

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**DIVISÃO DO CURSO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA**  
**DOCE E PESCA INTERIOR – DIBADI**

**Efeito agudo da deltametrina em respostas enzimáticas e na descarga do órgão elétrico**  
**de *Microsternarchus cf. bilineatus* (Gymnotiformes, Hypopomidae)**

**VALESCA DE SOUZA CHAVES**

Manaus, Amazonas

Outubro, 2019

**VALESCA DE SOUZA CHAVES**

**Efeito agudo da deltametrina em respostas enzimáticas e na descarga do órgão elétrico  
de *Microsternarchus cf. bilineatus* (Gymnotiformes, Hypopomidae)**

Orientador: José Antônio Alves Gomes, Ph.D.

Coorientador: Jaydione Luiz Marcon, Dr.

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior – BADPI, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas

Outubro, 2019

Chaves, Valesca de Souza

Efeito agudo da deltametrina em respostas enzimáticas e na descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus cf. bilineatus* (Gymnotiformes). Valesca de Souza Chaves. ---Manaus: 2018.

Dissertação (mestrado) --- INPA, 2017.

Orientador: José Antônio Alves Gomes, Ph.D.

Coorientador: Jaydione Luiz Marcon, Dr.

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1.Piretróide 2.Gymnotiformes 3.Acetilcolinesterase 4.Glutatil-s-transferase 5.Órgão elétrico  
6.Fisiologia

**Sinopse:** Neste estudo avaliou-se a toxicidade aguda do inseticida deltametrina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de do peixe elétrico *Microsternarchus cf. bilineatus*. Verificou-se que a espécie apresenta alta sensibilidade ao inseticida, com uma  $CL_{50-96h}$  igual a  $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Foram observadas alterações bioquímicas *in vitro* com tempo de incubação de 1 hora, alterações *in vivo* após 96 horas, bem como nos padrões de descarga do órgão elétrico após três horas de exposição ao inseticida.

**Palavras-chave:** 1.Deltametrina 2.Acetilcolinesterase 3.Glutatil-s-transferase  
4.Órgão elétrico 5.Gymnotiformes 6. Biomonitoramento

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe Lucilene Chaves, por ser minha inspiração diária de luta e persistência e por ter me dado apoio e suporte para que eu me dedicasse exclusivamente a esse trabalho. Agradeço também a minha irmã Déborah Chaves por todo o carinho e confiança depositada em mim.

Ao meu querido Nal Moraes por me ensinar a ser paciente com a vida e por ser a pessoa mais compreensível e leve que eu conheço. Seu apoio durante essa jornada foi essencial.

Ao meu orientador José Gomes pela oportunidade em ser inserida no mundo dos peixes elétricos, por ter confiado no meu projeto e principalmente ter confiado na minha capacidade em desenvolvê-lo. Agradeço por todos os ensinamentos e discussões durante todos esses anos. Obrigada também pelas sarapós compartilhadas, isso sim é que é incentivo a pesquisa científica.

Agradeço também ao meu coorientador Jaydione Marcon por todo o apoio durante toda a trajetória do projeto. Obrigada por sempre me fazer pensar muito sobre o meu trabalho, acredito que a reflexão é uma etapa fundamental no desenvolvimento de um projeto de pesquisa.

Ao Wallice Duncan por toda a ajuda nas análises e discussões do meu trabalho. Esta parceria foi, sem dúvida, primordial na minha formação científica. Sou imensamente grata por toda a sua paciência em me ensinar e me ouvir, considerando e levando em conta todas as questões levantadas por mim. Sou muito grata!

Ao Sérgio Luiz pelo material cedido para o experimento de ecotoxicologia e pela ajuda com as análises estatísticas no início do projeto.

Ao Fabrício Baccaro por ter abraçado o meu projeto aos 45 do segundo tempo e por ter me auxiliado com as análises estatísticas. Obrigada pela dedicação e toda a ajuda nessa última etapa da minha dissertação.

Agradeço a Rúbia Neris, Fabiana Weckner, Anik Kodra, Crislainy Lima, Thiago Petersen, Renata Schmitt, Isaf Adegas, Ivany Araújo e Livia Maia pelas idas ao campo e o auxílio nas análises laboratoriais. E também ao Zezinho de Novo Airão, o maior pescador de sarapós do Rio Negro.

À Sabrina Morais e ao Magno do laboratório de química do INPA pela ajuda com as análises de quantificação da deltametrina. E ao Sérgio Nunomura por ter cedido o laboratório para estas análises.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia comportamental e evolução, LFCenses, que ajudaram direta ou indiretamente nesse trabalho, em especial a Renata Schmitt e Diana Ferreira por estarem sempre dispostas a tirarem minhas dúvidas sobre os nossos queridos sarapós. À Anik Kodra, Ivany Araújo, Isac Jesus, Dalton Nunes, Adília Nogueira, Jorge Morin, Rebeca Brandão e Thiago Petersen pelo apoio nas excursões e pelas discussões científicas durante todos esses anos. Agradeço a Crislainy Lima por estar sempre disponível a me ajudar com todas as questões burocráticas e logísticas que envolvem um projeto científico. E à Verinha por todos os cafés passados durante as tardes de estudo. Muito obrigada!

Aos meus amigos da turma BADPI 2015, em especial à Susana Braz e Marcele Valle por toda a ajuda desde a realização das disciplinas até o final do projeto.

Aos meus amigos queridos do Maracatu Eco da Sapopema por tornar este último ano do mestrado mais leve e cheio de axé. Axé, amigos!

Às minhas amigas Anik Kodra, Ariane Gomes, Bianca Porto, Ivany Araújo, Livia Maia, Lorena Pinto e Monique Brasil por sempre acreditarem em mim e me darem apoio desde a graduação. Nossa admiração sempre será recíproca. Amo muito vocês! < >

Aos meus amigos da Vila das Flores pelos dias leves e divertidos que também tornaram a jornada do mestrado mais leve. “Okê arô! Agradeço! O carinho, a acolhida, a mão que se estendeu pra vocês, amigas, irmãs, irmãos, amigos, pra vocês meu coração já se deu” José T. Gonzaga.

À professora Cláudia de Deus por ter aceitado ser minha orientadora substituta durante a reta final do mestrado.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia de Água e Pesca Interior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa durante o período do mestrado.

