao regime de cultivo intensivo que utiliza alta densidade populacional que pode provocar estresse nos peixes, principalmente durante o transporte, reprodução artificial ou ainda exposição a períodos de baixa qualidade de água do cultivo e a não execução de medidas preventivas na introdução de novos peixes nos criatórios ou pelo contato dos animais de cultivo com peixes silvestres parasitados (MARTINS, 1998).

Para o controle de parasitos, muitos agentes químicos são empregados, de forma profilática ou terapêutica, destacando-se o paration-metílico como uma das substâncias químicas de maior eficiência conforme o aumento da sua concentração e do tempo de exposição (CRUZ *et al.*, 2008).

A resposta ao estresse é um mecanismo que permite ao peixe preservar sua saúde frente à eminente ameaça. Dependendo da severidade do estressor, o mecanismo de resposta pode se tornar disfuncional e impactar negativamente a fisiologia do animal, podendo levar a morte (CECCARELLI *et. al.*, 2000; LIMA *et. al.*, 2006).

2.2. Contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos

O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas fontes. Logo tem sido um grande problema a utilização desses produtos químicos tóxicos relacionados aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem ambientes aquáticos, a espécies sensíveis e não alvos principais do produto aplicado. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Quando a contaminação é intensa observa-se mortalidade de peixes; quando a contaminação ocorre em escala menor e de forma freqüente, as conseqüências são ainda desconhecidas. Nesse caso, além da diminuição da produção de peixes e aumento de doenças, pode haver bioacumulação do produto com conseqüências ainda desconhecidas para o consumidor da carne dos peixes (ZANATTA *et al.*, 2007). Em adição, a aplicação destes inseticidas pode resultar em altos níveis de resíduos nos peixes, inclusive no momento do consumo, pois normalmente os períodos de carência não são respeitados pelos piscicultores (RODRIGUES *et al.*, 1997).

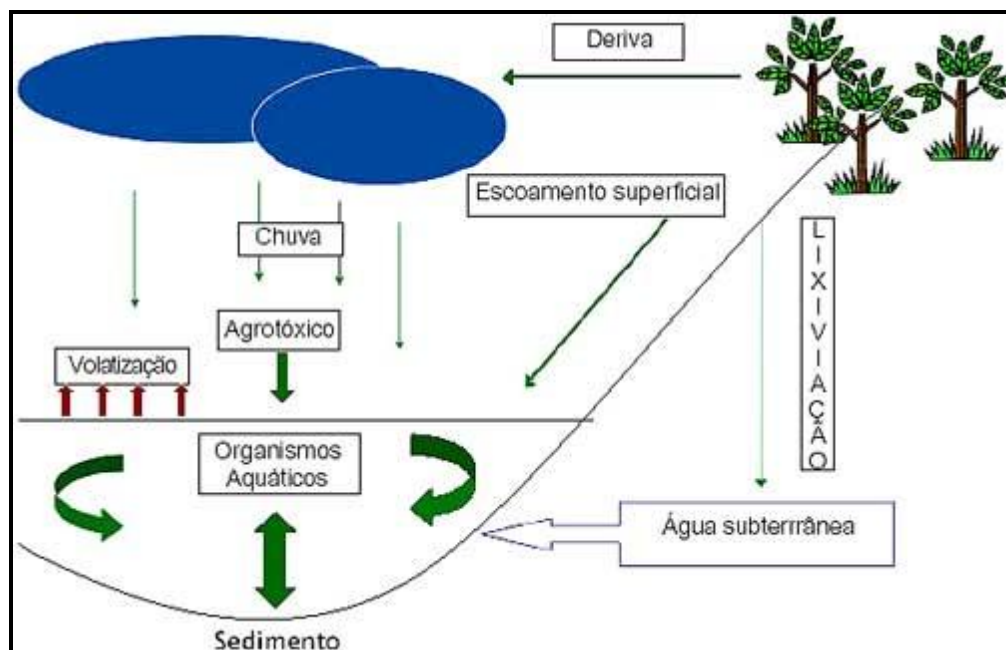


Figura 1 Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (TOMITA & BEYRUTH, 2002).

Segundo Figueiredo & Senhorini (1990), a utilização de biocidas na preparação de viveiros de criação de pós-larvas de carpa comum, resulta em maior

produção de alevinos, porém menores com maior sobrevivência. Caso não sejam utilizados inseticidas, os alevinos serão maiores, mas a sobrevivência será bem menor. Estas informações destacam como o agrotóxico mais empregado para combater os predadores aquáticos.

Segundo Tomita & Beyruth (2002), esses produtos químicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações. A lixiviação dos agrotóxicos através do perfil dos solos pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos, portanto, além de afetar os próprios cursos de água superficiais, os agrotóxicos podem alcançar os lençóis freáticos, cuja descontaminação apresenta grande dificuldade (ROSA, 1998).

Os organofosforados são utilizados como agrotóxicos devido a uma rápida degradação no ambiente depois que são aplicados, porém o grande problema da utilização desses produtos químicos tóxicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não alvos (FRAGA, 2010).

O uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como biomarcadores têm apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes (MARTINEZ & SOUZA, 2002). Estes estressores podem influenciar nas respostas imunológicas dos peixes, dependendo do tipo, a quantidade e duração da exposição a estes fatores, os efeitos sobre o animal podem ser negativos (VERLHAC & GABAUDAN, 2002). As respostas fisiológicas dos peixes aos diferentes estímulos adversos à homeostase fazem parte do grande conjunto dos ajustes e adaptações dos organismos a diferentes estressores, que podem ter origem natural ou antrópico. Muitos estudos em biologia de peixes fazem uso dessas respostas com a finalidade de mensurar e avaliar os efeitos de um determinado agente estressor (INOUE, 2005).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos aquáticos podem ocorrer através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática e danos a macromoléculas, entre outros. O organismo então é capaz de responder, inicialmente a nível molecular e celular, a fim de evitar ou diminuir o efeito tóxico destes contaminantes através de respostas adaptativas. Caso estas respostas não sejam suficientes, poderá ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, mutação,

câncer, distúrbios comportamentais ou a morte. (FENT, 2004). E podem ser estimados e monitorados por testes de toxicidade realizados em laboratório, utilizando sempre que possível organismos-teste presentes nas regiões sujeitas à ação destes contaminantes (RAND & PETROCELLI, 1985). Assim, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) pertencente à ordem Characiforme, família Characidae e subfamília Myleinae, considerado de grande porte, destaca-se como uma das principais espécies da piscicultura brasileira (SANTOS *et al.*, 2006). Quando exposto a ambientes hipóxicos, usa sua principal adaptação a esse tipo de estressor: tem a capacidade de expandir o lábio inferior e o usa para captar a água da superfície, mais rica em oxigênio, e fazê-la passar por suas brânquias. Além disso, sofre vários ajustes fisiológicos e metabólicos para aumentar a eficiência na transferência de oxigênio do ambiente para os tecidos (VAL *et al.*, 1998). E segundo Artero (2008), o *Colossoma macropomum* pode ser usado como espécie padrão para estudos de toxicidade, devido à sua fácil manipulação e implicações ecológicas e econômicas na Amazônia.

2.3. Importância da aplicação dos testes de toxicidade

Os testes de toxicidade aquática constituem uma importante ferramenta para avaliação da sensibilidade de organismos a fatores ambientais desfavoráveis como efluentes tóxicos, poluentes físicos, químicos e medicamentos. São realizados com diversas finalidades, como a regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, a homologação e registro de produtos químicos comerciais utilizados no meio ambiente e para teste de medicamentos, que permitem avaliar a eficácia e também os efeitos deletérios dos compostos químicos utilizados nos tratamentos de doenças de organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004). Podem ser classificados como “agudos” ou “crônicos”, em função do tempo de exposição dos organismos à substância tóxica e do tipo de efeito a ser observado (RAND *et al.* 1985). Sendo que as respostas da biota aos poluentes são distribuídas pelo tempo, algumas ocorrendo imediatamente após o evento poluidor ou respondendo a um estímulo contínuo e longo (BRENDOLAN, 2004).

Nos testes agudos, organismos são expostos a altas concentrações de um contaminante por um curto período de tempo, geralmente 48 a 96 horas, usando-se a concentração letal ou concentração efetiva para 50% dos organismos em teste (CL₅₀ ou CE₅₀), ou seja, a concentração do agente tóxico presente no ambiente

aquático que causa 50% de letalidade, ou outro efeito, à espécie-teste (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1988). O objetivo destes testes é determinar a concentração da substância química ou efluente que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo e sob condições controladas (RAND & PETROCELLI, 1985; RAND, 1995; NIPPER, 2002).

Nos testes de toxicidade crônica, o organismo responde a um estímulo que continua por longos períodos, podendo afetar todo seu ciclo de vida. De um modo geral, as concentrações a que os organismos são expostos são subletais, ou seja, permitem a sobrevivência do organismo, mas afetam uma ou várias de suas funções biológicas, por exemplo, interferência na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e/ou comportamento em geral (GHERARDI-GOLDSTEIN, 1988).

Os principais organismos recomendados são produtores primários, como microalgas e macrófitas (ex.: *Selenastrum capricornutum* e *Lemna minor*); consumidores primários, como os organismos zooplanctônicos (ex.: *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*); e os consumidores secundários, como os peixes (ex.: *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) (IBAMA, 1987); além de organismos associados aos sedimentos, como o crustáceo anfípoda *Hyaella azteca* (MOORE *et al.*, 2007).

Os testes fornecem informações e indicações sobre possíveis riscos e alterações prejudiciais ao meio ambiente, servindo assim, como sistemas preventivos de proteção e alerta (KNIE & LOPES, 2004).

2.4. Efeitos agudos e subagudos do paration-metílico em peixes

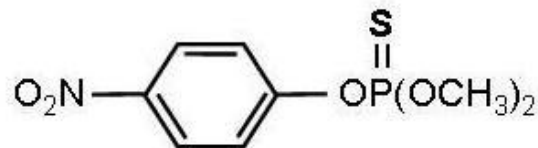
Os agrotóxicos presentes no meio aquático podem atingir o homem pela ingestão de água e de alimentos contaminados, como os peixes. Os peixes entram em contato direto com os agrotóxicos principalmente pela via dérmica, superfície externa do corpo com suas inúmeras estruturas sensoriais, brânquias, por via oral e por todo o trato gastrointestinal (MATAQUEIRO, 2002). Os organofosforados apresentam em sua maioria caráter hidrofóbico, por esta razão são difíceis de serem excretados, o que favorece que sejam tóxicos aos organismos vivos e, após a absorção, em sua maioria, passam da corrente sanguínea para as células hepáticas (WOLFF *et al.*, 1992).

O paration-metílico ou O, O-Dimethyl O-4-(nitrophenyl) phosphorothioate é um inseticida do grupo químico dos organofosforados. Sua classificação toxicológica

segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) é I, extremamente tóxico e classificação IA com LD₅₀ de 14 mg/kg, segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (1997). O princípio ativo possui baixa persistência e curto deslocamento para as regiões vizinhas. A taxa de degradação aumenta com a temperatura e com a exposição à luz solar, sendo moderadamente adsorvido pela maioria dos solos e levemente solúvel em água (WAUCHOPE *et al.*, 1992).

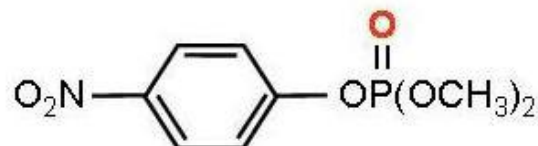
A toxicidade do paration-metílico está relacionada ao enxofre duplamente ligado ao fósforo ligante (Figura 2A) e os grupos que circundam o fosfato (LANDIS & MING-HOYU, 1995) que quando metabolizado pelo organismo, nas reações de desintoxicação no fígado pelo metabolismo oxidante do sistema P-450 substitui o átomo de enxofre (P = S) pelo oxigênio (P = O) gerando uma forma tóxica mais potente, o paraoxon (OP) (Figura 2B).

A



Paration-metílico

B



Paraoxon-metílico

Figura 2 Fórmula Estrutural da Paration-metílico e Paraoxon- metílico. Fonte: ANVISA, 2003.

Os peixes podem ser expostos o paration-metílico acidentalmente, ou sob condições de tratamento. Em cultura de peixes, o tratamento com compostos organofosforados é um método comum empregado para controlar estágios larvais de insetos predadores de larvas de peixes. Organofosforados também são utilizados para tratar infecções de pele e brânquias causadas por parasitas externos. Dependendo do parasita e da espécie de peixe, a concentração do organofosforado

recomendada pode variar entre 0,25 e 12,5 mg. L⁻¹. No Brasil, o Folisuper 600[®] é um dos organofosforados mais utilizados para este propósito, em concentrações variando de 0,5 a 3 mg L⁻¹ (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Os estudos em toxicologia aquática são qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade (mortalidade) e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento. A toxicologia aquática também está relacionada com as concentrações ou quantidades dos agentes químicos que podem ocorrer no ambiente aquático (água, sedimento ou alimento). A toxicidade de um composto químico depende da exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais (RAND & PETROCELLI, 1985).

Além disso, em sistemas de cultivo de peixes, o paration-metílica é comumente utilizado na preparação de viveiros de larvicultura onde há estocagem de larvas de peixes, na concentração de 0,25 a 3,0 ppm do produto ativo, com o objetivo de eliminar predadores aquáticos como larvas e ninfas de insetos da ordem Odonata (FIGUEIREDO & SENHORINI, 1990).

A toxicidade em organismos aquáticos aumenta de acordo com a temperatura, uma vez que, em maiores valores de temperatura os organismos aquáticos têm maior metabolismo e taxas de respiração e, conseqüentemente, a absorção de substâncias tóxicas é facilitada (HOWE *et al.*, 1994). Os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos aquáticos podem ser estimados e monitorados através de testes de toxicidade conduzidos em condições de laboratório (RAND & PETROCELLI, 1985).

2.5. Respostas ao estresse utilizando o tambaqui como biomarcador

O estresse é caracterizado por um conjunto de respostas do organismo desencadeadas pelo hipotálamo e hipófise. Alguns fatores químicos estimulam as células interrenais nos peixes a liberarem, principalmente, a adrenalina e o cortisol. Esses dois hormônios vão para o sangue e, então, atingem todo o organismo, provocando efeito em muitas células. Esses hormônios são catabólicos, o que significa que estimulam reações de quebra de compostos para a liberação de energia. Portanto, o estresse é uma resposta que fornece energia ao organismo,

energia usada para os ajustes necessários para o organismo se equilibrar (CECCARELLI *et al.*, 2000).

A resposta ao estresse é um mecanismo que permite o peixe preservar sua saúde frente à ameaça de estressores. Dependendo da severidade do estressor, o mecanismo de resposta pode se tornar disfuncional e impactar negativamente a fisiologia do animal (VERLHAC & GABAUDAN, 2002).

Em todas as fases do cultivo ocorrem procedimentos considerados adversos aos peixes. O estresse causado pelas práticas de rotina prejudica o desempenho dos animais (CHOPIN *et al.*, 1996).

Quando desafiada por uma ameaça ou submetida a situações ambientais desfavoráveis, a maioria dos animais exibe uma série de mudanças orgânicas, fisiológicas e comportamentais, que aumentam a probabilidade de sobrevivência imediata (BARTON & IWAMA, 1991 citado por CYRINO *et al.*, 2004). Estas mudanças são caracterizadas por direcionamento e investimento energético do corpo para os órgãos (coração, músculos e cérebro) responsáveis por funções consideradas prioritárias (CYRINO *et al.*, 2004).

Situações de estresse em peixes podem causar ainda uma demanda energética maiores que a sustentável pelo metabolismo aeróbico. Alguns estressores podem dificultar o suprimento de oxigênio às células, tanto por meios diretos, como estressores que reduzem a concentração de oxigênio ambiental (exemplo: um “over turn” do oxigênio dissolvido na coluna da água), quanto por meios indiretos, como a diminuição da capacidade respiratória induzida por um determinado agente estressor (exemplo: a presença de parasitas nas brânquias, ou danos nas lamelas branquiais por xenobióticos) (HOCHACHKA, 1980).

O conjunto de respostas metabólicas expressa pelos peixes devido a estímulos adversos a homeostase são expressas em três categorias: primária, secundária e terciária (BARTON *et al.*, 2002), conforme a figura 3.