## **EPÍGRAFE**

**“Conforto alucinante, tranquilidade na clareira do caos”.**

**José Paes de Lira**

## RESUMO

O inseticida deltametrina (DT) é um piretróide bastante utilizado no controle de pragas na agricultura. Com o aumento do consumo de agrotóxicos no Brasil, estes químicos podem alcançar os ecossistemas aquáticos por lixiviação e escoamento, possibilitando riscos de exposição da biota aquática. Muitos trabalhos avaliam o efeito de agrotóxicos em espécies de peixes com o auxílio de biomarcadores bioquímicos. A Glutathione-S-transferase (GST) é uma enzima chave na biotransformação de fase II de xenobióticos em peixes e a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que tem papel fundamental na manutenção dos impulsos nervosos, sendo escolhida como biomarcador neste trabalho devido à característica neurotóxica da DT. A espécie utilizada no presente trabalho foi o peixe elétrico *Microsternarchus cf. bilineatus*, pertencente à ordem Gymnotiformes. Estes peixes têm como característica principal a capacidade de gerar descargas elétricas e usá-las para perceber o ambiente ao seu redor. Devido a essa característica, é proposto na literatura o uso destes peixes como biomonitores de qualidade de ambiente em tempo real. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda da DT em *Microsternarchus cf. bilineatus*. A toxicidade foi avaliada a partir da determinação da concentração mediana letal (CL<sub>50</sub>-96h) deste piretróide. Estimativas das atividades das enzimas GST e AChE foram avaliadas em experimentos *in vitro* e *in vivo* em tecidos muscular, nervoso e no fígado de indivíduos expostos a DT. Em um segundo momento verificou-se o efeito de diferentes concentrações de DT em parâmetros da descarga do órgão elétrico (DOE) destes peixes. Também foram avaliadas as atividades das enzimas GST e AChE no mesmo experimento. No ensaio da CL<sub>50</sub>, a concentração letal de DT estimada para a espécie foi igual a 2,1 µg L<sup>-1</sup>, refletindo uma alta toxicidade deste inseticida para a espécie estudada. Um aumento da enzima GST muscular no ensaio *in vivo* pode indicar o papel do músculo destes peixes na defesa contra xenobióticos. A DT não alterou a AChE muscular e cerebral no ensaio *in vivo*. Porém foi observado um aumento significativo da AChE muscular no experimento *in vitro* em concentração de 4 µg.L<sup>-1</sup>. A DT reduziu a taxa de repetição média (Hz) das DOEs dos peixes na primeira hora de exposição em todas as concentrações. Este efeito foi maior na concentração de 3 µg L<sup>-1</sup> quando comparada a de 4 µg L<sup>-1</sup>. Não houve alterações significativas na atividade das enzimas AChE e GST nos tecidos avaliados para estes tempos de exposição. O padrão não linear de respostas bioelétricas dos peixes ao inseticida pode estar relacionado com mecanismos fisiológicos e bioquímicos internos de compensação, quando estes peixes são expostos a altas concentrações de poluentes. Conclui-se que a DT é altamente tóxica para *Microsternarchus cf. bilineatus*, que apresentou o menor valor de CL<sub>50</sub> registrado na literatura para espécies amazônicas. Além disso, é provável que, em concentrações acima da CL<sub>50</sub>, a indução da enzima GST muscular observada no presente trabalho, reflita o papel do músculo na defesa contra xenobióticos. *Microsternarchus cf. bilineatus* pode ser utilizado como biomonitor de qualidade de ambientes aquáticos por alterar os seus padrões de descargas em exposição ao inseticida em um intervalo de tempo inferior a três horas de exposição.

## ABSTRACT

The insecticide deltamethrin (DT) is a pyrethroid widely used in pest control in agriculture. With the escalation in the usage of pesticides in Brazil, these chemicals can more frequently reach the aquatic ecosystems by leaching and runoff, provoking exposure risks to the aquatic biota. Many studies evaluate the effect of pesticides on fish species with the aid of biochemical biomarkers. Glutathione-S-transferase (GST) is a key enzyme in the phase II of xenobiotics biotransformation in fish and acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that plays a key role in the maintenance of nerve impulses, chosen as a biomarker in this work due to the neurotoxic effects of DT. The species used in the present study was the electric fish *Microsternarchus cf. bilineatus*, belonging to the order Gymnotiformes. These fish have as main characteristic the ability to generate and use electric fields to perceive the environment around them. Due to this characteristic, it is proposed in the literature the use of these fish as biomonitors of environment quality, in real time. The present study aimed to evaluate the toxicity of DT in *Microsternarchus cf. bilineatus*. Toxicity was assessed from the determination of the median lethal concentration (LC<sub>50-96h</sub>) of DT for this species. Estimates of the activities of the enzyme GST and AChE were evaluated *in vitro* and *in vivo* in muscle, liver and nervous tissues of individuals exposed to DT. In a parallel experiment the effect of different concentrations of DT on several parameters of the electric organ discharge (EOD) of these fish, was verified. The activities of the GST and AChE enzymes were also evaluated in the same experiment. In the LC<sub>50</sub> test, the lethal concentration of DT estimated for the species was 2.1 µg L<sup>-1</sup>, reflecting a high toxicity of this insecticide for the species studied. An increase of the muscle GST enzyme in the *in vivo* assay may indicate the role of the muscle of these fish in the defense against xenobiotics. DT did not alter muscle and cerebral AChE in the *in vivo* assay. However, a significant increase of muscle AChE was observed in the *in vitro* experiment at 4 µg L<sup>-1</sup> concentration. DT reduced the mean repetition rate (Hz) of fish EODs in the first hour of exposure for all concentrations. This effect was more prominent in the concentration of 3 than in that of 4 µg L<sup>-1</sup>. There were no significant alterations in the AChE and GST enzymes in the tissues evaluated for the exposure times associated to these experiments. The nonlinear pattern of the fish's bioelectrical responses to the insecticide may be related to internal physiological and biochemical compensation mechanisms when these fish are exposed to high concentrations of pollutants. It is concluded that DT is highly toxic to *Microsternarchus cf. bilineatus*, whom presented the lowest value of LC<sub>50</sub> registered in the literature for an Amazonian species; at concentrations above the LC<sub>50</sub>, it is likely that the induction of the muscle GST enzyme observed in the present study reflects the role of muscle in the defense against xenobiotics. Also, this species can be used as a quality biomonitor of aquatic environments by altering its discharge patterns to insecticide exposure in less than three hours of testing.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
1.1 Peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes).....	15
1.2 Gymnotiformes e Biomonitoramento.....	18
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
Geral.....	21
Específicos.....	21
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>22</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>23</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>24</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>26</b>
2.1. Área de coleta e manutenção dos peixes em cativeiro.....	26
2.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	26
2.3. Ensaio <i>in vivo</i> .....	27
2.4. Biomarcadores bioquímicos.....	28
2.4.1. Glutathione-S-transferase (GST).....	28
2.4.2. Acetilcolinesterase (AChE).....	28
2.5. Análises estatísticas.....	29
<b>3. Resultados .....</b>	<b>29</b>
3.1. Ensaio <i>in vitro</i> .....	29
3.2. Ensaio <i>in vivo</i> .....	30
3.2.1. Toxicidade aguda.....	30
3.2.2. Atividades absolutas da GST e AChE.....	30
<b>4. Discussão .....</b>	<b>30</b>
4.1. Ensaio <i>in vitro</i> .....	30
4.2. Ensaio <i>in vivo</i> .....	32
<b>Conclusão .....</b>	<b>34</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>48</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>49</b>

<b>1. Introdução .....</b>	<b>50</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>52</b>
2.1. Área de coleta e manutenção dos peixes em cativeiro.....	52
2.2. Procedimento experimental.....	53
2.3. Gravações das DOEs .....	54
2.3.1. Extração dos dados das DOEs .....	54
2.4. Biomarcadores bioquímicos.....	55
2.4.1. Glutathione-S-transferase (GST).....	55
2.4.2. Acetilcolinesterase (AChE) .....	56
3. Análises estatísticas.....	55
<b>3. Resultados.....</b>	<b>57</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>62</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em tecido muscular de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* em função da exposição *in vitro* do inseticida deltametrina. \*Indica diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 47
- Figura 2.** Atividade da GST em tecido muscular de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* expostos ao inseticida deltametrina por 96 horas. \*Indica diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo controle ( $p < 0,05$ )..... 47
- Figura 3.** Esquema representativo das medições realizadas da descarga do órgão elétrico. F1; F2 e F3 representam respectivamente as fases 1, 2 e 3. A1; A2; A3 representam as amplitudes das fases 1, 2 e 3. D1; D2; D3 representam, respectivamente, a duração das fases 1, 2 e 3. Colchetes horizontais representam a amplitude pico-a-pico ou amplitude total (A1+A2). Colchetes verticais representam a duração total da descarga (D1+D2+D3). Adaptado de Nogueira (2006)..... 70
- Figura 4.** Representação gráfica das variações de Taxa Média (Hz) mensuradas a cada 10 minutos ao longo de 8 horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.....70
- Figura 5.** Representação gráfica das variações em P/Sratio mensuradas a cada 10 minutos ao longo de 8 horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.....70
- Figura 6.** Representação gráfica das variações de PPreI mensuradas a cada 10 minutos ao longo de 8 horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.....71

**Figura 7.** Análise de cross-correlation entre o sinal elétrico da primeira gravação do pré-teste e todos as demais gravações subsequentes. Nesta análise, o índice 1 representa dois sinais 100% idênticos.....71

**Figura 8.** Tempo de resposta da Taxa Média (Hz) de *Microsternarchus cf. bilineatus* exposto a três concentrações do inseticida deltametrina.....72

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACth	Acetiltiocolina iodada
AChE	Acetilcolinesterase
CL <sub>50</sub>	Concentração mediana letal
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzenol
CM	Núcleo marcapasso
CR	Células relay
DOE	Descarga do órgão elétrico
DTNB	5,5' ditiobis-2-nitrobenzóico
DT	Deltametrina
GSH	Glutaiona, forma reduzida
GST	Glutathione-S-transferase
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da atividade enzimática
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
NM	Núcleo Marcapasso
NPM	Núcleo pré-marcapasso
NPMS	Núcleo pré-marcapasso subleminiscal
OE	Órgão elétrico
PPrel	Relação pico-a-pico
P/Sratio	Relação entre fase de pulso e fase silenciosa
SEE	Sistema eletrogênico e eletrosensório

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A deltametrina (DT) é um inseticida pertencente à classe dos piretróides, substâncias produzidas desde 1940 (Elliot *et al.*, 1973) e que surgiram como alternativa para substituir o uso de pesticidas sintéticos mais tóxicos, como os organoclorados e carbamatos (Figura 1). Os piretróides agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado *knock down* (Santos *et al.*, 2007). Os piretróides estão classificados em piretróides do tipo I (ausência de grupo ciano) e piretróides do tipo II (presença de grupo ciano). Esta classificação é fundamentada nos sintomas produzidos em animais experimentais que receberam doses agudas tóxicas destas substâncias (Verschoyle e Aldridge, 1980). Piretróides do tipo I agem nos nervos periféricos, enquanto os do tipo II agem no sistema nervoso central. O mecanismo de ação dos piretróides inclui efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh), receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA),  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. Porém, a causa primária de toxicidade são os seus efeitos excitatórios nos canais de  $\text{Na}^{+}$  dependentes de voltagem de insetos e vertebrados, resultando numa ativação persistente dos canais de  $\text{Na}^{+}$  e duradoura despolarização da membrana (Demoute, 1989).

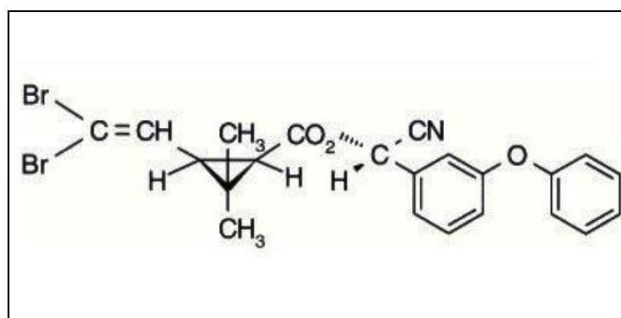


Figura 1. Estrutura química do inseticida deltametrina. Fonte: Anvisa, 2008.

Esse inseticida é um piretróide do tipo II que possui baixa solubilidade em água e baixo potencial de lixiviação, sendo estável no ar com presença de luz e umidade, porém instável em meio alcalino (WHO, 1990). Em geral, os piretróides apresentam caráter lipofílico, possuindo uma alta taxa de absorção através das brânquias dos peixes, o qual pode explicar em parte, a alta sensibilidade destes animais quando expostos a este grupo de substâncias (Santos *et al.*, 2007). A DT é utilizada para fins agrícolas em uma diversidade de

cultivares como folhas e flores (brócolis, crisântemo e couve) e frutas (cacau, caju, maçã, melancia e melão). Sua aplicação também é feita diretamente sobre as culturas de amendoim, arroz, cacau, café, cevada, feijão, milho, soja e trigo armazenados. Além disso, é usada para o controle de formigas, domissanitário e preservante de madeira, conforme aprovação em rótulo e bula. Sua Ingestão Diária Aceitável (IDA) é igual a 0,01 mg/kg p.c. (Anvisa, 2008). As Diretrizes Canadenses de Qualidade da Água (CWQG) recomendam concentrações de DT para áreas agrícolas de 0,04 a 24  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e para a produção aquícola de 2,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Pawlisz *et al.*, 1998).

No Brasil, as safras do segundo semestre de 2010 e primeiro semestre de 2011, movimentaram cerca de 940 mil toneladas de produtos no mercado internacional de venda de agrotóxicos. A produção gerou 833 mil toneladas de agrotóxicos, e a importação foi de 246 mil toneladas de produtos (Anvisa, 2012). Em 2017, houve uma pequena queda nas vendas totais em comparação aos anos anteriores (IBAMA, 2017). Entretanto, o ano de 2019 é marcado pela grande liberação do número de agrotóxicos. Devido a isto, a preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos por estes químicos tem crescido, especialmente porque os agrotóxicos podem alcançar o ambiente aquático de várias formas, tais como lixiviação, escoamentos superficiais, assim como a lavagem e descarte de embalagens de forma imprópria e próxima a cursos de água (Tomita e Beyruth, 2002).

Em um estudo de avaliação de uso de agrotóxicos na região metropolitana de Manaus, Amazonas, que incluiu os municípios de Manaus, Manacapuru, Iranduba e Careiro da Várzea, foi verificado que os agricultores utilizam 18 tipos diferentes de agrotóxicos. Destes, 11 são inseticidas, sendo a deltametrina a mais utilizada (Waichman *et al.*, 2002; 2007).

### 1.1 Peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes)

Na região Amazônica há um grupo de peixes popularmente conhecido como peixes elétricos. Estes peixes pertencem à ordem Gymnotiformes e têm representantes basicamente em todos os sistemas fluviais neotropicais, desde a região sul do México até a Argentina, mas apresenta sua maior abundância e diversidade nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde pode representar cerca de 90% da fauna bentônica (Hagedorn, 1986; Marrero e Taphorn, 1991; Moller, 1995).