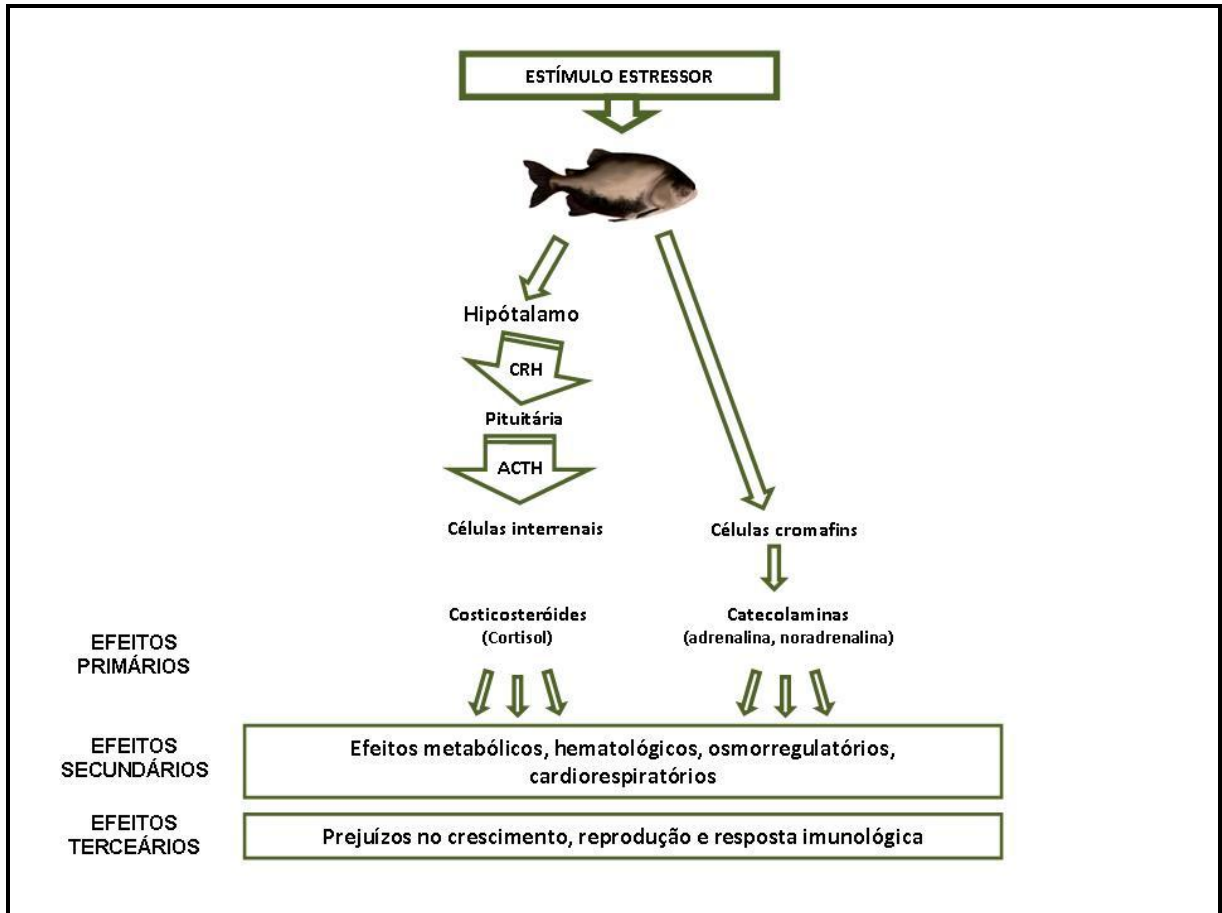


Figura 3 Esquema ilustrativo dos efeitos primários, secundários e terciários de estressores ambientais em peixe, segundo (BARTON *et al.*, 2002).

As respostas primárias são as hormonais. As secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade a doenças. O cortisol, principal corticosteróide em peixes, é considerado um bom indicador para avaliação de estresse primário (MOMMSEN *et al.*, 1999). Um bom indicador para resposta secundária é a glicose do sangue ou plasma, pois esta avaliação pode ser realizada na criação, com medidores de glicose de simples utilização e facilmente encontrados no mercado (WELLS & PANKHURST, 1999).

O forte balanço eletrolítico é evidenciado por teores plasmáticos alterados na Na^+ , Cl^- e K^+ , e o significativo desbalanço da excreção nitrogenada dos peixes é evidenciado pelo aumento da amônia plasmática (MCDONALD & MILLIGAN, 1997).

As respostas fisiológicas dos peixes aos diferentes estímulos adversos à homeostase fazem parte do grande conjunto dos ajustes e adaptações dos organismos a diferentes estressores, que podem ter origem natural ou antrópica. Muitos estudos em biologia de peixes fazem uso dessas respostas com a finalidade

de mensurar e avaliar os efeitos de um determinado agente estressor (INOUE, 2005).

Os agrotóxicos depois de absorvidos pelo corpo sofrem um processo de biotransformação, que é um conjunto de alterações químicas que as substâncias sofrem no organismo, geralmente por processos enzimáticos, com o objetivo de tornar os compostos mais hidrossolúveis e mais fáceis de serem excretados (AZEVEDO & LIMA, 2003), que pode ser descrita em duas partes: pré-sintética (fase I) e sintética (fase II).

Ao entrar na célula, as substâncias são inicialmente metabolizadas pelo citocromo P-450 (CYP1A, uma das subfamílias da P450), onde, através de reações de oxidação, redução e hidrólise, é introduzido um centro eletrofílico na molécula do xenobiótico (Fase I). Nesta fase muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos (bioativação). A criação do centro reativo permite que as enzimas da fase II conjuguem o metabólito eletrofílico com várias moléculas endógenas (por exemplo, glutatona), que resulta num metabólito final hidrofílico, passível de ser eliminado, processo denominado como desintoxicação (GUECHEVA & HENRIQUES, 2003).

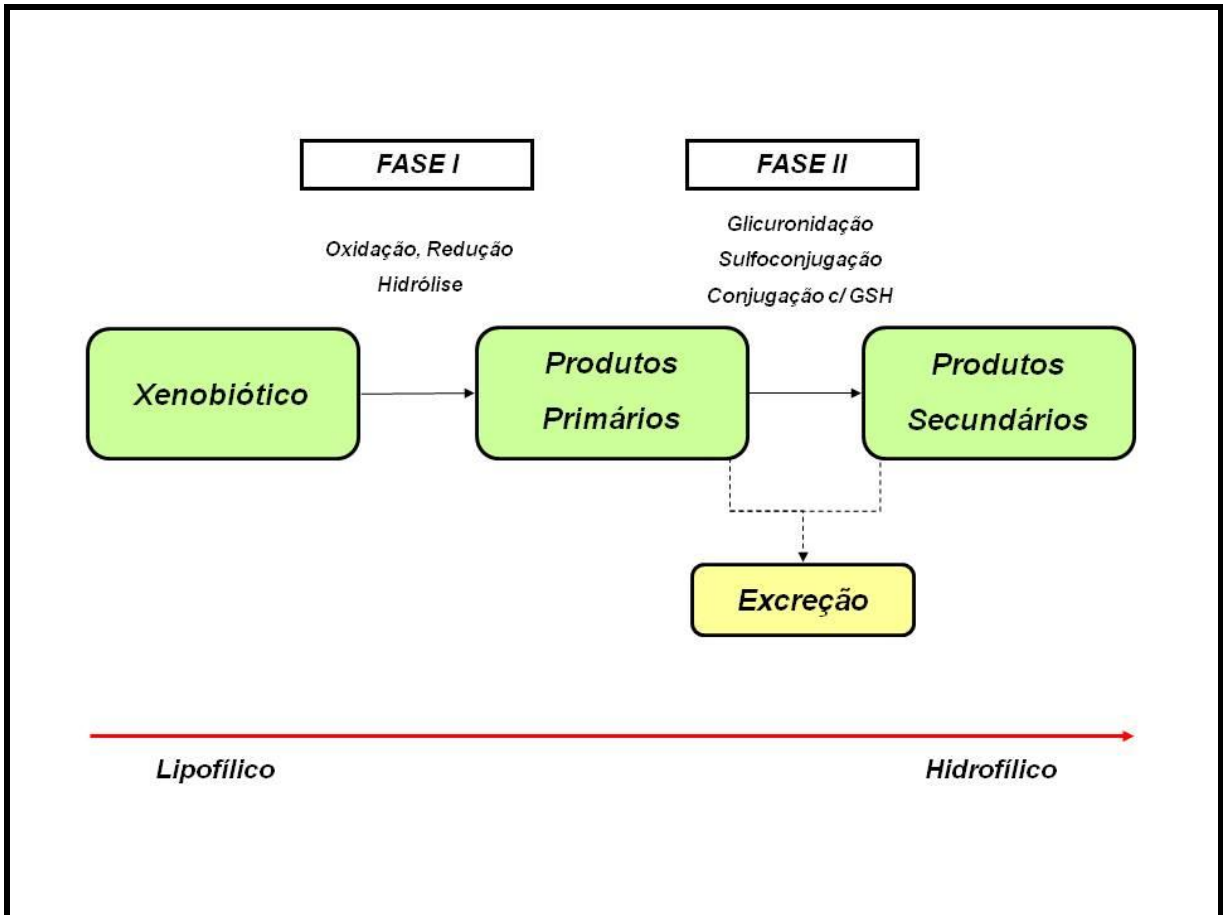


Figura 4 Etapas da biotransformação. A substância de caráter lipofílico deve ser biotransformada num produto mais solúvel em água para ser excretada do organismo. As reações de fase I introduzem ou expõe um grupo funcional. A reação de fase II e a conjugação de produto de fase I ou da própria substância com substâncias endógenas, como por exemplo, a glutathiona reduzida (GSH) (REGO, 2012).

O grupo das glutathiona s-transferases (GST) é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvidas na desintoxicação celular de compostos eletrofílicos, gerados intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos. Essas proteínas são encontradas em diferentes formas, chamadas de isoenzimas (HAYES & PULFORD, 1995; WINDERSTEN & MANNERVIK, 1995). Sua ação desintoxicante é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, incluindo aquelas associadas com o envelhecimento (BABBITT, 2000).

Biomarcadores indicam se um grupo de organismos num dado ambiente está dentro de seus padrões fisiológicos normais. Se a resposta for negativa, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação, podendo ser classificados em três tipos: de

exposição, de efeito e de suscetibilidade, os quais são instrumentos que possibilitam identificar a substância tóxica ou uma condição adversas (WALKER *et al.*, 1996).

Os biomarcadores de exposição são aqueles que indicam se um indivíduo foi ou está exposta a alguma espécie de poluente sem, no entanto, permitir qualquer inferência a respeito do grau de efeitos adversos causados. Biomarcadores de efeito são aqueles que demonstram a ocorrência de um efeito tóxico no organismo estudado. Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (WALKER *et al.*, 1996). E os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARRETT *et al.*, 1997).

Neste trabalho as reações metabólicas do tambaqui de cativeiro exposto a condições subletais de paration-metílica serão avaliadas através de análises sanguíneas e análises bioquímicas para estresse oxidativo através da atividade da glutathione S-transferase.

2.6. A Espécie *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier (1818), é um peixe pertencente à Ordem Characiforme e família Characidae e subfamília Myleinae. É considerado um peixe de grande porte, medindo até 100 cm de comprimento e mais de 30 kg; segundo maior peixe de escamas da América do Sul, depois do pirarucu; corpo alto, romboidal, lábios grossos, dentes molariformes; ausência de espinho pré-dorsal; nadadeira adiposa com raios. É um peixe amazônico muito importante para a pesca regional e uma das principais espécies da piscicultura brasileira. Uma característica marcante é a grande plasticidade genotípica e fenotípica, que permite à espécie sobreviver no heterogêneo ambiente amazônico (SANTOS *et al.*, 2006) e um dos peixes mais importantes da piscicultura brasileira, em especial nas regiões Norte e Nordeste. É nativo da bacia Amazônica e considerado o segundo maior peixe de escamas do rio Solimões e do Amazonas (GOULDING & CARVALHO, 1982).

A grande disponibilidade de frutos e sementes leva a espécie a incluir em sua dieta uma mistura destes para conseguir melhor equilíbrio de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas e em cativeiro, aceita ração, o que, em conjuntos com a sua rusticidade, faz da espécie uma das mais utilizadas na piscicultura da região (ARAUJO-LIMA & GOULDING, 1998).



Figura 5 Exemplar juvenil de *Colossoma macropomum* (Tambaqui).

No decorrer de seu desenvolvimento, o tambaqui sofre grandes variações tanto no padrão de coloração, quanto na forma do corpo. É uma espécie endêmica que ocorre naturalmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, sendo muito comum em lagos de várzea (ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005).

Quando exposto a ambientes hipóxicos, o tambaqui usa sua principal adaptação a esse tipo de estressor; tem a capacidade de expandir o lábio inferior e o usa para captar a água da superfície, mais rica em oxigênio, e fazê-la passar por suas brânquias. Além disso, sofre vários ajustes fisiológicos e metabólicos para aumentar a eficiência na transferência de oxigênio do ambiente para os tecidos (VAL *et al.*, 1998).

É uma espécie bastante apreciada por comunidades tradicionais na Amazônia e tem sido explorado pela pesca comercial na Amazônia desde o século XIX. No entanto, a produção desta espécie pela pesca comercial tem sofrido considerável diminuição em toda a Amazônia em virtude do grande esforço de pesca investido (BATISTA & PETRERE JR., 2003). Para suprir a demanda desta espécie, intensos esforços têm sido investidos para o cultivo em cativeiro (SANTOS *et al.*, 2006).

Os peixes respondem de forma similar aos mamíferos em bioensaios, como aqueles que analisam a resposta bioquímica a agentes químicos. As vantagens do uso de peixes como organismos modelo incluem a facilidade com que essas espécies podem ser mantidas em laboratório e expostos a agentes químicos (SILVA *et al.*, 2003).

O tabaqui é uma espécie de fácil manuseio e manutenção em laboratório desde que mantida sua temperatura ideal da água. Os aspectos da sua fisiologia, genética, bioquímica e ecologia já foram descritos na literatura especializada (SAINT-PAUL, 1988; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995) e por ser uma espécie de grande valor comercial e ter sido incorporada em criações experimentais e comerciais e a detecção de agrotóxicos e seus efeitos sobre os organismos são estudos importantes, uma vez que eles podem indicar o impacto destes produtos sobre os organismos vivos (CHAPADENSE *et al.* 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar as reações metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) quando exposto à concentrações subletais do agrotóxico paration-metílica.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração letal ($CL_{50-96hs}$) do inseticida paration-metílica para tambaqui (*Colossoma macropomum*) em condições de piscicultura;
- Avaliar a persistência do inseticida paration-metílica no período de 2 hs, 24 hs, 48 hs, 72 hs e 96 hs após a aplicação do agrotóxico na água em condições subletais, através de análises cromatográfica;
- Realizar um experimento de exposição com os resultados obtidos do $CL_{(50-96hs)}$ e determinar se a exposição em condições subletais do inseticida paration-metilica causa alterações metabólicas de estresse no tambaqui;
- Avaliar o efeito agudo da exposição subletal do inseticida paration-metílica em tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os alevinos de tambaqui foram obtidos da Estação de Piscicultura de Balbina com 0,85 g e 1,5 cm, e transportados para um viveiro de 400 m² na Embrapa Amazônia Ocidental, abastecidos com água de poço artesiano. Os peixes foram alimentados diariamente duas vezes ao dia até a saciedade aparente com ração extrusada contendo 34% de proteína bruta por 60 dias até atingir o tamanho ideal. Os experimentos foram conduzidos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (Figura 6).

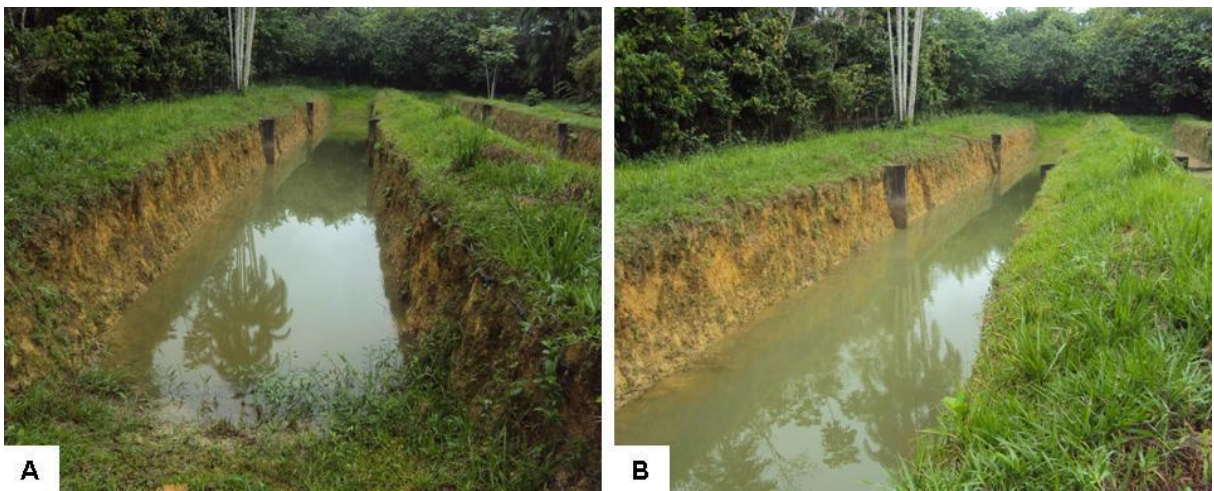


Figura 6 Estação de Piscicultura da Embrapa – Campo Experimental (A) e (B).

4.1. Testes preliminares de toxicidade aguda (CL_{50; 96h}) do paration-metílico.

Os testes preliminares com paration-metílico foram realizados com a utilização de cinco concentrações crescentes como tratamentos e um controle com duas repetições.

Para a determinação da toxicidade aguda (CL_{50; 96h}) do paration-metílico para tambaqui foram utilizados lotes homogêneos de peixes jovens com peso de aproximadamente 25 ± 3,9 g e 11 ± 0,7 cm (Figura 7).