Os peixes elétricos apresentam como característica mais notável um órgão elétrico constituído por eletrócitos e um sistema de eletrorecepção, formado por órgãos receptores espalhados por toda a superfície do corpo. O Órgão Elétrico (OE) e os órgãos eletroreceptores funcionam em conjunto e compõem o Sistema Eletrogênico e Eletrosensório (SEE) (Alves-Gomes, 1995). Os eletroreceptores monitoram constantemente o campo elétrico gerado a cada Descarga do Órgão Elétrico (DOE). Distorções neste campo podem ser causadas por organismos ou objetos que possuam uma condutividade elétrica diferente da água onde o peixe se encontra e, desta forma, o SEE permite que os gymnotiformes obtenham informações sobre o meio em que se encontram mesmo no escuro. Além desta eletrolocalização ativa, o SEE é fundamental na interação social e comunicação entre os indivíduos das diferentes espécies, atuando na escolha de parceiros durante o período de reprodução e, conseqüentemente, permitindo a diferenciação entre juvenis e adultos e entre machos e fêmeas (Hopkins, 1974; Bullock *et al.*, 1979; Hagedorn e Carr, 1985; Sullivan, 1997).

Cada espécie de Gymnotiformes tem uma DOE específica e esta pode ser dividida em dois tipos quanto ao seu aspecto temporal: DOE tipo pulso (inclui as famílias Gymnotidae, Electrophoridae, Rhamphichthyidae e Hypopomidae) e DOE tipo onda (inclui as famílias Eingenmanniidae, Sternopygidae e Apterontidae). Peixes pulsadores possuem DOE com curta duração, com um longo intervalo de silêncio entre duas descargas consecutivas, podendo descarregar entre menos de 5 e mais de 120 vezes por segundo (Hz). Os onduladores descarregam em uma frequência constante e estável, com intervalos regulares e taxas de descarga entre 60 e 2100 Hz (Bullock *et al.*, 1979; Bastian, 1994; Alves-Gomes, 1997).

O comando neural das DOEs é feito por um núcleo cerebral, denominado de núcleo marcapasso (NM), localizado no Sistema Nervoso Central, mais especificamente no bulbo cerebral dos peixes. Existem apenas outros dois núcleos no cérebro que fazem conexão e modulam a atividade do NM, o Núcleo Pré-Marcapasso (NPM) e o Núcleo Pré-Marcapasso Sublemniscal (NPMS), mas é nas células marca-passo do NM que cada DOE se inicia. O núcleo marca-passo é o núcleo de comando da DOE e responsável por manter o ritmo das descargas do órgão elétrico. Desta forma, toda e qualquer modulação que ocorra no padrão de descargas se origina no NM. Este núcleo é composto por cerca de 200 células nos gymnotiformes que se dividem em dois tipos de neurônios: Células Marca-passo (CM), conforme mencionado anteriormente, e Células de Retransmissão ou Células Relay (CR) (Hopkins, 1988; Bell e Maller, 2005). As células marca-passo possuem uma atividade



intrínseca e excitam as CR, sendo que estas, por meio dos axônios, levam o estímulo aos neurônios motores que inervam o OE para a produção da DOE (Spiro, 1997; Bell e Maller, 2005).

Atualmente a Ordem Gymnotiformes possui 240 espécies e recentemente outras tem sido descritas (Ferraris *et al.*, 2017). A ordem é dividida em sete famílias (Alves-Gomes *et al.*, 1995): Sternopygidae, Electrophoridae, Gymnotidae, Rhamphychtidae, Hypopomidae, Eingenmaniidae e Apterodontidae. A família Hypopomidae, segundo Alves-Gomes *et al.* (1995) é constituída pelos gêneros: *Hypopomus*, *Brachyhypopomus*, *Racenisia*, *Microsternarchus*, sendo que recentemente mais dois novos gêneros foram descritos: *Akawaio* (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2013) e *Procerusternarchus*. (Cox-Fernandes *et al.*, 2014).

A espécie *Microsternarchus bilineatus* está distribuída pela bacia Amazônica, Orinoco e Guianas (Mago-Leccia, 1994; Albert; Crampton, 2005), e foi descrita por Fernández Yépez em 1968, com base em diversas características morfológicas analisadas em 28 indivíduos coletados no rio São José, Venezuela. Uma característica peculiar deste gênero é a sua DOE que possui um pulso de longa duração, diferente dos outros hipopomídeos. Apesar disso, sua DOE apresenta uma taxa de repetição bastante estável e o número de descargas por unidade de tempo é quase constante. Por conta disso, esta espécie é considerada como representante de uma transição entre pulsador e ondulado (Alves-Gomes, 1997; Alves-Gomes *et al.*, 1995). Apesar de ter sido descrita como uma única espécie, *Microsternarchus bilineatus*, é na verdade, um complexo de espécies que foram separadas em cinco linhagens distintas (Maia, 2011). Em função disso, neste trabalho foi adotada a nomenclatura *Microsternarchus* cf. *bilineatus* para designar a espécie/linhagem em estudo.

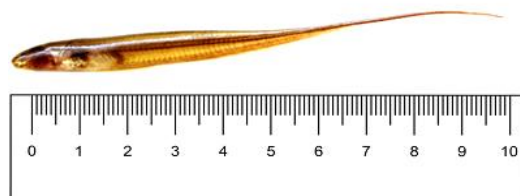


Figura 2. Exemplar adulto de *Microsternarchus* cf. *bilineatus*. Fonte: Arquivo pessoal

## 1.2 Gymnotiformes e Biomonitoramento

Os Gymnotiformes apresentam um grande potencial como biomonitores de qualidade ambiental em ambientes aquáticos. Essa potencialidade existe porque pequenas alterações físico-químicas na água podem provocar mudanças nas características (frequência e forma da onda) das DOEs em curto espaço de tempo. Esta resposta fisiológica é o elemento central para um sistema de biomonitoramento de qualidade de água (Pimentel-Souza e Siqueira, 1988, 1992; Thomas *et al.*, 1996a, 1996b, 1998; Thomas, 1997; Thomas, 2000; Rossoni, 2005; Schwertner, 2005; Ferreira, 2009).

Thomas *et al.* (1996a, 1996b) testaram a influência do cianeto de potássio (KCN) na DOE do gymnotiforme *Apteronotus albifrons*. Nestes trabalhos os autores propuseram um sistema de monitoramento biológico com o uso das variáveis das DOEs destes peixes para prever alterações na água do rio Moselle, na França, que estava sujeito à contaminação. Thomas *et al.* (1997) avaliaram o efeito do pH e condutividade sobre a taxa de repetição (Hz) da DOE e observaram que esta diminuiu em condições ácidas (pH 3,6 a 5,4) e aumentou em condições alcalinas, a partir do pH 10,6. Neste mesmo estudo os autores não observaram efeito significativo da condutividade sobre a taxa de repetição. Em 1998 estes mesmos autores testaram o efeito da temperatura sobre a taxa de repetição da DOE, observaram que existe uma correlação significativa, crescente com o aumento e decrescente com a diminuição da temperatura, confirmando a necessidade de um controle de variação de temperatura para utilização dos peixes elétricos como biomonitores (Thomas *et al.* 1998).

Thomas (2000) propôs um sistema integrado de gerenciamento ambiental que atua com dispositivos de vigilância e proteção dos recursos aquáticos, atuando em casos de alarme utilizando as descargas de *Apteronotus albifrons* denominado Gymnotox, localizado nas proximidades do Rio Moselle. Este sistema combina dados físico-químicos com informações de monitores biológicos, com o objetivo de compor um sistema de biomonitoramento em tempo real por meio de análises das taxas de repetições das DOEs. Atualmente o aparelho de biomonitoramento Gymnotox desenvolvido por Thomas (2000) é fornecido por pelo menos três empresas e mede continuamente as frequências emitidas pelo peixe e tem capacidade de detectar mudanças físicas e químicas no ambiente sem a necessidade de filtrar a água, além disso, possui tempo de detecção de 10 minutos.

No Brasil, o estudo de biomonitoramento com peixes gymnotiformes, tem com um dos pioneiros Pimentel-Souza e Siqueira (1988, 1992) que avaliaram o efeito da concentração de dióxido de carbono na frequência das DOEs de *Apteronotus albifrons* e *Eingenmannia virescens* e, posteriormente, sugeriram um sistema de biomonitoramento de águas doces com a espécie pulsadora *Gymnotus carapo*.

No sentido de ampliar a gama de testes com diferentes poluentes e propor outras espécies de peixes gymnotiformes como potenciais biomonitores, Rossoni (2005) testou o uso de diferentes concentrações de águas de formação, um produto secundário da exploração do petróleo, sob os parâmetros das DOEs de *Apteronotus hasemani* e observou uma resposta imediata associada à diminuição da frequência a partir do tempo inicial de exposição. Schwertner (2005) expôs cinco indivíduos da mesma espécie em diferentes concentrações de compostos BTX (Benzeno, Tuoleno e Xileno) e seus resultados também evidenciaram uma diminuição dos valores de frequência dos peixes quando submetidos ao contaminante, em menos de quinze minutos de exposição.

Ferreira (2009) testou o efeito de combustíveis automotivos derivados do petróleo, gasolina comum e óleo diesel, em *Microsternarchus bilineatus*. A diminuição da frequência foi uma resposta imediata dos peixes quando expostos às concentrações de 110  $\mu\text{L}^{-1}$  e 220  $\mu\text{L}^{-1}$  dos hidrocarbonetos testados. Neste mesmo estudo foi observado que esta espécie tem uma tendência gradativa de reverter à frequência ao padrão inicial. Moraes (2013) avaliou o efeito do metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), forma orgânica do mercúrio, em *Gymnotus sylvius* e foi observado um aumento da frequência da DOE após dieta com metilmercúrio.

Na literatura há alguns estudos sobre os efeitos de diferentes substâncias em aspectos das DOEs de diferentes espécies de peixes elétricos. No entanto, existem poucos estudos que avaliam outros tipos de respostas fisiológicas. Bucker *et al.* (2006) avaliaram a mutagênese e a genotoxicidade do benzeno em indivíduos de *Eingenmannia virescens*.

Outra forma de avaliação de efeito de xenobióticos em peixes é feito através do uso de biomarcadores bioquímicos. O processo de biotransformação de xenobióticos em peixes se dá por meio de duas fases. Na primeira fase ocorrem reações enzimáticas por meio de processos de oxidação, redução e hidrólise. Na segunda fase, as enzimas agem por meio da conjugação de cofatores em xenobióticos ou em metabólitos gerados pela fase I. Uma enzima importante da fase II é a glutathione-S-transferase (GST), enzima que conjuga a glutathione aos

metabólitos, aumentando sua polaridade para que estes possam ser desintoxicados e excretados do organismo (Di Giulio e Hinton, 2008).

A manifestação da neurotoxicidade de piretróides pode ser avaliada por meio da estimativa da atividade da AChE. Esta enzima é amplamente usada para avaliar os efeitos neurotóxicos de poluentes, sendo responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina que permanece nas sinapses ou junções neuromusculares após a transmissão do impulso nervoso. Sua inibição gera um acúmulo de acetilcolina que resulta em uma transmissão contínua e desordenada dos impulsos nervosos (Soreq e Seidman, 2001). Há registros na literatura que relatam o efeito de piretróides sobre esta enzima (Bálint *et al.* 1995; Moraes, 2013; Rossi, 2013; Soares, 2016). Estes efeitos incluem diminuição da atividade da AChE do soro sanguíneo e cerebral e aumento da atividade da AChE muscular. A inervação das células do órgão elétrico de peixes Gymnotiformes é controlada por sinapses colinérgicas e a deltametrina age nos receptores nicotínicos da acetilcolina podendo agir na enzima AChE.

Neste trabalho, a escolha do gymnotiforme *Microsternarchus cf. bilineatus* se deu em função da estabilidade temporal da sua DOE, o que facilita o uso da mesma em bioensaios, e também por ser abundante em igarapés da bacia do Rio Negro. Neste sentido, a espécie foi usada como modelo para identificar os possíveis efeitos da deltametrina em uma investigação composta de três etapas: 1) Estimativa da concentração mediana letal (CL<sub>50-96h</sub>) da deltametrina para a espécie; 2) Avaliação das atividades das enzimas GST (Glutathione-S-transferase) e AChE (acetilcolinesterase) em tecidos de indivíduos expostos a diferentes concentrações do inseticida; 3) Caracterização das mudanças nos padrões biofísicos das DOEs em indivíduos expostos a três concentrações crescentes de deltametrina durante três horas consecutivas, seguidas de recuperação.

Estes experimentos complementares permitiram uma melhor compreensão do efeito do poluente estudado sobre os aspectos fisiológicos e bioquímicos de *M. cf. bilineatus* e também contribuiu para um melhor embasamento prático e teórico sobre a utilização desta espécie em um sistema mais abrangente de biomonitoramento de ambientes aquáticos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

- Avaliar o efeito agudo do inseticida deltametrina nas respostas enzimáticas e no padrão de descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus cf. bilineatus*

### 2.2 Objetivos específicos:

- Determinar a concentração mediana letal (CL<sub>50-96h</sub>) do inseticida deltametrina para *Microsternarchus cf. bilineatus*;
- Avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e Glutathione-S-transferase (GST) no fígado e nos tecidos nervoso e muscular de exemplares de *M. cf. bilineatus* expostos ao inseticida deltametrina;
- Determinar variações nos parâmetros da descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus cf. bilineatus* durante exposição de indivíduos pelo período de três horas, a diferentes concentrações de deltametrina.

## CAPÍTULO 1

---

\*Artigo formatado de acordo com as normas da revista Acta Amazonica

**Toxicidade aguda da deltametrina e seus efeitos nas atividades das enzimas Glutationa-S-transferase (GST) e a Acetilcolinesterase (AChE) de *Microsternarchus cf. bilineatus* (Gymnotiformes)**

## Resumo:

A deltametrina é um inseticida da classe piretróide bastante utilizado no controle de pragas na agricultura. O uso intensivo e desordenado desse agrotóxico pode direcioná-lo a ecossistemas aquáticos de diversas formas, mas principalmente pelo escoamento superficial e lixiviação. O acúmulo de deltametrina em corpos d'água pode comprometer a sobrevivência da biota aquática. A deltametrina é considerada bastante tóxica para peixes devido a sua característica lipofílica, possibilitando uma alta taxa de absorção através das brânquias. O objetivo deste estudo foi estabelecer a concentração mediana letal (CL<sub>50-96h</sub>) e caracterizar os efeitos da deltametrina sobre a atividade de dois biomarcadores bioquímicos, a Glutathione-S-transferase (GST) e a Acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos de *Microsternarchus cf. bilineatus*. Estas duas enzimas são, respectivamente, importantes para a desintoxicação de xenobióticos e manutenção das funções nervosas. Os peixes foram expostos às concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg.L<sup>-1</sup> de deltametrina durante 96 horas. Após cada exposição, foram analisadas as atividades absolutas das enzimas GST (muscular e hepática) e AChE (muscular e tecido nervoso). A CL<sub>50-96 h</sub> para *Microsternarchus cf. bilineatus* foi de 2,15 µg.L<sup>-1</sup>. Ensaio *in vitro* dos parâmetros cinéticos da enzima AChE não demonstraram uma constante de inibição em função do aumento da concentração do inseticida, mas a atividade específica desta enzima aumentou significativamente na concentração de 4 µg.L<sup>-1</sup> em um segundo ensaio *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, a deltametrina não afetou as atividades da AChE nem a atividade da GST hepática. No entanto, a deltametrina promoveu uma indução da GST muscular nos peixes expostos no ensaio *in vivo*. Nossos resultados revelam que *Microsternarchus cf. bilineatus* é extremamente sensível à exposição aguda à deltametrina, porém, este inseticida não afeta as atividades da AChE nos tempos de exposição usados. Por outro lado, os mecanismos de desintoxicação por meio da GST foram ativados no tecido muscular durante a exposição às concentrações de 2 e 3 µg.L<sup>-1</sup> de deltametrina.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase, biomonitoramento, CL<sub>50</sub> (96h), Glutathione S-Transferase, Gymnotiformes, Piretróide, *Microsternarchus*.