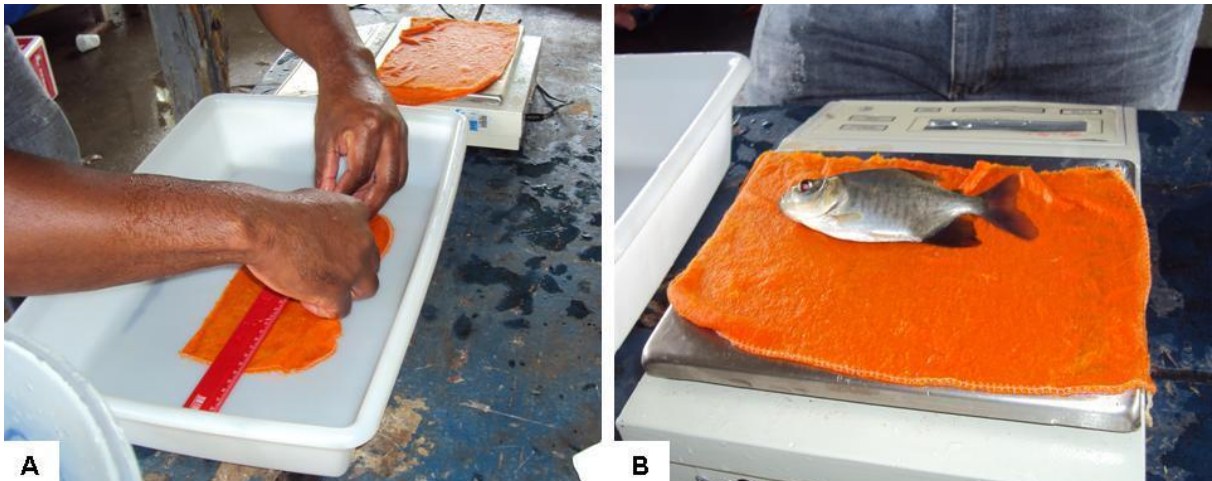


Figura 7 Biometria (A) e (B).

O período de aclimação foi de 10 dias em caixas de fibra de 2000 L, de acordo com as recomendações do IBAMA (1987) e MURTY (1988). Neste período os peixes foram alimentados com ração comercial a 32% de proteína bruta. Posteriormente, os peixes foram mantidos em jejum e transferidos para caixas de fibra de 390 L e aclimatados novamente, por 48 horas, com sistema de aeração contínuo promovido por um aerador. A densidade foi de 10 peixes por caixa ($1 \text{ g/peixe} \cdot \text{L}^{-1}$) e o sistema utilizado foi o estático, sem renovação de água conforme as diretrizes da OCDE para os ensaios de toxicidade aguda de produtos químicos em peixes (OCDE, 1992) e do protocolo estabelecido pelo ABNT para testes toxicidade aguda em peixes (ABNT, 2004b). Este protocolo foi ligeiramente modificado de acordo com as condições específicas do ambiente de peixe amazônico. Os peixes que não sobreviveram ao período de aclimação foram substituídos por novos, antes do experimento (Figura 8).

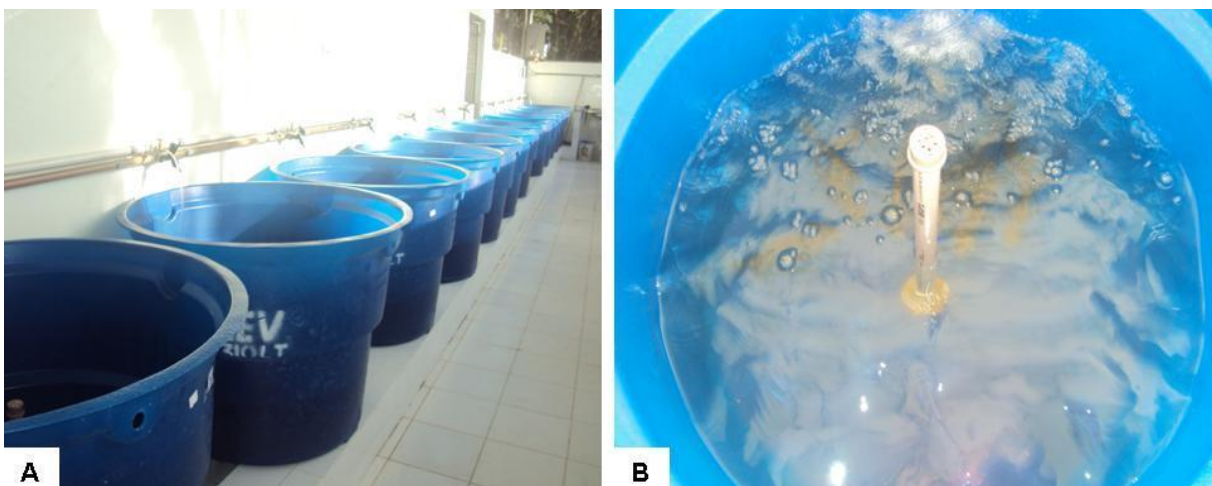


Figura 8 Reservatórios de 390L para aclimação dos animais e execução do experimento (A) e (B).

Os ensaios foram realizados no sistema de circulação de água fechado Embrapa sob temperatura ambiente, ou seja, conduzidos por 96 horas em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água durante o período de exposição dos peixes. A água utilizada nos testes foi da rede de abastecimento local, proveniente de um poço artesiano. Antes de cada teste, para cada caixa, foram determinados os dados de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, dureza, alcalinidade e amônia da água.

O monitoramento da qualidade de água e a mortalidade dos peixes nas caixas de água foram registrados a cada 24 horas do experimento.

Foi feito um teste preliminar para verificar o tempo de permanência do paration-metílico na água através da cromatografia gasosa (CG), pelo período de 2 hs, 24 hs, 48 hs, 72 hs e 96 hs e as amostras de água foram coletadas em frascos âmbar de vidro previamente esterilizados e imediatamente congelados para posterior análise.

Ocorreram três ensaios, em que os animais foram expostos às concentrações de: 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg de paration-metílico/L de água (Experimento 1); 0; 1,0; 1,4; 1,96; 2,74 e 3,84 de paration-metílico/L de água (Experimento 2) e 0; 0,5; 0,70; 0,98; 1,37 e 1,92 de paration-metílico/L de água (Experimento 3).

4.1.1. Condições cromatográficas

A determinação do tempo de permanência do paration-metílico na água foi realizada no cromatógrafo a gás CG 3800 da Varian, com captura e detector de elétrons (ECD), provido de coluna capilar 8944 (VF 5 ms: 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm), com fase estacionária de fenil (5%) e dimetilpolisiloxano (95%), no Laboratório de Pesquisas e Ensaios de Combustíveis – LAPEC da Universidade Federal do Amazonas.

O gás transportador utilizado foi o nitrogênio 5.0 com pressão inicial de 80 psi (kgf/cm²). A fibra de SPME a ser utilizada foi a PDMS (Polydimethylsiloxano, 100 µm) acoplada no Autosampler (8400) ambos da Supelco.

A técnica a ser seguida foi descrita por Capobiano e Cardeal (2005) e Doog & Lião, (1997), para as amostras de água:

- 16 ml da amostra de água foi armazenada em um vial de headspace de 20 ml da marca Supelco tampado com septo de silicone linear,

posteriormente ficou sob agitação no agitador de marca Quimis (Modelo: Q261-12) em uma velocidade de 1300 RPM com uma barra magnética (5x15: Stirbar) com a fibra exposta por aproximadamente 45 min.;

- Em seguida a fibra ficará exposta no cromatógrafo por aproximadamente 7.5 min de corrida (Figura 9).

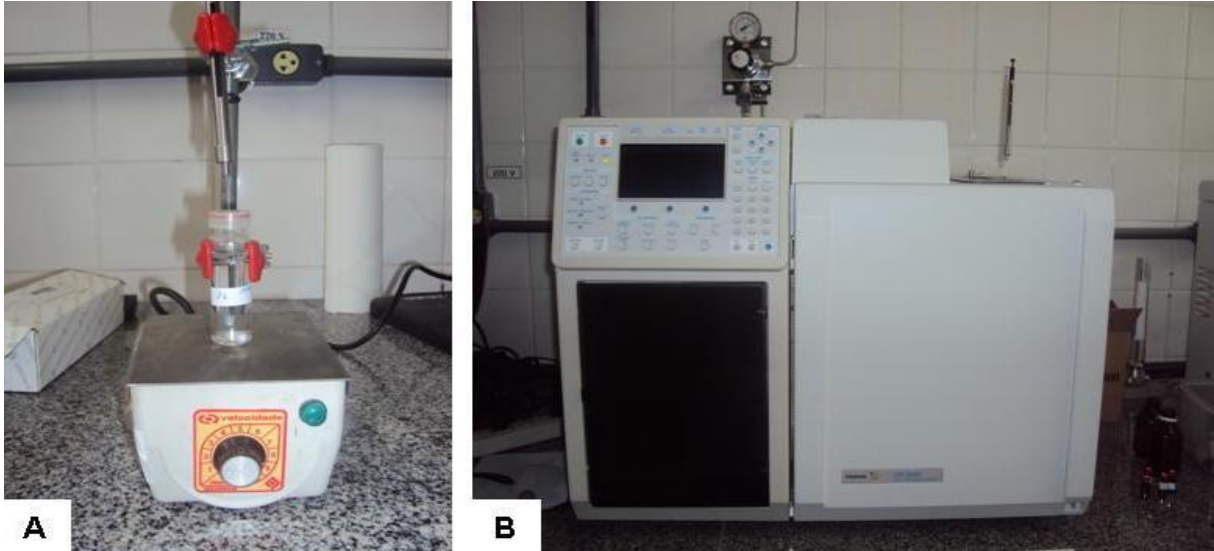


Figura 9 Amostra sob agitação (A); Cromatógrafo a gás CG 3800 da Varian com captura e detector de elétrons (ECD) e a fibra PDMS (Polydimethylsiloxano, 100 μm) acoplada no Autosampler (8400) (B).

A quantificação das amostras foi realizada usando cinco níveis da curva de calibração com os padrões (1 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}$ e 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}$), cuja extração ocorreu utilizando a mesma técnica das amostras usando os picos das áreas dos agrotóxicos para serem medidos (Figura 10 e 11).

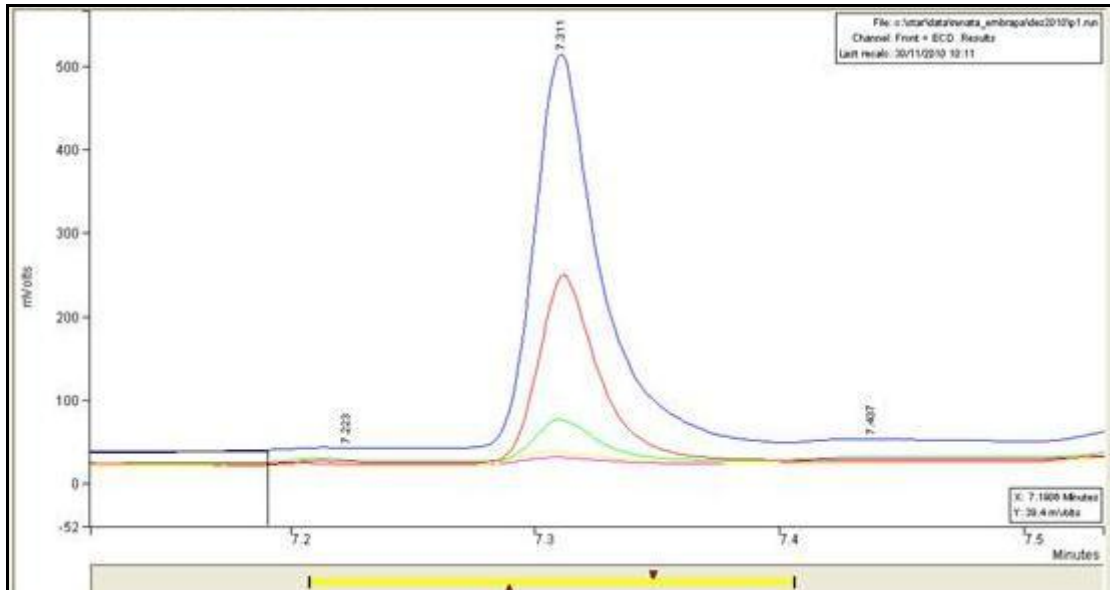


Figura 10 Cromatogramas dos padrões de 1 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}$ e 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}$ de paration-metílca.

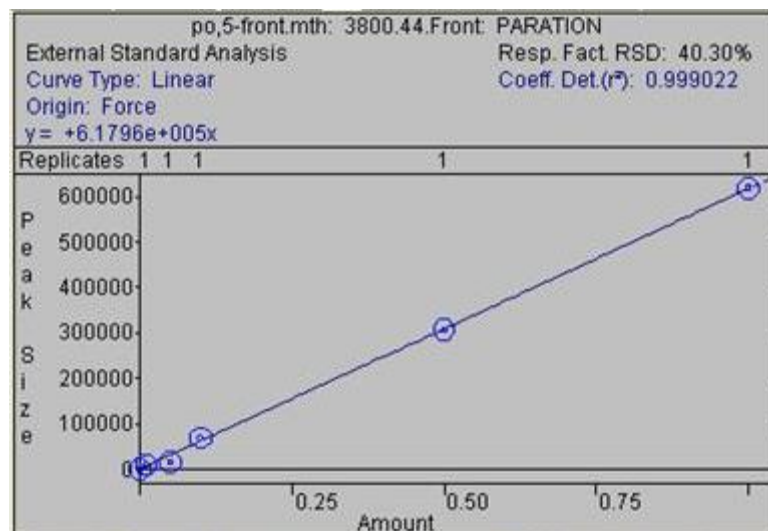


Figura 11 Curva analítica obtida para o paration-metílca.

O cromatográfico a gás foi operado no modo *splitless* com 7.5 min de corrida com a programação da coluna acertada em 160 °C mantida por 1 min., depois elevada para 190 °C a 25 °C/min., mantido por 2,7 min., depois elevado para 290 °C a 25 °C/min e finalmente mantida por 8 minutos. A temperatura do injetor é de 250 °C e a do detector é de 300 °C.

O agrotóxico paration-metílca (99,9% de pureza) foi previamente pesado na balança analítica de marca Bel Engineering, com 0,025 g e completado com acetado de etila em balão de 50 ml.

Solução estoque do pesticida foi preparada em acetato de etila e armazenada em freezer a 4°C e usado posteriormente para preparação dos padrões.

A preparação dos padrões foi realizada a partir da solução estoque de paration-metílica. As concentrações dos padrões trabalhadas serão de 1 µg/m, 0,5 µg/m, 0,1 µg/m, 0,05 µg/m e 0,01 µg/m em água destilada.

4.2. Experimento para avaliar as respostas metabólicas do tambaqui em condições subletais de paration-metilica

Para avaliação dos efeitos subletais da exposição do tambaqui ao inseticida paration-metílica foi realizado um experimento de exposição por um período de 96 horas, a partir dos resultados obtidos dos testes de toxicidade. Os peixes também foram previamente aclimatados em caixas de fibra de 2.000 L por 10 dias, e posteriormente distribuídos em 12 caixas de fibra de 390 L e aclimatados por mais 5 dias, com circulação fechada de água e aeração constante. Foram utilizados 120 peixes (com $27,6 \pm 1,2$ g e $10,8 \pm 0,4$ cm) neste presente estudo, testando-se o paration-metílica nas dosagens seguintes: 0; 0,5; 0,70; 0,98; 1,37 e 1,92 de paration-metílica/L de água, na qual o inseticida foi aplicado diretamente na água, simulando a ocorrência acidental por derivação em viveiros de peixes.

Neste experimento foram utilizadas ferramentas para mensurar ou avaliar e, principalmente, obter respostas dos efeitos de determinado agente estressor em condições subletais sobre o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

4.2.1. Coleta de sangue

Após o período de exposição por 96 horas às concentrações subletais, foram selecionados três peixes de cada tratamento, e em seguida ocorreu a coleta de sangue por punção caudal, utilizando-se seringas rinsadas em EDTA (anticoagulante) diluído a 3%, numa quantidade mínima de 1 ml. O sangue retirado foi transferido para tubos de “eppendorf”, mantendo-os sempre em gelo fundente.

Uma alíquota foi utilizada para determinações sangüíneas de hematócrito, hemoglobina e contagem de número de células vermelhas em câmara de Neubauer. Outra alíquota foi centrifugada para separação de plasma que foi utilizado em análises de glicose, amônia e íons (Na^+ , Cl^- e K^+).

4.2.2. Parâmetros Hematológicos

4.2.2.1. Hematócrito (Hct)

A porcentagem de células vermelhas foi determinada pela técnica de centrifugação do micro-hematócrito (COLLIER, 1944). As amostras de sangue foram colocadas em tubos de microhematócrito, que tiveram uma das extremidades vedada com massa e, em seguida, centrifugados a 12.000 RPM por 3 minutos. A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi feita numa escala padronizada e os resultados expressos em porcentagem (%) de células sedimentadas.

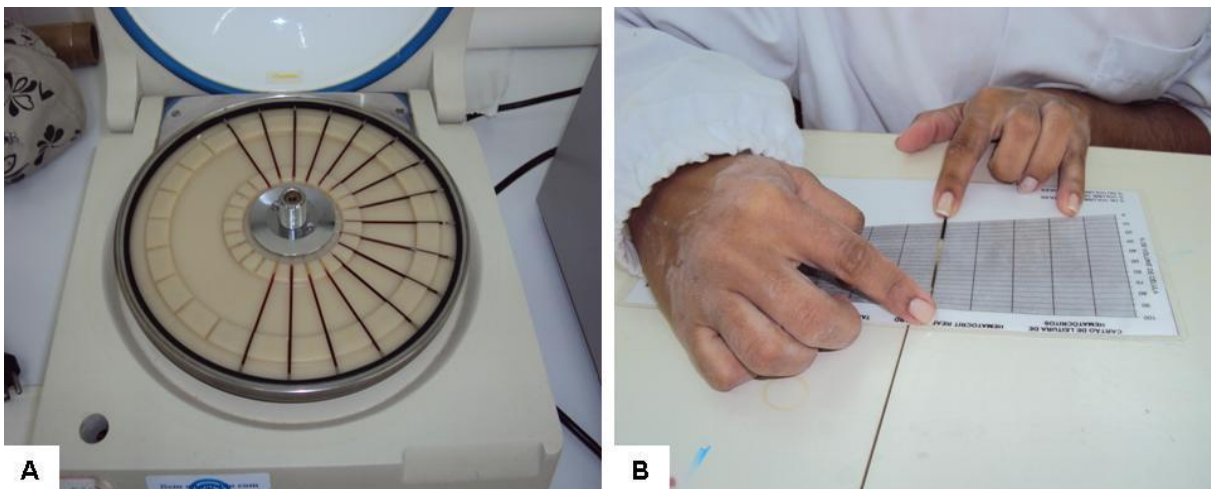


Figure 12 (A) e (B) Determinação do hematócrito (Hct).