## 1. Introdução

A deltametrina é um inseticida piretróide do tipo II que age no sistema nervoso central dos seus organismos-alvo. É considerada bastante tóxica para peixes devido ao seu caráter lipofílico, possibilitando uma alta taxa de absorção por meio das brânquias (Santos *et al.* 2007). Em estudos de uso e avaliação de agrotóxicos na região metropolitana de Manaus foi observado que, dentre os dezoito agrotóxicos utilizados pelos agricultores da região, o inseticida deltametrina foi o agrotóxico mais recorrente (Waichman *et al.*, 2002, 2007).

Mesmo sendo considerada como medianamente tóxica pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2008), estudos recentes demonstram que a deltametrina causa vários tipos de efeitos toxicológicos em organismos aquáticos, que desencadeiam uma variedade de respostas em diversos níveis, desde os comportamentais (efeitos motores), assim como respostas em diversos sistemas (nervoso, respiratório e cardiovascular), além de ajustes em sistemas antioxidantes (Who, 1990; Reddy e Philip, 1994; Gray e Otsby, 1998; Pimpão *et al.* 2007; Silva de Assis *et al.* 2009; Hernández-Moreno *et al.* 2010; Moraes, 2013; Souza, 2014; Haverinen e Vornanen, 2016; Meng *et al.* 2016).

A toxicidade aguda da deltametrina foi investigada em algumas espécies de peixes amazônicos. Moraes *et al.* (2013) determinou a toxicidade aguda de  $2,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  para indivíduos de *Brycon amazonicus*. Souza (2014) determinou a toxicidade aguda e curva de sensibilidade de quatro agrotóxicos, incluindo a deltametrina, em cinco espécies de peixes amazônicos: *Carnegiella strigata*, *Colossoma macropomum*, *Paracheirodon axelrodi*, *Hemigrammus rhodostomus* e *Corydoras swartzi*. Os valores da  $CL_{50-96h}$  da deltametrina variaram de 4 a  $215 \mu\text{g.L}^{-1}$  para estas espécies, apresentando os menores valores de  $CL_{50}$ , quando comparadas aos outros agrotóxicos, o que demonstra uma elevada toxicidade deste piretróide para os peixes desta região.

Também há trabalhos que avaliaram os efeitos bioquímicos de outros agrotóxicos em espécies amazônicas. Braz-Mota *et al.* (2015) observaram uma diminuição da atividade das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) em indivíduos de *Colossoma macropomum* expostos a concentrações sub-letais do herbicida glifosato. A GST é uma enzima de biotransformação de fase II, ela catalisa a conjugação da glutathione



reduzida (GSH) ao xenobiótico ou ao metabólito produzido na fase I, caracterizada pelos eventos de oxidação, redução ou hidrólise (Di Giulio e Hinton, 2008), tornando esta enzima extremamente importante no mecanismo de desintoxicação de peixes. A enzima AChE, por sua vez, tem sido amplamente usada para avaliar os efeitos neurotóxicos de poluentes, já que a mesma tem a função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina que permanece nas sinapses ou junções neuromusculares após a transmissão do impulso nervoso. Sua inibição gera um acúmulo de acetilcolina que resulta em uma transmissão contínua e desordenada dos impulsos nervosos (Soreq e Seidman, 2001). Há registros adicionais na literatura que relatam o efeito de piretróides nesta enzima (Bálint *et al.* 1995; Moraes, 2013; Rossi, 2013; Soares, 2016), que incluem ambos, diminuição e aumento da atividade da AChE.

Na literatura não se encontram dados de toxicidade aguda de agrotóxicos em espécies de peixes elétricos da América do Sul. Estes peixes representam cerca de 90% da fauna bentônica nas bacias dos Rios Amazonas e Orinoco (Hagedorn, 1986; Marrero e Taphorn, 1991) e apresentam como característica mais notável, um órgão elétrico e órgãos eletroreceptores, os quais, trabalhando em conjunto, permitem que estes peixes obtenham informações sobre o meio em que se encontram (Hopkins, 1974; Bullock *et al.* 1979; Bastian, 1994; Alves-Gomes *et al.* 1995). O ritmo do órgão elétrico é comandado por um núcleo cerebral que contata o órgão elétrico por meio de sinapses mediadas por acetilcolina, e alterações físico-químicas na água podem alterar o funcionamento do sistema eletrogênico e eletrosensório (SEE) destes peixes (Alves-Gomes 2001, 2014), o que torna este grupo bastante sensível a poluentes nos ambientes onde vivem.

Para este trabalho foi escolhido o gymnotiforme *Microsternarchus cf. bilineatus* por ser uma espécie abundante nos igarapés amazônicos e que, possivelmente, possa vir a ser alvo destes tipos de contaminantes, devido ao aumento do uso de agrotóxicos no entorno da região metropolitana de Manaus. Essa espécie também possui potencial para uso como biomonitor de qualidade de ambientes aquáticos, por mudar o padrão de descarga do seu órgão elétrico em resposta a mudanças nas características físicas e químicas da água. Neste estudo foi avaliada a toxicidade do inseticida deltametrina em diferentes tecidos da espécie selecionada, por meio da mensuração das atividades das enzimas GST e AchE em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Área de coleta e manutenção dos peixes em cativeiro

As coletas foram realizadas no igarapé Tapuru (licença/SISBIO/55408-2) no município de Novo Airão (S 02° 43' 38.1"; O 60° 57' 39.5") a 180 km de Manaus. Foram coletados 95 espécimes de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* pesando  $0,89 \pm 0,33$  g; e comprimento de  $6,79 \pm 0,90$  cm (Média  $\pm$  DP). Os peixes foram transportados e aclimatados no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE/INPA), em aquários de 40 litros, com filtração e aeração constante, com água ( $\text{Na}^+$  1,68  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ;  $\text{K}^+$ , 0,41  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ; 0,07  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ; pH 6,84; oxigênio dissolvido 5,92  $\text{mg.L}^{-1}$ ; condutividade de 20,2  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  e temperatura de 28° C) advinda do poço artesiano do INPA e mantida em um tanque de 1.000 litros com filtração biológica e aeração constante. Em cada aquário foram mantidos no máximo 15 peixes que permaneceram até pelo menos sete dias antes do início do experimento. Os animais foram alimentados diariamente com náuplios de *Artemia salina* e *Enchytraeus albidus*. Após, restos de alimentos e dejetos foram aspirados do fundo dos aquários e a água foi completada ao nível inicial.