4.2.2.2. Concentração de hemoglobina ([Hb])

A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada segundo o método da cianometahemoglobina, descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para tanto, 10 μ L de sangue em 2 mL de solução de Drabkin (KCN 0,5 g; KH_2PO_4 1,4 g; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2,0 g; 1 L de água destilada). Após agitação, os tubos permanecem em repouso por 15 minutos para a efetivação da hemólise. A densidade óptica foi determinada em 540 nm contra um branco contendo somente solução Drabkin (DRABKIN, 1948) em espectrofotometria. Os valores da concentração de hemoglobina foram expressos em g/dL, calculados por meio da seguinte equação:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dL)} = \text{absorbância (540 nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra}$$

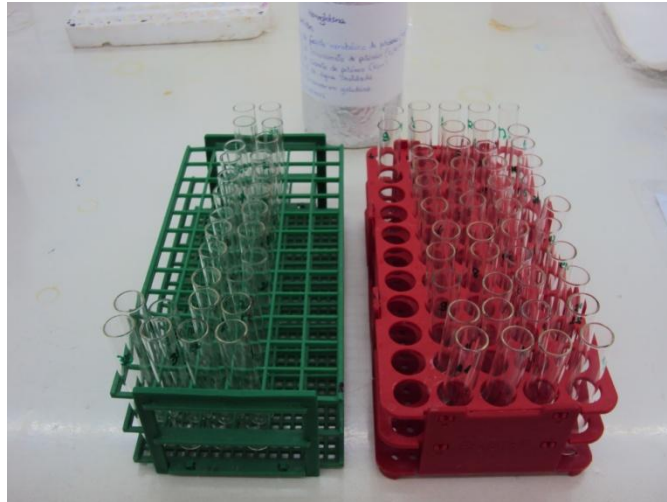


Figura 13 Determinação da concentração de hemoglobina.

4.2.2.3. Contagem do número de eritrócitos (RBC)

Para a contagem de eritrócitos foram diluídos 10 μ L de sangue em 2 mL de solução de formol-citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2 mL de formol 40% e a água destilada 100 mL) na proporção de 1:200 (v/v). Após a homogeneização, utilizando 10 μ L das amostras, a contagem de células vermelhas circulantes (RBC) foi feita em uma câmara de Neubauer sob objetiva microscópica de 40 vezes. O número total de eritrócitos está expresso em milhões de células por milímetro cúbico ($\times 10^6/\text{mm}^3$) de sangue (LIMA *et al.*, 1969).

4.2.2.4. Determinação das constantes corpusculares

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinadas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, ao hematócrito e a concentração de hemoglobina, de acordo com as seguintes fórmulas estabelecidas por Brow (1976).

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = \text{Htx}10/\text{RBC}$$

$$\text{HCM } (\text{pg}) = [\text{Hb}]\times 10/\text{RBC}$$

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb}]/\text{Htx}100$$

4.2.3. Parâmetros Iônicos

4.2.3.1. Concentração de Na⁺, Cl⁻ e K⁺

A determinação das concentrações de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) plasmáticos foram determinados em fotômetro de chama (Digimed, modelo DM-61), calibrada com solução padrão (DMS-13 A), contendo 140 mEq de Na⁺ e 5 mEq de K⁺. Amostras de plasma (10 µl) foram diluídas em água deionizada (1:200).

Alíquotas menores do restante dos ensaios de Na⁺ e K⁺ foram submetidas aos ensaios de cloreto através de método colorimétricos adaptado da Apha (1980).

4.2.4. Avaliação de Estresse

4.2.4.1. Glicose

As concentrações de glicose plasmática foram determinadas pelo método glicose-oxidase (TRINDER, 1969), utilizando o kit comercial GLUCOSE LIQUICOLOR® (que é um sistema enzimático para determinação de glicose no soro ou plasma), com leitura de absorvância a 500 nm. Os cálculos da concentração de glicose em mg/dL foram feitos pela seguinte fórmula:

$$C = 100 \times \frac{A_{\text{amostras}}}{A_{\text{STD}}} \text{ (mg/dL)}$$

4.2.4.2. Amônia

A amônia foi determinada pelo método de Nessler. Amostras de plasma (100µl) foram desproteinizadas em 1 mL de TCA a 20% (20 g de ácido tricloro acético solubilizado em 100 mL de água destilada) e centrifugadas a 12.000 RPM por 3 minutos. Alíquotas de sobrenadante foram submetidas aos ensaios colorimétricos pela adição do reativo Nessler (Imbralab), com incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. Seguiu então a leitura de absorvância a 420 nm, comparada com curva padrão de concentrações conhecidas de NH₄Cl (GENTZKOW & MASEN, 1942).

4.2.5. Atividade de glutathiona S-transferase (GST)

4.2.5.1. Preparação da fração citosol (solúvel)

Os tambaquis foram sacrificados por ruptura da coluna vertebral com uma faca de lâmina serrilhada. Seus fígados foram rapidamente retirados após abertura

ventral com tesoura, lavados em soro fisiológico e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

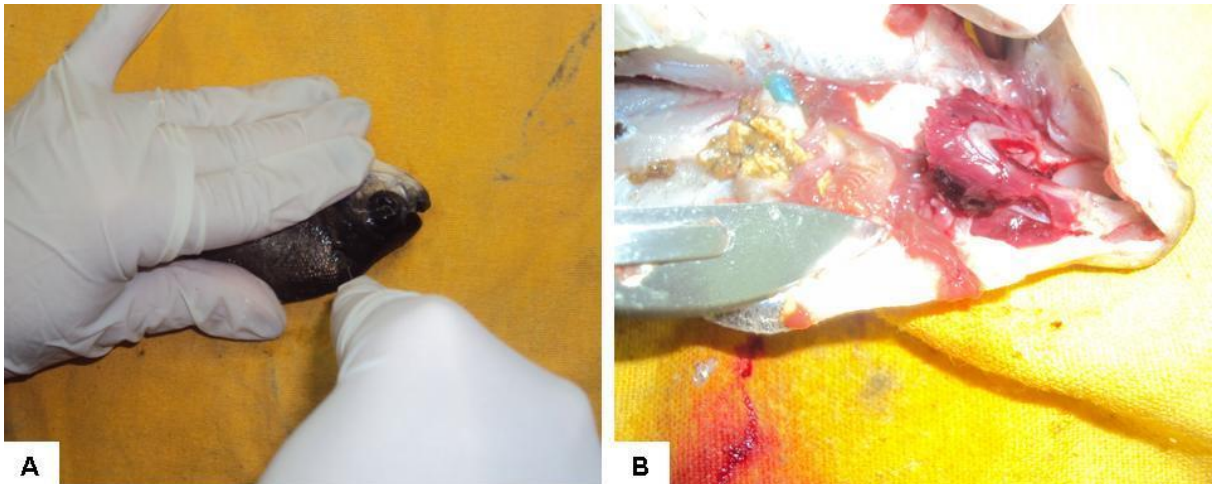


Figura 14 Sacrifício por secção medular (A) e Coleta do fígado (B).

Para o preparo da fração solúvel (Figura 15), os fígados foram descongelados imediatamente antes do uso, secos em papel de filtro, pesados e processados individualmente em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (POTTER, 1955) a 2.000 rpm por 2 min, a 4 °C, em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose. Foram usados 4 mL de tampão para cada 1 g de fígado. O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi submetido a 105.000 x g por 90 min a 4 °C. O novo sobrenadante, que chamamos fração solúvel celular (citosol) foi guardado no congelador a -20 °C até o momento do uso.

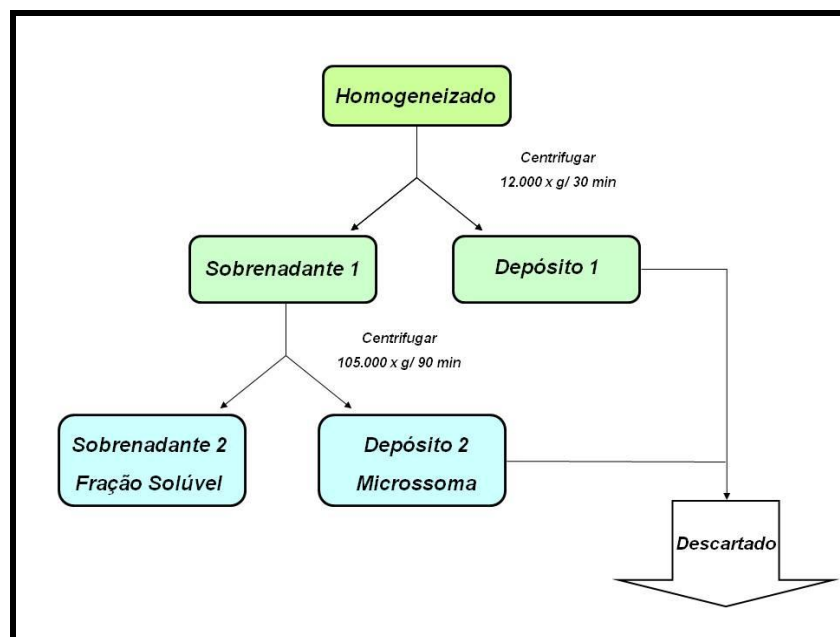


Figura 15 Esquema do preparo da fração solúvel.

4.2.5.2. Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas totais presente na fração solúvel foi determinada pelo método de Peterson (PETERSON, 1977), que é uma simplificação do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), usando o reativo de Folin-Ciocalteau. A soroalbumina bovina foi utilizada como proteína de referência.

4.2.5.3. Determinação das atividades de GST

Monitoramos espectrofotometricamente as concentrações dos conjugados de CDNB e GSH (atividade geral, com CDNB) à medida que apareciam no meio de reação. Para a medida da atividade adicionou-se ao meio reacional 3 µg de proteína da fração citosólica, 2 mM de cloro-dinitrobenzeno (CDNB) em etanol a 4% e 5 mM de glutathiona reduzida (GSH) em 0,1 M de tampão fosfato de potássio, pH 6,0. O aparecimento do conjugado foi continuamente registrado por 3 min a 340 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-160A. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de absorvidade para o CDNB de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HABIG e col., 1974).

4.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão. O método de Probit (FINNEY, 1971) foi usado para o cálculo dos valores da CL_{50} e dos respectivos intervalos de confiança 95% (IC-95%). O programa ToxRatPro[®] Version 2.07 foi utilizado para execução das análises de Probit e construção das curvas de dose-resposta.

Para testar a igualdade entre os tratamentos utilizaram-se os procedimentos de Análise de Variâncias. Os pressupostos de normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias foram verificados através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Nos casos em que foram aceitos ambos os pressupostos utilizou-se da ANOVA de Fisher e nos demais procedeu-se ANOVA de Kruskal-Wallis. O teste pos-hoc foi realizado pelo método de Tukey para comparação múltipla de médias. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Os parâmetros testados provenientes dos animais expostos às concentrações subletais de paration-metilica foram hemoglobina, hematócrito, eritrócito (RBC), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM),

Concentração Hematológica Corpuscular Média (CHCM), glicose, amônia, cloreto, sódio e potássio no sangue. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do software estatístico R (R Development Core Team, 2010). As estruturas gráficas foram elaboradas através da biblioteca Lattice, implementada no R (SARKAR, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos propósitos deste trabalho foi gerar dados de toxicidade inicial para avaliar o efeito do inseticida paration-metílica na piscicultura amazônica. Espécies como *Colossoma macropomum*, o tambaqui, foram usados como espécie-alvo para estudar que efeitos tóxicos em condições subletais o agrotóxico pode causar sobre o seu metabolismo.

Em relação à enorme diversidade de espécies e os tipos de água que constituem o ecossistema amazônico, a escolha do *Colossoma macropomum* se deu devido à espécie ser a mais trabalhada no ramo da piscicultura no estado do Amazonas.

Portanto, nesse estudo inicial, adaptamos as diretrizes internacionalmente aceitas para testes com pesticidas em condições aproximadas da realidade para águas utilizadas na piscicultura, verificando o tempo de exposição dos pesticidas e os efeitos ambientais sobre as variáveis de qualidade de água e as condições de estresse do animal.

5.1. Concentração letal aguda (CL_{50;96h}) do paration-metílica

Para a determinação da CL₅₀ no experimento 1, os exemplares de *Colossoma macropomum* foram expostos a 0, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 mg de paration-metílica/L de água por 96 horas obtendo valores de 50 e 100% de mortalidade.

De acordo com as mortalidades obtidas em cada uma das concentrações de paration-metílica, o valor da CL₅₀₋₉₆ horas no experimento 1 estimado pelo programa computacional ToxRatPro[®] foi de 1,456 mg de paration-metílica/L (Figura 16). Esta figura mostra além da CL₅₀₋₉₆ horas, os valores da CL₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas também determinados por este programa, o que permitiu a observação de que em 48 horas é possível se obter um resultado.

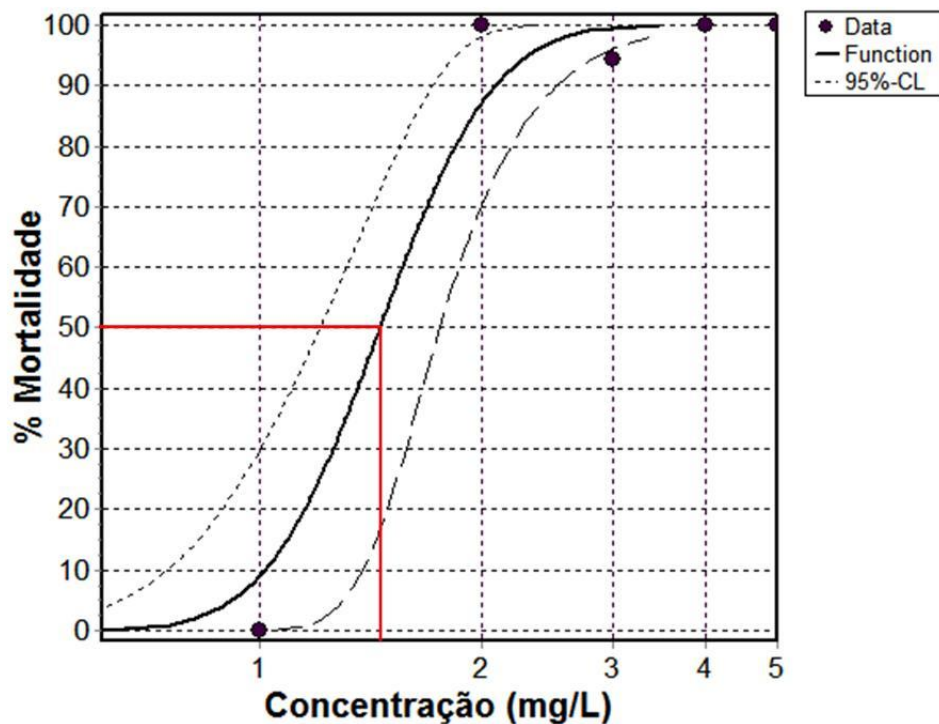


Figura 16 Curva da concentração-resposta obtidas a partir do testes de toxicidade efetuados com o paration-metílico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), por meio de análise do Probit, após 96 horas.

Tabela 1 Resultados da análise Probit do experimento 1: concentrações eficazes do ensaio e os intervalos de confiança 95% e 99%.

Parâmetros	EC 10	EC 20	EC 30	EC 50	EC 70	EC 90
Valor	1,019	1,152	1,259	1,456	1,684	2,081
Abaixo de 95% - CL	1,507	0,892	1,005	1,209	1,423	1,715
Acima de 95% - CL	3,176	1,489	1,578	1,754	1,993	2,525
Abaixo de 99% - CL	1,340	0,823	0,936	1,140	1,350	1,614
Acima de 99% - CL	3,571	1,614	1,693	1,859	2,101	2,683

Neste experimento realizado para determinar a CL_{50-96} horas do paration-metílico para *Colossoma macropomum* em concentrações foram de 4,0 e 5,0 mg/L observou-se a mortalidade de todos os indivíduos expostos no período de 24 horas. Nas primeiras 2 horas, os indivíduos expostos a estas condições apresentaram produção excessiva de muco, expansão do lábio inferior e natação errática.

As variáveis físico-químicas (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) da água foram analisadas diariamente no período experimental e outras variáveis como dureza, alcalinidade e amônia foram analisadas após a adição do paration-metílico na água.

Os valores de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e amônia na água (Tabela 2) mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis para a sobrevivência dos peixes (Resolução Conama 357/05), sem variações significativas, evitando, assim as mortalidades causadas por mudanças severas destes parâmetros.

Tabela 2 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 1 na determinação da CL₅₀₋₉₆ horas do paration-metílico.

	Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Temperatura (°C)
Parationa-metílico	Controle	6,7 ± 0,05	7,3 ± 0,04	28,0 ± 0,10
	1,00	6,6 ± 0,01	7,2 ± 0,03	27,9 ± 0,15
	2,00	6,9 ± 0,15	7,4 ± 0,05	27,9 ± 0,10
	3,00	6,7 ± 0,10	7,3 ± 0,11	27,9 ± 0,20
	4,00	6,8 ± 0,14	7,2 ± 0,18	27,9 ± 0,38
	5,00	6,8 ± 0,07	7,3 ± 0,15	27,9 ± 0,21
	Concentração (mg/L)	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Amônia (mg/L ⁻¹)
	Controle	22,3 ± 1,00	7,2 ± 0,55	2,8 ± 0,61
	1,00	21,5 ± 0,50	6,6 ± 0,00	2,5 ± 0,06
	2,00	22,4 ± 0,50	6,6 ± 1,10	2,6 ± 0,08
	3,00	22,4 ± 0,58	7,3 ± 1,68	2,6 ± 0,81
	4,00	22,3 ± 0,58	7,0 ± 0,64	2,4 ± 0,16
	5,00	22,5 ± 1,16	6,2 ± 1,68	2,1 ± 0,65

A alcalinidade total indica a presença de sais minerais e/ou outros minerais dissolvidos e para as águas de piscicultura, de acordo com Sipaúba Tavares (1994), a alcalinidade recomendada para o cultivo em viveiros deve estar acima de 20 mg. L⁻¹, e o ideal entre 200 a 300 mg.L⁻¹, pois um bom aporte de carbonato de cálcio mantém o equilíbrio entre bicarbonatos (HCO₃⁻) e gás carbônico livre (CO₂), mitigando as variações de pH. Águas com alcalinidade total inferior a 20 mg de CaCO₃/L apresentam reduzido poder tampão e podem apresentar significativas flutuações diárias nos valores de pH em função dos processos fotossintético e respiratório nos sistemas aquaculturais.

A dureza total representa a concentração de íons metálicos, principalmente os íons cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) presentes na água. A dureza total da água é expressa em equivalentes de CaCO₃ (mg de CaCO₃/L). Em águas naturais, os valores de dureza total geralmente se equiparam a alcalinidade total, ou seja, Ca²⁺ e Mg²⁺, praticamente se encontram associados aos íons bicarbonatos e carbonatos. No entanto, existem águas de alta alcalinidade e baixa dureza, nas quais partes dos íons bicarbonatos e carbonatos estão associados aos íons Na⁺ e K⁺ ao invés de

Ca^{2+} e Mg^{2+} . Em águas onde a dureza supera a alcalinidade, parte dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} se encontram associados a sulfatos, nitratos, cloretos e silicatos (CASTAGNOLLI, 1992). Os resultados não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos durante o período de bioensaio.

Baseado nos testes do Experimento 1, em que o valor da $\text{CL}_{50-96 \text{ horas}}$ estimado pelo programa computacional ToxRatPro[®] foi de 1,456 mg de paration-metílica/L, no Experimento 2 os exemplares de *Colossoma macropomum* foram expostos a 0, 1,00, 1,40, 1,96, 2,74 e 3,84 mg de paration-metílica/L de água por 96 horas obtendo valores de 0, 50 e 100% de mortalidade.

De acordo com as mortalidades obtidas em cada uma das concentrações de paration-metílica, o valor da $\text{CL}_{50-96 \text{ horas}}$ no experimento 2 estimado pelo programa computacional ToxRatPro[®] foi de 2,317 mg de paration-metílica/L (Figura 17). Esta figura mostra além da $\text{CL}_{50-96 \text{ horas}}$, os valores da CL_{50} para os períodos de 24, 48 e 72 horas também determinados por este programa, o que permitiu mostrar que em 48 horas ocorreu 100% de mortalidade na última concentração.

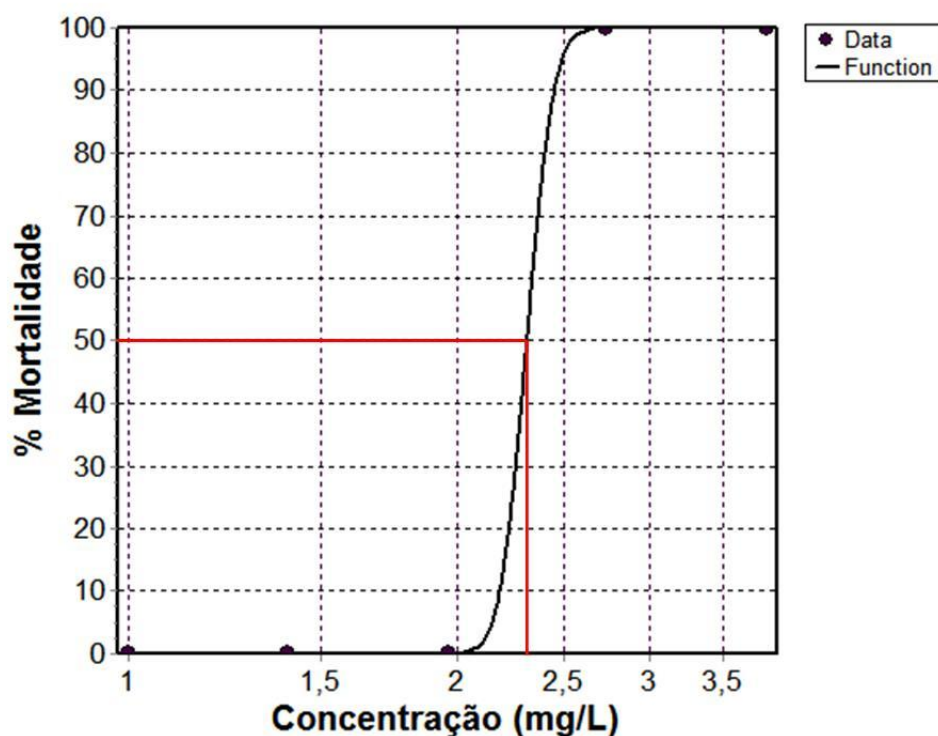


Figura 17 Curva da concentração-resposta obtidas a partir dos testes de toxicidade efetuados com o paration-metílica para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), por meio de análise do Probit, após 96 horas.

Tabela 3 Resultados da análise Probit do experimento 1: concentrações eficazes do ensaio e os intervalos de confiança 95% e 99%.

Parâmetros	EC 10	EC 20	EC 30	EC 50	EC 70	EC 90
Valor	2,188	2,231	2,264	2,317	2,373	2,455
Abaixo de 95% - CL	1,507	1,555	1,586	1,629	1,662	1,691
Acima de 95% - CL	3,176	3,203	3,231	3,297	3,387	3,564
Abaixo de 99% - CL	1,340	1,388	1,418	1,458	1,486	1,504
Acima de 99% - CL	3,571	3,588	3,614	3,683	3,788	4,007

Durante todos os tratamentos foram anotados os valores das variáveis físico-químicas de qualidade de água de cada tratamento, que não apresentaram variações significativas (Tabela 4), com exceção a amônia, que seus valores no Experimento 2 foram menores em relação ao Experimento 1, mais ainda assim não corresponderam os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução Conama 357/05.

Tabela 4 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 2 na determinação da CL₅₀₋₉₆ horas do paration-metilica.

	Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Temperatura (°C)
Parationa-metilica	Controle	6,9 ± 0,81	7,3 ± 0,04	27,2 ± 0,66
	1,00	6,6 ± 0,57	6,9 ± 0,03	27,3 ± 0,99
	1,40	6,9 ± 0,36	6,8 ± 0,05	28,0 ± 0,42
	1,96	6,3 ± 0,97	7,0 ± 0,11	28,1 ± 0,22
	2,74	6,7 ± 0,99	7,2 ± 0,18	27,2 ± 0,10
	3,84	6,7 ± 0,07	7,2 ± 0,10	27,2 ± 0,14
	Concentração (mg/L)	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Amônia (mg/L ⁻¹)
Controle	22,3 ± 1,00	7,7 ± 0,52	1,6 ± 0,10	
1,00	23,4 ± 0,60	6,6 ± 0,10	1,7 ± 0,12	
1,40	23,4 ± 0,50	6,5 ± 0,30	1,2 ± 0,05	
1,96	23,6 ± 0,47	7,6 ± 0,48	1,2 ± 0,04	
2,74	23,1 ± 0,47	7,1 ± 0,54	1,7 ± 0,12	
3,84	23,6 ± 1,00	6,6 ± 0,32	1,7 ± 0,10	

Baseado nos testes do Experimento 1 e 2, em que o valor da CL₅₀₋₉₆ horas estimado pelo programa computacional ToxRatPro[®] foi de 1,456 mg e 2,317 mg de paration-metilica/L, no Experimento 3 os exemplares de *Colossoma macropomum*

foram expostos a 0, 0,5, 0,70, 0,98, 1,37 e 1,92 mg de paration-metílica/L de água por 96 horas nas mesmas condições dos primeiros, compreendendo as faixas abaixo de 2,000 mg de paration-metílica/L de água, obtendo valores de 0,50 e 100% de mortalidade, respectivamente.

As concentrações de todos os tratamentos em todos os experimentos foram escolhidas com base nos resultados de uma faixa de concentração calculada aplicando um fator de espaçamento $\geq 2,2$ entre as concentrações (OECD, 1992b).

Durante todos os tratamentos foram anotados os valores dos parâmetros de qualidade de água de cada tratamento, que não apresentaram variações significativas (Tabela 5).

Tabela 5 Condições das variáveis de qualidade de água utilizada durante o experimento 3 em que o parationa-metilica foi exposto em concentrações subletais.

	Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Temperatura (°C)
Parationa-metílica	Controle	6,7 ± 0,04	6,3 ± 0,05	27,1 ± 0,99
	0,50	6,7 ± 0,45	6,9 ± 0,01	27,2 ± 0,70
	0,70	6,8 ± 0,31	6,8 ± 0,10	27,6 ± 0,32
	0,98	6,5 ± 0,02	6,0 ± 0,23	28,0 ± 0,10
	1,37	6,6 ± 0,79	6,2 ± 0,56	27,2 ± 0,10
	1,92	6,6 ± 0,03	6,2 ± 0,97	27,2 ± 0,05
	Concentração (mg/L)	Dureza (mg CaCO₃/L)	Alcalinidade (mg CaCO₃/L)	Amônia (mg/L⁻¹)
Parationa-metílica	Controle	22,5 ± 0,60	6,5 ± 0,03	1,4 ± 0,99
	0,50	22,4 ± 0,78	6,6 ± 0,12	1,8 ± 0,79
	0,70	22,6 ± 0,43	6,6 ± 0,05	1,7 ± 0,65
	0,98	22,9 ± 0,45	6,6 ± 0,37	1,3 ± 0,03
	1,37	22,6 ± 0,07	6,8 ± 0,27	1,5 ± 0,02
	1,92	23,4 ± 0,99	6,8 ± 0,23	1,8 ± 0,08

Não foram observadas mortalidades no grupo controle e exposto ao paration-metilica, revelando a resistência dos exemplares de *Colossoma macropomum* às concentrações trabalhadas consideradas então como concentrações subletais, ou seja, dose do paration-metilica que é mais próxima da dose que leva a morte.

Ao longo de todos os ensaios, a água temperatura média da água de 27,6 ± 0,4 °C, pH variaram de 6,0 a 7,4, os de oxigênio dissolvido variaram de 6,3 a 6,9 mg L⁻¹, a dureza foi de 22,7 ± 0,6 mg CaCO₃/L e alcalinidade de 6,7 ± 0,4 mg CaCO₃/L,

respectivamente. Com exceção da amônia, que variou de 1,2 a 2,8 mg/L⁻¹, todos os valores estavam dentro dos limites aceitáveis para a cultura de peixe como relatado anteriormente (BOYD, 1982).

A dureza total da água podem variar entre 10 e 250 mg por litro CaCO₃, e os valores pH entre 6,0 e 8.5 são preferíveis (OECD, 1992b).

O paration-metílico, mesmo na maior concentração utilizada, não alterou os parâmetros de qualidade da água. Natação letárgica na superfície da água e natação errática (natação, principalmente vertical) foram às principais mudanças comportamentais observadas em todo o Experimento 1, principalmente nos tratamentos com maiores concentrações do paration-metílico, verificou-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes causada pelo paration-metílico aumentou à medida que as doses dos inseticidas também aumentaram.

O uso de pesticidas em ambientes aquáticos é freqüente no Brasil e o paration-metílico é muito usado em aquicultura, principalmente no controle de parasitos (ALMEIDA *et al.*, 2005). Para Cruz (2008), o paration-metílico apresentou maior eficácia de controle do *Monogenea Dactylogyridae* que o Extrato Aquoso de Folhas Secas de Nim em pacus, sendo eficiente no tratamento com 7 mg/L nos tempos de 16 e 24 horas de exposição, com 96,2 e 97,0% de controle.

O paration-metílico [O, O-Dimethyl O-4-(nitrophenyl phosphorothioate)] é um inseticida e acaricida com ação de contato e ingestão, contendo em sua formulação 600 g/l de paration-metílico, que, em função de suas ótimas características inseticidas, é um dos mais usados no mundo, altamente tóxico (ANVISA, 2003). Sua formulação mais conhecida é o Mentox[®] 600 CE, Folisuper[®] 600 BR, Folidol[®] 600 e Bravik[®] 600 CE. É um inseticida organofosforado inibidor da acetilcolinesterase muito usado no controle de parasitos em peixes (AGUIAR *et al.*, 2004).

Os efeitos subletais de intoxicação mais comumente observados em peixes são alterações comportamentais, principalmente as que estão relacionadas ao padrão de natação (AGUIAR *et al.*, 2004), da grande demanda energética para suportar os processos de desintoxicação e reparos (RAO & RAO, 1981; HEATH, 1995) e/ou da diminuição da atividade metabólica em resposta ao agente estressor (WENDELAAR-BONGA, 1997).

Os valores a CL_{50-96h} calculados do paration-metílico em pacu aproxima-se de 3,97 mg/L para os alevinos e de 9,89 mg/L para os juvenis (CRUZ *et al.*, 2004), em

água mole foi de 4,06 mg/L e em água de represa foi de 5,15 mg/L (MATAQUEIRO, 2002).

Por outro lado, os valores de CL_{50-96h} ora calculados para o pacu foram inferiores aos 5,22 mg de paration-metílica para *Micropterus salmoides* e 8,9 mg/L para *Pimephales promelas* (POST, 1987) e de 10,0 mg/L para *Heteropneustes fossilis* (JAMES & SAMPATH, 1994).

Resultados obtidos de $CL_{50-24h} = 0,64$ ppm ($IC_{95\%} = 10,30 - 10,96$ ppm) de paration-metílica, foram encontrados em laboratório e determinado para *Poecilia reticulata* (Pisces Poeciliidae) observando as alterações comportamentais dos peixes em água contaminada e acompanhando as alterações físico-químicas do meio (FAVERO *et. al.*, 2005).

Artero (2008) definiu o *Dicrossus filamentosus* como a espécie mais sensível, seguido de *Corydoras pygmaeus* e *Colossoma macropomum*. Os valores de CL_{50-96h} variaram de 2,9 a 7,3 mg/L para espécies de peixes da Amazônia.

Portanto, esperava-se que seria necessário aumento na concentração do paration-metílica na água para se obter a $CL_{50-96hs}$ dos animais com peso entre 50 e 70 g. Por outro lado, BURRIDGE *et al.* (1999) verificaram que a larva de lagosta (*Homarus americanus*) é mais tolerante ao azametifós, com $CL_{50-48hs}$ de 3,57 mg/L, enquanto que para o adulto foi de 1,39 mg/L. Porém, o *P. mesopotamicus* com peso entre 1 e 2 g, considerado alevino, foi mais sensível ao paration-metílica do que os animais com peso entre 50 e 70 g (SANTOS, 2007).

5.2. Considerações analíticas para quantificação de paration-metilica

O método analítico para quantificação de paration-metílica desenvolvido neste estudo baseou-se na premissa da necessidade de se verificar o tempo de permanência do agrotóxico na água, já que o mesmo possui um tempo de degradação (meia-vida).

Analisando a Figura 18, verifica-se que os parâmetros cromatográficos utilizados para quantificação do parationa-metilica nos extratos das amostras de água, nos períodos de tempo em que se realizaram os testes, indicam a presença de paration-metílica em todos os tempos, exceto no controle.

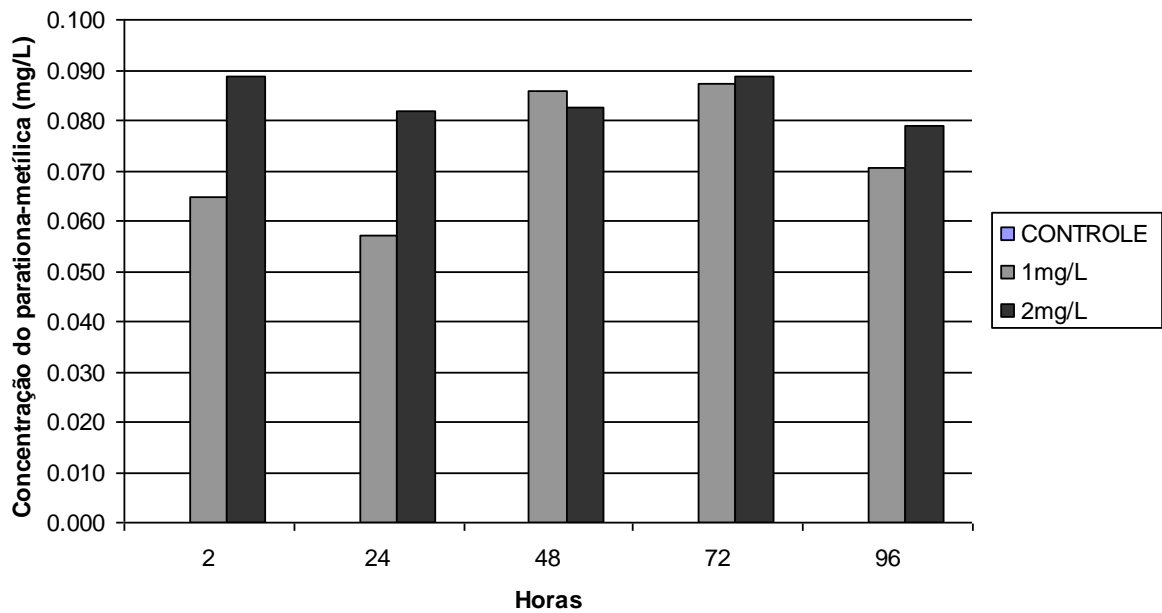


Figure 18 Quantificação do paration-metílca nos extratos das amostras de água.