### 2.2 Ensaio *in vitro*

A deltametrina foi adquirida a partir da formulação comercial Decis® EC (Bayer Vapi PVT LTD, Gujarat, Índia) com concentração de 25  $\text{g.L}^{-1}$  do inseticida. A partir do formulado foi preparada uma solução-estoque com água destilada de 25  $\text{mg.L}^{-1}$ . As concentrações de DT testadas foram definidas a partir do intervalo de concentrações da  $\text{CL}_{50}$  obtida para espécies de peixes amazônicos em estudos similares (Moraes *et al.* 2013; Rossi, 2013; Souza, 2014). Foram testadas as concentrações de 0, 2, 5, 10 e 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de DT sobre as atividades da AChE do tecido muscular e de 0, 2, 5 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  sobre as atividades da AChE do tecido nervoso, ambos com tempo de incubação de 1 hora (Assis *et al.* 2012). No tecido nervoso não foi realizado o ensaio a 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  devido à falta de tecido. Não foram realizados ensaios *in vitro* com a enzima GST.

Após o período de aclimação, exemplares (n=11) de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* foram utilizados individualmente nos ensaios *in vitro*. Os peixes foram inicialmente mantidos em hipotermia e, depois, eutanasiados por secção medular. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do INPA (Protocolo 020/2016). As amostras de tecido muscular (que inclui o órgão elétrico) e nervoso foram retiradas e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5). Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 g e o sobrenadante foi usado para medição das atividades das enzimas.

Com o objetivo de calcular a IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da atividade da enzima) e a constante de inibição (KI), cada ensaio (diferentes concentrações de deltametrina) foi analisado em diferentes concentrações do substrato acetiltiocolina iodada (AtCh) (0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mM). Este procedimento também serviu para calcular os parâmetros enzimáticos, Km (constante de Michaelis-Menten) e velocidade máxima da reação (V<sub>max</sub>) da enzima. Na microplaca foram adicionados 25 µL de amostra de tecido (homogeneizados) em 100 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3, 25 °C) contendo DTNB (0,1 M) e 25 µL de deltametrina (nos ensaios). A reação foi iniciada com adição de 50 µL de acetiltiocolina. Depois de determinadas as constantes bioquímicas, um segundo ensaio foi realizado para o mesmo tecido muscular preservado, com concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg.L<sup>-1</sup> de deltametrina, seguindo os mesmos procedimentos citados acima. Este intervalo de concentrações foi escolhido para comparação com os resultados do ensaio *in vivo* descrito a seguir.

### 2.3 Ensaio *in vivo*

Para a determinação da concentração mediana letal (CL<sub>50</sub>) da deltametrina, foram seguidas recomendações do protocolo da OECD (1992). O teste foi realizado por meio de um sistema semi-estático com renovação total da água a cada 24 horas. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do teste. Após o período de aclimação, foram transferidos sete peixes para cada unidade experimental contendo 2L de água. Duplicatas foram feitas para cada tratamento (n=7). Foram utilizadas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg.L<sup>-1</sup> de deltametrina. Os parâmetros físicos e químicos da água (temperatura, condutividade, pH, oxigênio dissolvido, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>) foram mensurados diariamente e

não foram observadas mudanças significativas ao longo do período experimental (Tabela 1). Os indivíduos que vieram a óbito durante o experimento foram medidos, pesados, e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os sobreviventes foram submetidos à hipotermia e eutanasiados por secção medular. Todas as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C para as análises enzimáticas. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do INPA (Protocolo 020/2016).

## 2.4 Biomarcadores bioquímicos

### 2.4.1. Glutationa-S-transferase (GST)

As atividades da GST foram determinadas pelo método descrito por Keen *et al.* (1976). Amostras de tecido muscular e fígado foram retiradas de cada indivíduo e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM; pH 7,5). Os homogeneizados foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi usado para estimar a atividade da enzima. De forma resumida, 30 µL da amostra foram adicionados em 120 µL de tampão de ensaio contendo 1 mM de glutatona reduzida (GSH). A concentração de CDNB foi previamente estimada para cada tecido, sendo de 0,16 mM para o tecido muscular e 0,77 mM para o fígado, conforme o  $K_m$  da enzima. A alteração na absorbância foi registrada a 340 nm, e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 9,6 mM.cm<sup>-1</sup>. As atividades da enzima foram expressas em nmol do conjugado CDNB.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>. As proteínas totais foram estimadas pelo método de Bradford (1976).

### 2.4.2. Acetilcolinesterase (AChE)

As atividades da enzima AChE foram determinadas pelo método de Ellman *et al.* (1961), utilizando acetiltiocolina iodada (AtCh) como substrato. Amostras de tecido muscular e nervoso foram retiradas dos mesmos indivíduos e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM; pH 7,5), centrifugados por 5 minutos a 10.000, sendo o sobrenadante usado para estimar a atividade da enzima. Utilizou-se 5 µL da amostra (homogeneizados)

em microplaca contendo 120  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio com a concentração de acetilcolina iodada estimada para cada tecido, baseada na determinação do  $K_m$ . A alteração na absorvância foi registrada a 412 nm, e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de  $13,6 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Ellman *et al.* 1961). As atividades da enzima foram expressas em  $\text{nmol acetilcolina}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ . A concentração de proteína foi estimada pelo método de Bradford (1976).

### 3. Análises estatísticas

O cálculo da  $CL_{50-96}$  horas foi realizado com o pacote DCR (Dose Response Curve) do programa R, por meio de um modelo log-logístico (Ritz *et al.* 2015). Para os ensaios *in vitro* foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste a posteriori de Bonferroni. Os dados das atividades das enzimas GST e AChE nos ensaios *in vivo* não atenderam às premissas da normalidade de dados. Neste sentido, foi aplicada uma análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste a posteriori de Dunn, que permite comparar todos os grupos com o grupo controle. Em todos os testes, o nível de significância aceito foi 5%.

### 4. Resultados

#### 4.1 Ensaio *in vitro*

Os resultados dos ensaios *in vitro* com o efeito da deltametrina sobre os parâmetros cinéticos da enzima acetilcolinesterase nos tecidos nervoso e muscular de *Microsternarchus cf. bilineatus* estão representados na Tabela 2. No tecido muscular, a relação entre o  $K_m$  da enzima e a concentração de deltametrina é inversamente proporcional. Concentrações maiores de deltametrina tendem a reduzir o  $K_m$  da AChE. No tecido nervoso não foram observados efeitos da deltametrina sobre o  $K_m$  da AChE, assim como não houve relação clara entre a DT e a  $V_{max}$ , tanto no tecido nervoso quanto no tecido muscular. No segundo ensaio *in vitro*, a atividade da acetilcolinesterase aumentou significativamente na concentração de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 1).

## 4.2 Ensaio *in vivo*

### 4.2.1. Teste de toxicidade aguda

Ao longo das 96 horas de ensaio foram observadas alterações comportamentais como natação rápida e circular, espasmos, permanência na superfície da água e aumento da abertura opercular em todos os grupos expostos. Por outro lado, nenhum peixe do grupo controle morreu e não foram observadas as alterações comportamentais mencionadas acima. Na unidade experimental com a concentração de 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de DT, os peixes começaram a morrer a partir das quatro primeiras horas de ensaio. Na Tabela 4 é apresentado o número de indivíduos mortos por tratamento no final do ensaio. O valor da  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  calculado para o teste de toxicidade aguda da deltametrina foi de 2,15  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

### 4.2.2. Atividades absolutas da GST e AChE

As atividades da GST no músculo aumentaram significativamente nos grupos expostos às concentrações de 2 e 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . O aumento foi de 1,8 e 1,5 vezes, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Figura 3). Foi possível observar uma tendência de diminuição das atividades nas concentrações de 4 e 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Não houve diferenças significativas entre as atividades da enzima AChE nos tecidos muscular e nervoso. De igual modo, não se observou efeito da deltametrina nas atividades da GST no fígado (Tabela 3).