O paration-metílca pode sofrer degradação oxidativa, para o metil menos estável paraoxon, na presença de radiação ultravioleta (UV) ou luz solar; filmes pulverizado degradam sob radiação UV com uma meia-vida de cerca de 40 horas. No entanto, a contribuição da fotólise para a perda total em um sistema aquático foi estimada em apenas 4%. Hidrólise do paration-metílca também ocorre, e mais rápida sob condições alcalinas (IPCS, 1992).

O conhecimento da meia-vida dos agrotóxicos é importante para prever seu impacto potencial no ambiente. Se um produto é muito tóxico, mas tem curta meia-vida, ele tem baixo potencial de causar impacto no ambiente porque sua degradação será rápida e pode ser influenciada por muitos fatores relacionados às condições ambientais, tais como: solo, clima (temperatura, umidade, luz solar) e atividade biológica (BARRIGOSSI *et al.*, 2005). Sua degradação nesses ambientes depende de diversas variáveis naturais, tais como: as características físico-químicas e biológicas da água (quantidade e “tipo” da matéria orgânica dissolvida, pH, presença de algumas espécies oxidantes e de microorganismos, entre outros) além das características climáticas da região (temperatura e intensidade da radiação solar, entre outros) (ARAÚJO, 2006). Com base nas características físico-químicas dos compostos é possível prever de maneira geral como o agrotóxico irá se comportar no ambiente (BARRIGOSSI *et al.*, 2005).

Segundo Araujo (2006), a radiação solar é um fator importante para a decomposição do paration-metílica em ambientes aquáticos, principalmente quando associado à presença da matéria orgânica dissolvida, pois em amostras com água ultra-pura expostas diretamente a radiação solar, houve um tempo de meia-vida de 16 dias. Experimentos realizados com água de lagoa mostraram que sob irradiação solar, a degradação do paration-metílica é de primeira ordem e mais rápida. Os tempos de meia-vida obtidos para o paration-metílica nas amostras expostas diretamente à radiação solar e não irradiadas foram de 4,41 e 6,48 dias, respectivamente. Experimentos realizados sem irradiação mostraram que o processo de hidrólise é responsável pela degradação de 32% do PM na água da lagoa esterilizada. O tempo de meia-vida estimado para o paration-metílica nessas amostras foi de 24 dias, mostrando a importância do processo de biodegradação e fotólise na degradação do pesticida. Foi detectada nas amostras expostas a radiação solar, a conversão do paration-metílica em paraoxon-metílica, um produto de degradação mais tóxico que o composto original. Enfim, se por um lado a fotólise diminui o tempo de meia-vida do paration-metílica, por outro, leva a formação de um composto mais tóxico, o que pode ser prejudicial ao ecossistema.

5.3.Efeitos das concentrações subletais do paration-metílica sobre o metabolismo do *Colossoma macropomum*

Não houve mortalidade no grupo controle e exposto ao paration-metílica. A diminuição do desempenho natatório foi observada em todos os animais expostos ao paration-metílica, os quais permaneceram imóveis nas caixas, distantes um dos outros e não apresentavam resposta à proximidade (não apresentavam resistência na coleta). Após o período de 96 horas do Experimento 3, foram escolhidos 3 indivíduos de cada tratamento, totalizando 36 indivíduos, onde foram realizadas punções caudais dos indivíduos. O sangue foi coletado por punção caudal, numa quantidade mínima de 1 ml. Os peixes utilizados nas punções sanguíneas foram sacrificados e submetidos a coleta de material biológico para análise da atividade da enzima glutathione S-transferase.

5.3.1. Parâmetros hematológicos

A tabela 7 mostra os valores médios e desvio padrão das variáveis hematológicas dos grupos controle e expostas às concentrações subletais de

paration-metilica (0, 0,5, 0,70, 0,98, 1,37 e 1,92 mg de paration-metilica/L por 96 horas).

Tabela 6 Valores médios e desvio padrão das variáveis hematológicas de *Colossoma macropomum* (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de paration-metilica durante 96 horas.

	Concentração do paration-metilica (mg/L)						p
	Controle	0,50	0,70	0,98	1,37	1,92	
Hemoglobina	8,00±0,34 ^d	8,24±0,20 ^b	7,74±0,18 ^b	7,48±0,18 ^b	8,36±0,10 ^{ab}	10,40±0,78 ^a	0,0197
Hematócrito	29,17±3,30 ^a	21,84±3,77 ^a	27,34±0,47 ^a	24,25±2,23 ^a	24,33±1,41 ^a	26,08±1,06 ^a	0,1579
Eritrócito	1,39±0,05 ^d	1,90±0,01 ^{cd}	3,29±0,18 ^a	2,20±0,00 ^{bc}	2,55±0,13 ^{bc}	2,72±0,37 ^{ab}	0,0001
VCM	221,37±17,64 ^a	90,87±8,51 ^c	69,78±0,38 ^c	102,01±7,10 ^c	89,64±0,59 ^c	156,62±1,63 ^b	0,0001
HCM	58,41±4,55 ^a	48,99±4,13 ^{ab}	20,89±1,63 ^c	29,10±4,85 ^c	35,79±3,71 ^{bc}	52,74±8,09 ^{ab}	0,0015
CHCM	26,34±0,04 ^b	51,58±10,26 ^a	28,08±0,14 ^b	30,04±5,27 ^b	37,75±1,78 ^{ab}	42,06±1,38 ^{ab}	0,0116

* Valores são médias ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

Os valores de hemoglobina observados nos exemplares de *Colossoma macropomum* apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05), e o mesmo foi observado para os valores de eritrócitos (RBC) (p< 0,05), em face do valor médio de 2,34 eritrócitos/mm³. A Hemoglobina apresentou valores mais elevados no grupo que recebeu a maior dosagem de paration-metilica e os eritrócitos mostraram-se mais elevados nos grupos que receberam 0,70, 0,98 e 1,37 mg de paration-metilica/L. Não houve diferença estatística na percentagem de hematócritos (Ht) em nenhum tratamento, tendo como média 25,5 ± 2,6 e amplitude de variação de 14,0 – 32,5% de eritrócitos no sangue (p>0,05) (Ver figura 19).

Os índices hematimétricos VCM, HCM, e CHCM revelaram diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05). O VCM apresentou-se mais elevado no grupo controle e no grupo que recebeu a maior dosagem de agrotóxico. O HCM apresentou maiores valores no grupo controle e nos grupos que receberam 0,50 e 1,92 mg/L de paration-metilica. CHCM apresentaram valores mais elevados no grupo que recebeu a menor dosagem de agrotóxico (Ver figura 20).

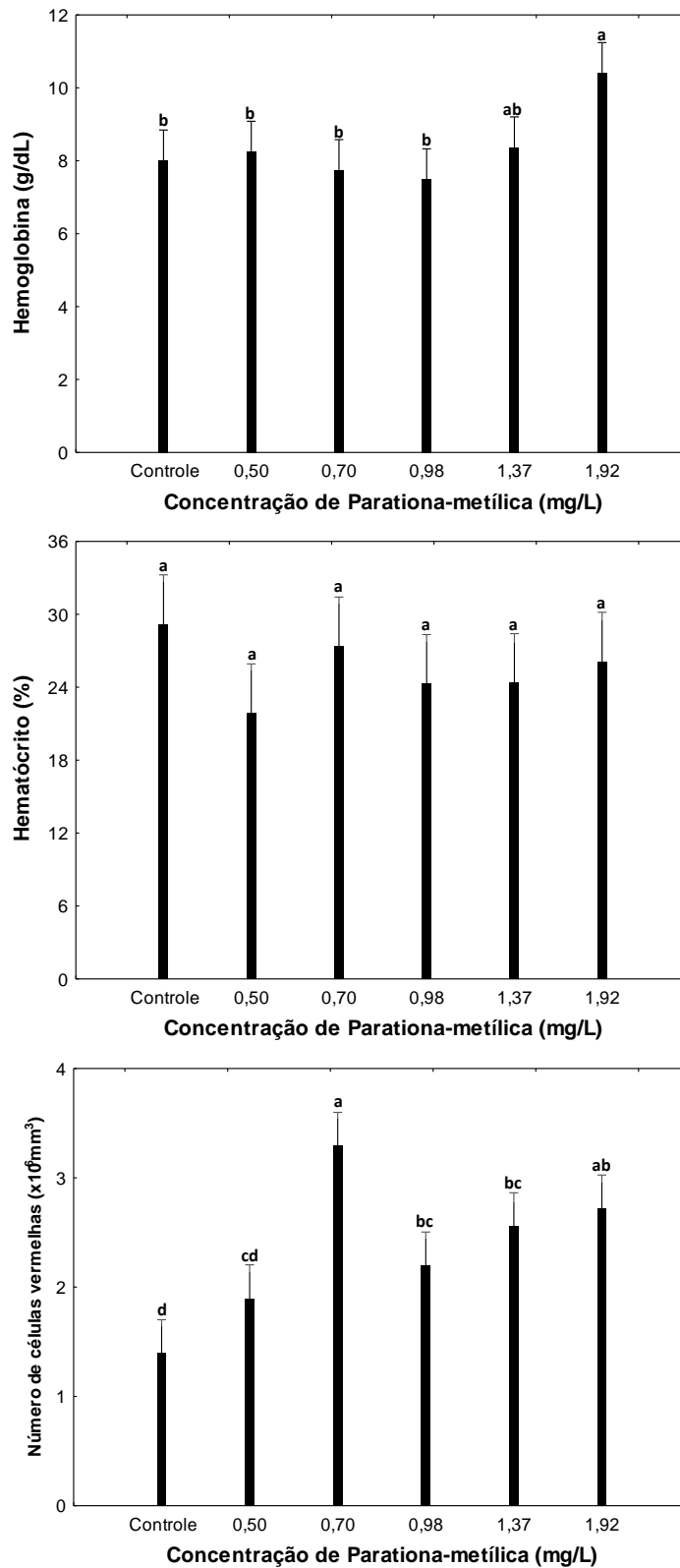


Figura 19 (A) Concentração de Hemoglobina ([Hb]); (B) Hematócrito (Ht); (C) Número de Eritrócitos (RBC) no sangue de exemplares de *Colossoma macropomum* (n=3 cada grupo) do grupo controle e expostos a concentrações subletais de paration-metilica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

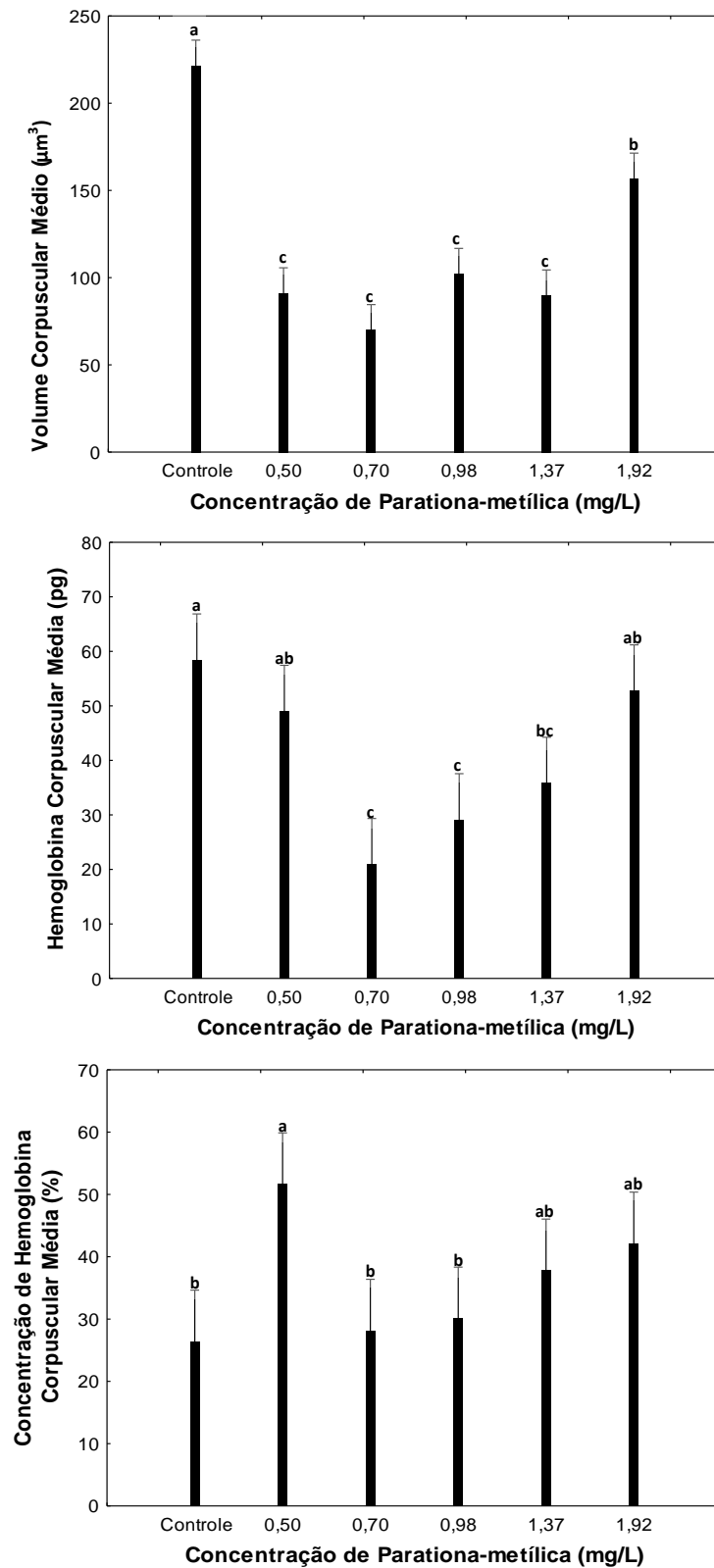


Figura 20 (A) Volume Corpuscular Médio (VCM); (B) Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); (C) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de paration-metilica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

A exposição a poluentes químicos pode induzir alterações (aumento ou decréscimo) nos parâmetros hematológicos (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). A ausência de mortalidade de *C. macropomum* durante a exposição ao paration-metilica confirma que as concentrações trabalhadas foram subletais para a mesma. Barreto (2006), afirma que para o *Brycon amazonicus* valores das variáveis hematológicas dos animais expostos a 2ppm de paration-metilica durante 96 horas foram ligeiramente altos do que no grupo controle, porém o aumento não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), não havendo alterações nas variáveis sanguíneas nem nos índices hematimétricos, sendo a concentração total de hemoglobina foi de $9,81 \pm 1,34$ g/dL, o número de eritrócitos (RBC) foi de $2,59 \pm 0,15 \times 10^6$ células por mm^3 e o hematócrito correspondeu $39,42 \pm 2,4\%$,

Aguiar *et al.*, (2000) estudaram os efeitos das concentrações de paration-metilica (0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 mg/L) sobre *Brycon amazonicus* com 4 horas de reposição. Verificaram que os parâmetros hematológicos foram relacionados à resposta de estresse, com elevações dos valores de hematócrito e hemoglobina nas menores concentrações (0,5 e 1,0). De acordo Heath (1995), esta resposta provavelmente ocorre devido a danos tecidos branquiais, produzindo hipóxia interna e estímulo da eritropoiese.

Testes foram realizados para uma estimativa da concentração letal média (CL_{50}) do Roundup® para tabaqui nas seguintes concentrações: zero, 60, 70, 80, 90 e 120 mg/L, mantendo-se as densidades de estocagem abaixo de 1,5 g/L, estatisticamente, os resultados mostraram que os níveis de hemoglobina não apresentaram valores diferentes dos níveis do grupo controle, mostrando valores médios de $6,46 \pm 0,95$ g% em peixes não estressados. Não houve variação significativa na percentagem de hematócrito (Ht) em nenhum tratamento, tendo como média $23 \pm 2,63$. O número de eritrócitos (RBC) não expressou valores significativamente diferentes durante o experimento, apresentando valor médio de $1,44 \pm 0,32$ eritrócitos/ mm^3 . Os índices hematimétricos VCM, HCM, e CHCM também não revelaram diferença estatística em relação aos peixes não estressados (PORTO, 2005).

Por sua vez, aumento significativo nos valores de Hb com $11,01 \pm 0,37$ g/dL foi observado nos tabaquis expostos à concentração de 300 mg L^{-1} de mebendazol empregado no controle de monogenóides, em concentrações de até 600 mg L^{-1} após 120 minutos. Essa variação intra-específica na hemoglobina também foi observada

por Tavares-Dias & Mataqueiro (2004) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em decorrência dos elevados valores do coeficiente de variação da hemoglobina, normalmente registrados em peixes sob uma mesma condição ambiental. Apesar dessa variação, relatada para hemoglobina, na concentração de 300 mg L⁻¹ de mebendazol, os valores deste indicador e dos demais parâmetros hematológicos analisados foram similares aos verificados em tambaquis cultivados e outras 25 espécies de peixes da Bacia Amazônica (MARCON *et al.*, 1999; CHAGAS *et al.*, 2003), em pacu do Pantanal (TAVARES-DIAS & MATAQUEIRO, 2004).

Ranzani-Paiva *et al.* (1999) encontrou valores *Colossoma macropomum* semelhantes aos valores aqui apresentados, para indivíduos de 2 anos e 6 meses os valores aqui apresentados, com exceção do número de eritrócitos que para os animais deste trabalho foram superiores. As diferenças ocorridas entre os valores de espécie, idade e local quanto à série vermelha podem ser interpretadas como variações naturais e específicas.

A destruição de eritrócitos resulta em hipóxia que é uma causa comum de lesões e danos celulares podendo gerar mudanças comportamentais associados à intoxicação por praguicidas (CARNEIRO *et al.*, 2007).

5.3.2. Parâmetros Iônicos

Conforme a Tabela 8, as concentrações dos íons K⁺, Na⁺ e Cl⁻ do plasma dos exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos as concentrações subletais de paration-metilica (0, 0,5, 0,70, 0,98, 1,37 e 1,92 mg de paration-metilica/L por 96 horas), observados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). A concentração plasmática de potássio variou transitoriamente nos peixes expostos a 0,5, 0,70 e 0,98 mg de paration-metilica/L por 96 horas, com um aumento da concentração plasmática deste íon em relação ao respectivo grupo controle. Para os íons sódio e cloreto, observou-se igualmente uma redução transitória da concentração plasmática deste íon nos peixes expostos ao paration-metilica durante 96h, em relação ao grupo controle (Ver figura 21).

Tabela 7 Valores médios e desvio padrão dos parâmetros iônicos do plasma do sangue de *Colossoma macropomum* (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de paration-metílica durante 96 horas.

	Concentração do paration-metílica (mg/L)						P
	Controle	0,50	0,70	0,98	1,37	1,92	
Potássio [K ⁺]	139,44±2 ^a	156,49±33 ^a	153,07±11 ^a	141,11±10 ^a	136,41±22 ^a	116,55±3 ^a	0,3672
Sódio [Na ⁺]	157,78±2 ^a	141,54±5 ^a	151,50±5 ^a	147,21±2 ^a	146,14±4 ^a	152,27±4 ^a	>0,050
Cloreto [Cl ⁻]	235,00±2,8 ^d	151,84±1,6 ^a	173,50±19,1 ^a	183,34±9,4 ^a	205,00±49,5 ^a	191,5±2,1 ^a	0,089

* Valores são médias ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

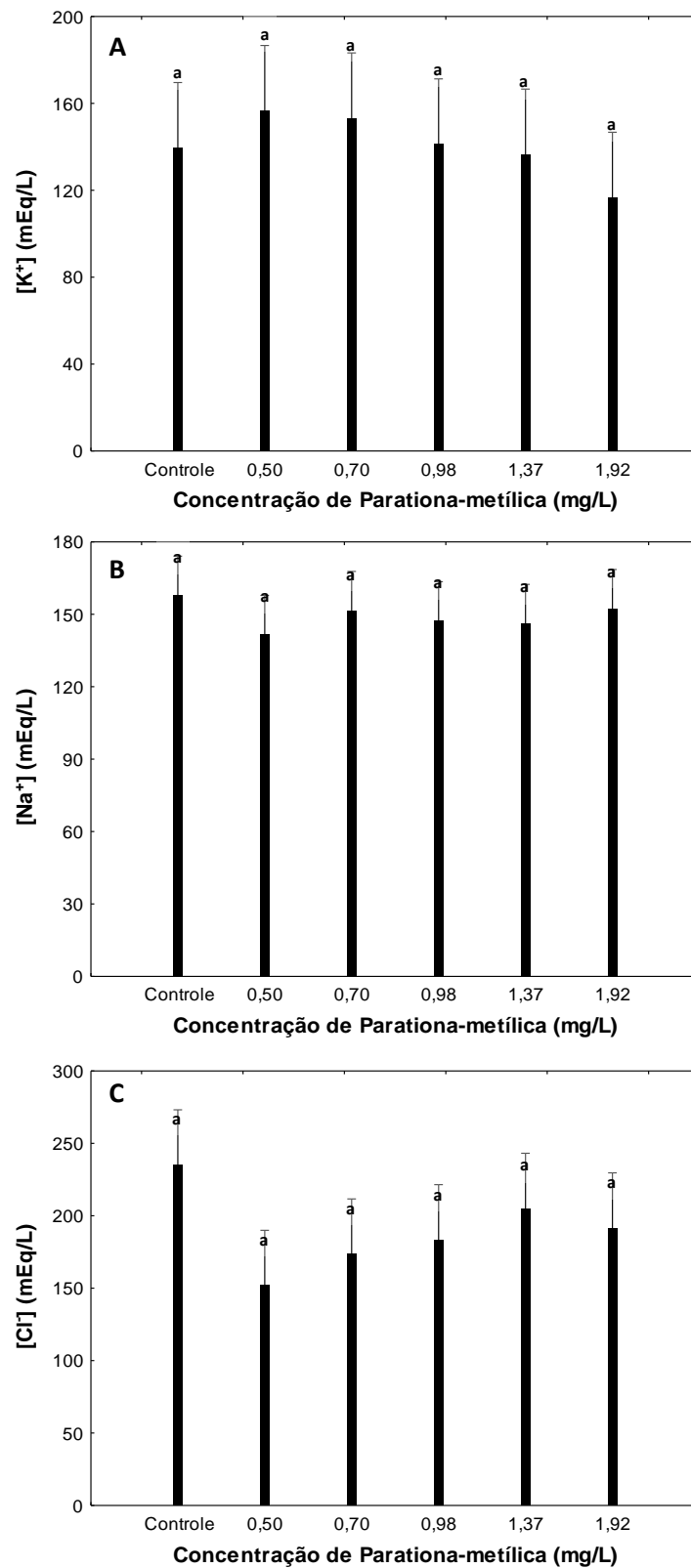


Figura 21 (A) Potássio [K⁺]; (B) Sódio [Na⁺]; (C) Cloreto [Cl⁻] plasmático no sangue de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de paration-metilica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

As reações dos peixes em resposta a mudanças no ecossistema são desencadeadas de forma que o indivíduo sempre busque o retorno da homeostase através da fuga ou, caso essa não seja possível, por meio de ajustes e adaptações fisiológicas que demandam energia extra, cujas fontes são diversas. O aumento da circulação dos peixes, associado ao aumento dos batimentos operculares resulta em claras mudanças da capacidade de trocas através de difusões nas brânquias (MOMMSEN *et al.*, 1999). Alterações morfológicas induzidas por xenobióticos nas brânquias dos peixes, em geral, correspondem a dois tipos de respostas: defesa (respostas inflamatórias) e compensatória (secreção de muco) (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002). A introdução lenta e contínua nas lamelas de uma substância, leva ao conseqüente aumento da permeabilidade do epitélio branquial, que possibilita a perda de íons sódio e cloreto do sangue para o meio externo, no caso de peixes de água doce (CYRINO *et al.*, 2004).

Forte desbalanço eletrolítico é evidenciado por teores plasmáticos alterados de K^+ , Na^+ e Cl^- . Significativo desbalanço da excreção nitrogenada dos peixes pode ser também evidenciado pelo aumento de amônia plasmática (MCDONALD & MILLIAN, 1997).

Esse balanço pode ser afetado pela ação de um poluente em órgãos envolvidos na osmorregulação, no sistema endócrino, no metabolismo ou nos processos de transporte ativo (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Nesse trabalho, as concentrações plasmáticas de cloreto foram similares às anteriormente descritas para *Prochilodus lineatus* (LANGIANO, 2006). No grupo exposto a 7,5 ppm de Roundup[®] por 24h houve uma diminuição da concentração de Na^+ plasmático, sem, contudo, ocorrer alterações na osmolaridade do plasma e na concentração de cloreto (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

5.3.3. Avaliação de Estresse

As concentrações de glicose e amônia do plasma não apresentaram elevações em resposta ao manuseio imposto aos peixes. Com relação ao paration-metílico, o tambaqui não apresentou resposta glicêmica e da amônia plasmática de maneira adicional, ou seja, devido às condições subletais as quais os peixes foram submetidos por 96 horas, não apresentaram diferenças significantes entre os tratamentos ($p > 0,05$), conforme mostra a Tabela 9, apresentaram-se semelhantes entre todos os tratamentos (Figura 22).

Tabela 8 Valores médios e desvio padrão das concentrações de glicose e amônia plasmáticas de *Colossoma macropomum* (n=3 cada grupo) dos grupos controle e expostos as concentrações subletais de paration-metílica durante 96 horas.

	Concentração do parationa-metílica (mg/L)						p
	Controle	0,50	0,70	0,98	1,37	1,92	
Glicose	93,61±17,1 ^a	85,08±10,1 ^a	90,48±0,2 ^a	91,23±14,2 ^a	86,41±17,1 ^a	92,33±3,9 ^a	>0,050
Amônia	157,43±21,0 ^a	142,30±34,8 ^a	120,99±12,0 ^a	133,00±2,5 ^a	129,51±6,2 ^a	137,65±2,3 ^a	0,4858

* Valores são médias ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

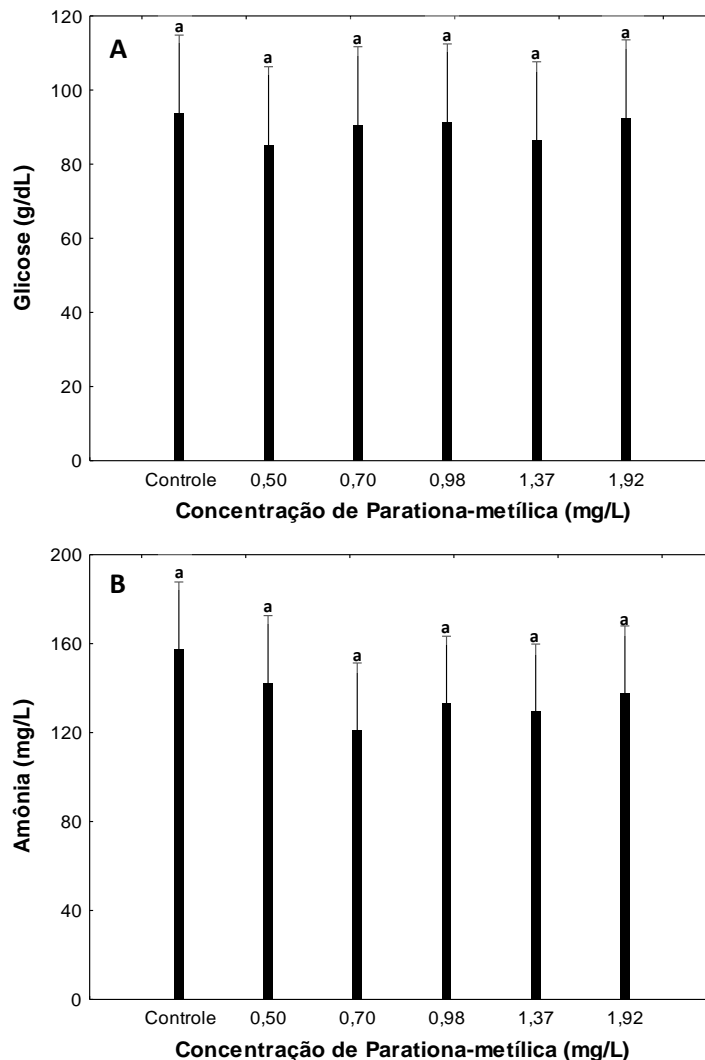


Figura 22 (A) Níveis de Glicose e (B) Níveis de Amônia no plasma de exemplares de *Colossoma macropomum* do grupo controle e expostos a concentrações subletais de paration-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

A glicose plasmática, que desempenha importante papel no metabolismo dos peixes, é um dos indicadores mais utilizados, juntamente com o cortisol, para diagnosticar a ocorrência de estresse fisiológico (WEDEMEYER *et al.*, 1990).

E embora os resultados não tenham apresentado diferença significativa entre os tratamentos, e os tambaquis tenham apresentado certa tolerância ao paration-metílico em relação ao grupo controle, no presente estudo o parâmetro glicose indicou presença de estresse, pois segundo Porto (2005), tambaquis não estressados possuem valores de glicose em torno de $28,67 \pm 10,23$ mg/dL, com uma amplitude de variação de 13 – 45 mg/dL.

Essa situação indica que o estresse causado pela exposição subletal ao paration-metílico não foi suficiente para ativar o metabolismo anaeróbico. Esse resultado condiz com os observados para os parâmetros hematológicos desses indivíduos estudados.

Práticas de manejo podem ser agentes estressores agudos da piscicultura, pois rompem o equilíbrio dos animais com o ambiente (homeostase), iniciando o estresse, que é o conjunto das reações metabólicas em resposta a um ou mais estímulos adversos do ambiente ou imposto pelo produtor rural com fins de operacionalização dos sistemas de produção. O estresse, quando em intensidade e duração excessiva, pode resultar em conseqüências indesejáveis no cultivo como a manifestação de doenças em toda a população e também na morte de animais (IWAMA *et al.*, 2004).

De acordo com Boyd (1996), o principal mecanismo de excreção da amônia é através de fluxo passivo, onde a amônia passa do sangue circulante, nos capilares branquiais para a água. Porém, quando os níveis de amônia estão altos, ocorre troca dos íons amônio (NH_4^+) por íons sódio, elevando a concentração de sódio e mantendo constante a concentração de amônia no sangue. Este fato ocorre sob condições de pH entre 7 e 8. No caso da adição de sal (cloreto de sódio) na água, aumenta a disponibilidade de sódio e pode favorecer a excreção ativa de amônia (MOYLE & CECH, 1988).

5.3.4. Avaliação da enzima glutatona-S-transferase (GST)

A GST é uma enzima de fase II no metabolismo de detoxificação, ela é responsável pela ligação da glutatona a xenobióticos e seus metabólitos (ALMAR *et al.*, 1998). De acordo com os nossos resultados, decorrentes da exposição do

tambaqui (*Colossoma macropomum*) à concentrações subletais de paration-metílica durante 96 horas, foi significativo para a atividade da GST entre os tratamentos ($p < 0,0133$), pois os tambaquis expostos acima de 0,70 mg/L de paration-metílica mostram atividades pouco mais elevadas em relação ao grupo controle, conforme mostra a Figura 23.

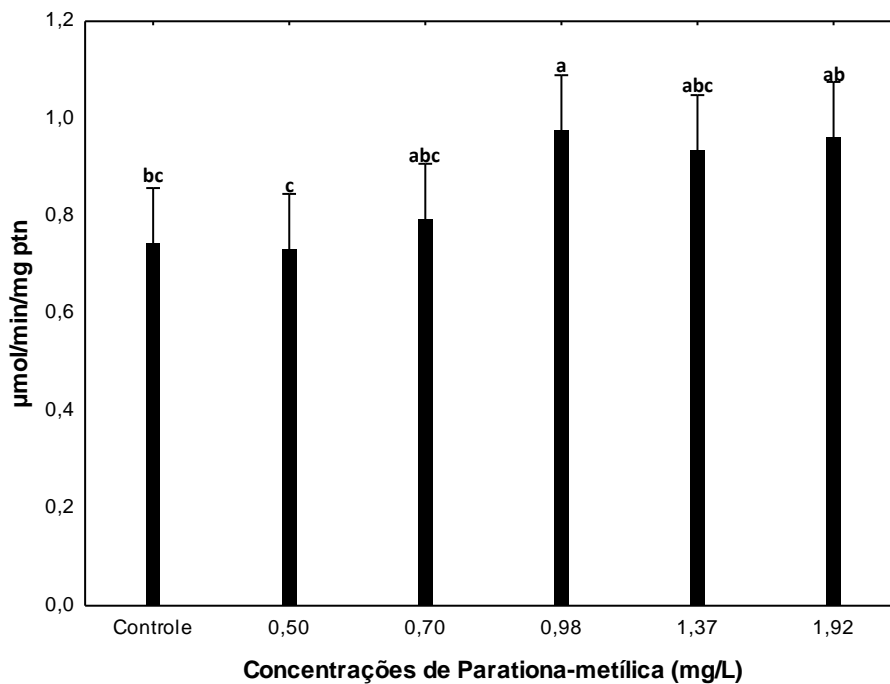


Figura 23 Atividade geral das GST (Glutathione S-Transferase) com cloro-dinitrobenzeno (CDNB) no fígado de tambaqui *Colossoma macropomum*, expostos a concentrações subletais de paration-metílica no período de 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Resultado similar foi encontrado por Monteiro (2006), em que a exposição *Brycon amazonicus* a 2 ppm da formulação comercial do PM (Folisuper 600 BR, parationa-metílica 600 g.L⁻¹) nas atividades de glutathione S-transferase (GST), induziu um aumento significativo na atividade da GST em todos os tecidos de fígado alcançando a média de $120 \pm 0,01 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. É digno de nota que em fração solúvel de fígados de pacus adultos os valores de GST-CDNB alcançaram a média de $0,6 \pm 0,03 \text{ micromol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prote\u00ednas}$ da fração citosol nos mesmos níveis das frações citosol dos tambaquis utilizados neste trabalho. As alterações no metabolismo do tecido hepático pode estar associado à demanda de energia para o metabolismo.

A glutathione atua direta e indiretamente em processos biológicos como mecanismos de proteção celular (MEISTER *et al.*, 1983). Problemas na síntese e

metabolismo da glutathione estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis desse tripeptídeo e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DENEKE & FANBURG, 1989). Mudanças na concentração desses tripeptídeo pode indicar desordens fisiológicas causadas pela administração de algumas drogas oxidantes (HALL & MALIA, 1986).

Esses autores mostraram que a exposição a compostos xenobióticos induz a expressão do gene *cyp1a* e aumenta a atividade da EROD em peixes, sugerindo o uso desse sistema enzimático como biomarcador em estudos de monitoramento de poluição dos ambientes aquáticos. No entanto, estudos sobre os processos de detoxificação (fase II) são menos pronunciados que os da fase I, necessitando assim, análise adicional acerca da utilização da enzima glutathione S-transferases (GST) como biomarcador de contaminação ambiental, o que complementará os resultados observados nas reações da fase I.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à complexidade do processo de degradação dos pesticidas em ambientes aquáticos naturais, a estratégia utilizada no presente trabalho foi verificar se em condições subletais, se o paration-metílico pode ser agressivo ao metabolismo do tambaqui.

1. A aparência e o comportamento dos peixes contaminados por 96 horas apresentaram-se sinais de ansiedade, movimentos descoordenados, respiração superficial e habitação no fundo das caixas d'água, e alterações na atividade natatória;
2. A toxicidade do paration-metílico apresentou-se menor (CL_{50-96h} de 1,456 mg/L e 2,317 mg/L) em comparação ao encontrado por Artero (2008) cujos valores CL_{50-96h} variaram de 2,9 a 7,3 mg/L para espécies de peixes da Amazônia.
3. No teste realizado para verificação da persistência do paration-metílico, admite-se que o próprio foi persistente na água, sendo detectado durante todos os períodos amostrados.
4. A exposição de *Colossoma macropomum* as concentrações subletais de paration-metílico causou distúrbios nos parâmetros hematológicos e iônicos.
5. Apesar de todos os nocivos causados aos exemplares de *Colossoma macropomum* expostos, as concentrações subletais de paration-metílico não foram capazes de causar alterações sobre os níveis de glicose e amônia.
6. No nível bioquímico observou-se a ativação das vias de biotransformação de xenobióticos, constatado pelo aumento da atividade da GST. Esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos.

Peixes em condições de estresse sofrem alterações dos parâmetros respiratórios e cardíacos. Assim, é esperado que as taxas de passagem de água e sangue pelas brânquias fiquem alteradas, podendo dificultar a excreção de compostos nitrogenados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda - Método de ensaio com peixes. Norma ABNT – NBR 15088. 19p. 2004b.

AGUIAR, L.H.; MORAES, G. Hepatic alanine and aspartic amino transferases of the freshwater teleost. *Brycon cephalus* (Matrinxã) exposed to the organophosphorous methyl parathion (Folidol 600 registred). Fish Response-tootoxic- environments Kennedy, Canadá, p.145 – 152, 1999.

AGUIAR, L. H.; CORREA, C. F.; MORAES, C. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600) sobre o metabolismo e atividade de colinesterase do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (Matrinxã). In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; ROCHA, O; BOHER, M. B. C.; OLIVEIRA-NETO, A. L. Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI. RiMa. São Carlos, 2000. 575p.

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

ALMAR, M.; OTERO, L.; SANTOS, C.; GALLEGRO, J. G. Liver glutathiona content and glutathiona-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. J. Environ.Sci.Health, B33: 769-783. 1998.

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

ANDERSON, D. P. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. Am. Fish. Coc. Symp. v.8, p.38-50. 1990.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Distribuição de resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras entre julho de 2001 e dezembro 2002. Brasília, 172p. 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater. 14 ed. New York, 1985

ARAUJO, T. M. R. Degradação do paration metílico em ambientes Aquáticos naturais. 2006. 119f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais). Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro.

ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, p.67-104, 2005.

ARAUJO-LIMA, C. A.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamiraua. Brasília- CNPq. Tefé, Amazonas, 1998. 186p.

ARTERO, A. R. Effect of pesticides on freshwater ecosystems in the Amazon: A comparison of sensitivity with temperate data. 2008. 143f. Dissertação (Mestrado). Wageningen University and Research Centre Aquatic Ecology and Water Quality Management Group.

AZEVEDO, F. A.; LIMA, I. V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. (Eds.). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos, RiMa, p.27-89. 2003.

BABBITT, P. C. Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. Proceeding National Academy Sciences, Washington, v. 97, n. 19, p. 10293-10300, 2000.

BARNETT, C. W.; PANKHURST, N. W. The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162:313-329. 1998.

BARRETO, T. R. Alterações morfofuncionais e metabólicas no Teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®). 2006. 92f. Dissertação. Pos-graduação em Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade de São Carlos. São Paulo.

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D.; GOLDSTEIN, B.D. 12th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, 105: 699–737. 1997.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente. Circular Técnica 74 – EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás, GO. Dezembro, 2005. ISSN 1678-9636.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis*, p. 13-26, 1991.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adams (ed.). *Biological indicator*

of aquatic ecosystem stress, Bethesda, Maryland, American Fisheries Society, p.289-320, 2002.

BATISTA, V. S.; PETRERE JR., M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. *Acta Amazonica*, 33(1): 53-65, 2003.

BOYD, C. E.; MASSAUT, L. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 20:113-132, 1999.

BOYD, C.E. Water quality in ponds for aquaculture. Auburn: Auburn University, 1996. 482 p.

BOYD, C.E. Water management for pond fish culture. Elsevier Scientific Publications, Amsterdam, *Development of aquaculture and fisheries science*, v.9, 231 p. 1982.

BRENDOLAN, R. A.; SOARES-GOMES, A. Uso do psamobentos em estudos de ecotoxicologia marinha no Brasil: revisão bibliográfica com ênfase em substâncias de petróleo. Segundo Congresso brasileiro de Petróleo e Gás. Rio de Janeiro. Livro de Resumos: 152p. 2003.

BROW, B. A. Hematology: principles and procedures. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1976. 504p.

BURRIDGE, L. E.; HAYA, K.; ZITKO, V.; WADDY, S. L. The lethality of Salmosan (azamethiphos) to American lobster (*Homarus americanus*) larvae, postlarvae and adults. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43, p.165–169, 1999.

CAMPOS, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aqüicultura no Brasil – Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e risco para os consumidores. *Panor. Aquic.*, Jan/Fev. 2005.

CAPOBIANO, H. L.V.; CARDEAL, Z. L. A Solid-Phase Microextraction Method for the Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticides in Fish, Water, Potatoes, Guava and Coffee. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(5), p.907-914, 2005.

CARNEIRO, G.; RIBEIRO FILHO, F. F.; TOGEIRO, S. M.; TUFIK, S.; ZANELLA, M. T. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 51 (7), p. 1035-1040, 2007.

CASARETT, L. I.; DOULL, J. Toxicology, The basic science of poisons. 17ª Ed. Kansas City: Curtis D. Klaassen, 2008.

CAVERO, B. A. S.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; CRESCÊNCIO, R. Efeito da densidade de estocagem sobre a eficiência alimentar de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 33, n. 4, p. 631-635, 2003.

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura de Água Doce. FUNEP/UNESP "campus" de Jaboticabal, SP. 1992.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. Dicas em Piscicultura. Botucatu: Santana, 2000. 247 p.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.52, p. 83-91. 2002.

CHAGAS, E. C.; LOURENÇO, J. N. P.; GOMES, L. C.; VAL, A. L. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2003, Goiânia. Anais. Jaboticabal: Aquabio, 2003. p.83-93.

CHAPADENSE, P. F. C.; CASTRO, F. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.2, p.398-405. 2009.

CHOPIN, F. S.; ARIMOTO, T.; INOUE, Y. A comparison of the stress response and mortality of sea bream *Pagrus major* captured by hook and line and trammel net. *Fish. Res.*, 28: 277-289. 1996.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Ass. Jour.* 50: 550-552. 1944.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005. Acesso em: 15 Mai, 2009.

CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas neem (*Azadirachta indica*) para o alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.* 14: 93-102. 2004.

CRUZ, C. Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae. 2005. 81f. Tese (Doutorado) (Aquicultura de Águas Continentais) - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CRUZ, C. da; MACHADO NETO, J. G.; YUDI FUJIMOTO, R.; DUÓ, D. A eficácia do paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (MONOGENOIDEA) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), B. Inst. Pesca, São Paulo, 34(1): 61 - 69, 2008.

CYRINO, J. E. P.; URBINATTI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos Especiais em Piscicultura de água doce Tropical Intensiva. São Paulo. TecArt, 2004. 533p.

DENEKE S.M.; FANBURG B.L. Regulation of cellular glutathione. Am. J. Physiol., 257, L163–L173. 1989.

DOOG, R.; LIAO, P. Determination of organochlorine pesticides and their metabolitsoil samples using headspace solid-phase microextraction. J. Chromatogr., A 918, p.177-188. 2001.

DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. American Journal of Medical Science, 215: 110-111. 1948.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, p. 88–95. 1961.

FAVERO, S.; MARMO DE SOUZA, E.; MATIAS. R. Ecotoxicidade do paration metílico e glifosato para *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae) em laboratório. Ensaios e Ciência, v.9, n.2, p.315-324, agosto. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Brasil. 2005.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology, v.205, n.3, p.223-240. 2004.

FIGUEIREDO, G. M.; SENHORINI, J. A. Influência de Biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1958) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura. Boletim Técnico do CEPTA P. Pirassununga 3:5-21. 1990.

FINNEY, D. J. Probit analysis. 3th ed. London: Cambridge University Press. 30pp. 1971.

FRAGA, A. S. Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados. 55f. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-Graduação em Biociências.

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

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. Testes de toxicidade de efluentes industriais. *Ambiente: Revista CETESB de Tecnologia*. v. 2, n. 1, p. 033-038, 1988.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An important Amazonian foodfish. *Revista Brasileira de Zoologia*, Viçosa,1(1), p. 107-138, 1982.

GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P. Metabolismo de xenobióticos: citocromo P-450. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Eds.). *Genética toxicológica*. Porto Alegre, Alcance, 2003. p.225-243. HABIG e col., 1974

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione Stransferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Review Biochemistry Molecular Biology*, [S.l.], v. 30, p. 445-600, 1995.

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

HONTELA, A. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.*, 1: 1-46. 1997.

HOWE, G. E.; MAKING, L. L.; BILLS, T. D.; RACH, J. J.; MAYER JR., F. L. Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 51-66, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília - SP, 1987, 128p.

INOUE, L. A. K. A. Resposta do Matrinxã (*Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores. Tese de Doutorado em Genética e Evolução. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, Brasil. 2005.

IPCS (1992) Methyl parathion. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 145).

IWAMA, G.; AFONSO, L.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 204: 15-19. 2004.

JAMES, R.; SAMPATH, K. Combined toxic effects of carbaryl and methyl parathion on survival growth, and respiratory metabolism in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Acta Hydrobiol.*, Cracow. v.36, n.3, p.399-408, 1994.

KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Erythrocytometric methods and their standardization. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 6, p. 538-542, 1964.

KLEMZ, C.; ASSIS, H. C. S. Efeitos do endosulfano na atividade da Acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, Teleostei). *Rev. Acad.*, Curitiba, v.3, n.4, p. 51-58, out/dez. 2005.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.

LANDIS, W. G.; MING-HO YU. Introduction to Environmental Toxicology – impacts of Chemicals upon Ecological Systems. New York, Boca Raton, Florida, Lewis Publishers. 1995.

LIMA, O.; CORLHO, J. S.; WEIGER, E.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; SOUZA, M. A. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Antibioticos*, v.9, p.17-25. 1969.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.30, p.113-117. 2006.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M. de los A.P. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela Ed., cap. 11, p. 263-272. 2004.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with Follin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

MARCON, E.; PESSOA, A. C. S.; CRUSCIOL, C. A. C.; COTTICA, R. L.; MORO, E.; MÂNICA, M. Persistência e liberação de nutrientes de palhada de nabo forrageiro em condições de lavoura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., Brasília, 1999. Programa e Resumos. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 133, p.151–160. 2002.

MARTINS, M. L. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes. (Boletim Técnico, 3), Jaboticabal, FUNEP, 1997. 60p.

MATAQUEIRO, M. I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida Methyl Parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). 2002. 47f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Aqüicultura, área de Concentração: Aqüicultura em Águas Continentais. Universidade Estadual Paulista, Brasil.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e consideração sobre riscos a saúde humana e ambiental. *Ciência e Saúde Coletiva*, 10(2), p.483-491. 2005.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds) *Fish Stress and Health in Aqualculture*. Cambridge University Press, 1997. 432p.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52, 71 p. 1--760. 1983.

MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Review in Fish Biology and Fisheries*, v. 9, p. 211-268, 1999.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A., RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Phisiology* 143C: 141-149, 2006.

MOORE, M. T.; LIZOTTE JR., R. E.; KNIGHT, S. S.; SMITH JR., S.; COOPER, C. M. Assessment of pesticide contamination in three Mississippi Delta oxbow lakes using *Hyalella azteca*. *Chemosphere*. v.67, p. 2184–2191, 2007.

MOYLE, P. B.; JOSEPH. J. C. *Fishes: An introduction to ichthyology*. 2ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 1998. 559p.

NIPPER, M. In *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. (Nascimento, I. A.; Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., ed), 21: 245-253. Artes gráficas Ltda, Salvador. 2002.

OECD (1992a). Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment. Paris, France. OECD Environment Monograph 59, OECD/GD (92)169.

OECD (1992b). Guidelines for the testing of chemicals. Fish Acute Toxicity Test. Adopted test guideline 203. Paris (FR): OECD. Environment Directorate.

OPS/OMS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília, 72p. 1997.

PETERSON, G.L. A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 246- 356, 1977.

PICKERING, A. D. (Ed.). *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981.

PORTO, M. S. A. Indicadores de estresse em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor. 2005. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Manaus: UFAM. Universidade Federal do Amazonas.

POST, G. *Textbook of Fish Health*. TFH Publications. 1987, 288p.

POTTER V.R. Tissue homogenates. In: Hirs, C.H W. Ed. *Methods in Enzymology: General Preparation Procedures-part II*. New York. Academic Press 1: 10-15, 1955.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere, New York. 1985. 85p.

RAND, G. M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment*. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. 1995. 1125p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. Análise hematológica de curimbatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *B. Inst. Pesca*, v.25, p.77-83. 1998/1999.

RAO, K.S.; RAO, K.V. Impact of methyl parathion toxicity and serine inhibition on acetyl cholinesterase activity in tissues of the teleost (*Tilapia mossambica*) – a correlative study. *Toxicology Letters*, v.22, p.351, 1984.

REGO, L. G. B. Susceptibilidade de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), sob hipoxia aos agrotóxicos organofosforados. 2012. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 55p.

RODRIGUES, E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F. J.; VEIGA, M. L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimbatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). *CEPTA*. v.24, p.197-203. 1997.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoate 500. Rev. Bras. Zool., v. 15, p. 441-450, 1998.

ROSA, A. V. Agricultura e meio ambiente. São Paulo: Ed.Atual, 1998. 95p.

SAINT-PAUL, U. Diurnal routine O₂ consumption at different O₂ concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (teleostei: Serrasalminidae). Com. Biochem. Physiol. v.89, p.675-682. 1988.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. 144p.

SANTOS, R. L. O uso de praguicidas nas atividades aquícolas: destino e efeito após aplicações em tanques experimentais e avaliação nas pisciculturas e pesqueiros da bacia do rio Mogi-Guaçu. 2007. 158f. Tese de Doutorado (Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SARKAR, D. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. Springer, New York. ISBN 978-0-387-75968-5. 2008.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia animal-adaptação e meio ambiente. 5.ed. São Paulo: Santos, 1996. 546p

SENHORINI, J.A Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 60%). Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga ,v.4, n.2, p.11-22, 1991.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. M. Biomonitoramento ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.; editors. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance. p.165-180. 2003a.

SIPAUBA TAVARES, L.H. Limnologia Aplicada a Aqüicultura. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 70 p.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I. Hematological, biochemical and biometric characteristics of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), reared in captivity. Acta Scientiarum, v.24, p.157-162. 2004.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Revista Biológico, São Paulo, v.64, n. 32, p.135-142, 2002.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Analytical Clinical Biochemistry*, Amsterdam, v.6, p.24-27, 1969.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Fishes of the Amazon and their environments, Physiological and Biochemical Features*. Heidelberg. Springer Verlag. 1995.

VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *South African Journal of Zoology*, 33: 107-114, 1998.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Centre for Research in Animal Nutrition, Société Chimique Roche, Saint-Louis Cedex, France. 2002. 36p.

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

WAUCHOPE, R. D.; BUTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/CES properties database for environmental decision-making, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 123, p. 1-164, 1992.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; McLEAVY, D. J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society, p.451-490. 1990.

WELLS, R.M.G.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. v.30, p.276-284. 1999.

WENDELAAR-BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v. 77, p. 591-625, 1997.

WEYTS, F. A. A.; VERBURG and KEMENADE, B. M. L.; FLIKT, G. Characterization of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp *Cyprinus carpio* L. *Gen. Comp. Endocrin.* v.111, p.1-8. 1998.

WIDERSTEN, M.; MANNERVIK, B. Glutathione transferase with novel active sites isolated by phase display from a library of random mutants. *Journal Molecular Biological*, [S.l.], v. 250, p. 115-122, 1995.

WINKALER, E. U. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas Diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2008. 79f. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Centro de Aqüicultura da Unesp. Campus de Jaboticabal.

WOLFF, M.S.; MCCONNELL, R.; CEDILLO, L.; RIVERA, M. Dermal levels of methylparathion, organochlorine pesticides, and acetylcholinesterase among formulators. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, May;48 (5):671-678, 1992.

ZAGATTO P. A; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Editora RiMa, São Carlos, Brasil, 2006. p: 55-65.

ZANATTA, R.; DOS SANTOS, E. D.; DAL'ASTA, M.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. Alterações imunológicas em alevinos de Jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à concentrações subletais do herbicida Glifosato. In: SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. *Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos*. *Oecol. Bras.*, 11 (4): 565-573, 2007.