## 5. Discussão

### 5.1 Ensaio *in vitro*

O  $K_m$  da AChE dos tecidos nervoso e muscular (0,3 e 0,5 mM, respectivamente) de *Microsternarchus cf. bilineatus* foram similares aos encontrados por Assis *et al.* (2012)

para *Electrophorus electricus* (poraquê) com  $K_m$  igual 0,45 mM, ainda que estes autores tenham trabalhado com a enzima purificada do órgão elétrico. Contudo, deve-se levar em consideração que os parâmetros cinéticos da AChE para o tecido muscular de *M. cf. bilineatus* foram realizados contendo partes do seu órgão elétrico, uma vez que se torna difícil separar os dois tecidos devido ao tamanho diminuto do animal. Assis *et al.* (2012) calcularam o  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% da atividade da enzima) para sete inseticidas, dentre eles os organofosforados, organofosfatos e carbamatos. O menor valor de  $IC_{50}$  foi observado para o carbuforan (um inseticida carbamato), indicando que este inseticida causou o maior efeito inibitório na atividade da AChE. No presente trabalho, devido à ausência de um efeito inibitório claro da deltametrina sobre a AChE nas concentrações testadas, não foi possível calcular o  $IC_{50}$  e o  $K_i$  (constante de inibição) para esse inseticida. Rao e Rao (1995) também não encontraram alterações no  $K_m$  e  $V_{max}$  da AChE em cérebro de rato exposto a cipermetrina e permetrina isolados, mas registraram alterações quando estes dois foram testados juntos, indicando um tipo sinérgico de inibição destes piretróides, no qual ambos se ligariam simultaneamente, devido a sua natureza hidrofóbica, em sítios da AChE, impedindo a ligação da acetilcolina e levando à redução da atividade da AChE.

A deltametrina aumentou significativamente a atividade específica da AChE muscular na concentração de 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Analisando-se as atividades das três primeiras concentrações de deltametrina (1, 2 e 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), foi possível observar uma tendência de diminuição da AChE. Baldiou e Belzunces (2008) encontraram uma diminuição e aumento da atividade da AChE em abelhas mortas e sobreviventes, respectivamente, após exposição de 0,001  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de deltametrina, e apoiaram a hipótese de que a exposição ao inseticida deltametrina pode ter diminuído a atividade da AChE inicialmente e, em seguida, ter ativado um mecanismo compensatório após uma possível inibição causada pelo inseticida, na qual haveria o acúmulo de acetilcolina no tecido e, conseqüentemente, geraria um aumento da atividade da enzima AChE.

No geral, inibições da enzima AChE são reportadas na literatura para peixes sob o efeito de piretróides. Soares (2016) observou uma diminuição de até 53% da atividade de AChE cerebral de *Brycon amazonicus* em ensaio *in vitro* com exposição a 0,42, 0,84 e 1,26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de deltametrina para esta espécie em um tempo de incubação de 1 hora, mesmo tempo usado no presente trabalho. Moraes (2013) também relatou diminuição desta enzima

em tecido nervoso da mesma espécie exposta a 1 mM de cipermetrina (piretróide). Com isso, podemos inferir que há relação entre a DT e o sistema colinérgico do tecido muscular de *M. cf. bilineatus*, que provocou um aumento da atividade da AChE em 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Essa relação poderia ser melhor investigada se fosse testado um tempo maior de incubação da DT sobre a atividade da AChE.

## 5.2 Ensaio *in vivo*

As alterações comportamentais observadas nos grupos expostos à deltametrina apresentaram semelhança com o tipo de alteração que inseticidas piretróides do tipo II provocam em peixes, como a natação rápida e circular, que poderia estar indicando um dano direto ao sistema nervoso (Glickman *et al.* 1982; Bradbury *et al.* 1987; Rice *et al.* 1997). Estas alterações são comumente relatadas em animais expostos a piretróides e incluem tremores, perda de equilíbrio e letargia (Werner e Moran, 2008).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com dados extraídos de outros estudos com representantes da ictiofauna amazônica, observa-se que os valores de  $\text{CL}_{50}$  da DT apresentam variações altas, de acordo com a espécie de peixe, no entanto, todas as concentrações se apresentam na ordem de microgramas (Tabela 4). Alguns trabalhos demonstram diferenças de sensibilidade entre espécies de peixes quando expostas a um mesmo poluente (Baird *et al.* 2007; Souza, 2014). No geral, as diferenças de respostas de peixes a poluentes são influenciadas por fatores, como a formulação comercial do produto, a estereoquímica da molécula, além de características da espécie em estudo envolvendo tamanho, relação superfície/volume, comportamento alimentar e estágio de desenvolvimento do animal (Moraes, 2013). Souza (2014) encontrou o maior valor de  $\text{CL}_{50}$  de exposição à deltametrina para a espécie *Corydoras schwartzi*. Essa resposta pode ser explicada pela presença de respiração aérea nesta espécie e menor dependência das brânquias, que permitem à mesma uma elevada capacidade de sobrevivência em condições extremas (Matsuo; Val, 2002).

A Glutathione-S-transferase vem sendo bastante utilizada como biomarcador de peixes expostos a diferentes poluentes devido a sua importância na desintoxicação de xenobióticos. Diminuições e aumentos das atividades desta enzima foram registrados em trabalhos com o efeito de agrotóxicos (principalmente herbicidas e inseticidas). O aumento



da atividade da GST muscular encontrado neste trabalho foi similar aos resultados encontrados em outros estudos que também utilizaram inseticidas como contaminantes (Rao, 2006; Monteiro *et al.* 2006; Maduenho e Martinez, 2008; Dong *et al.* 2013). Este aumento na atividade da GST encontrado no músculo de *M. cf. bilineatus* pode indicar uma resposta do tecido muscular para desintoxicação da DT. Com isso, o músculo pode desempenhar um importante papel local para eliminação de poluentes e proteção do órgão elétrico. Um segundo mecanismo pode estar ligado ao papel da GST na ação contra produtos gerados por eventos de estresse oxidativo (Hayes *et al.* 2005). Parkes *et al.* (1993) mostraram que a GST e a GSH podem apresentar papel na prevenção, por conjugação com espécies reativas, ou no reparo por desintoxicação de produtos de peroxidação lipídica, de danos oxidativos em *Drosophila melanogaster* e sugeriram seu possível envolvimento na resistência a inseticidas. Vontas *et al.* (2001) observaram um aumento na GST da cigarra *Nilaparva talugens* seguida de uma diminuição da peroxidação lipídica induzida quando expostos aos piretróides permetrina e cialotrina. Estes autores concluíram que a GST tem papel na proteção de tecidos que estão sujeitos ao estresse oxidativo causado por inseticidas e que, conseqüentemente, provoca o aumento da atividade desta enzima. Muitos trabalhos notaram a eficácia da GST hepática na desintoxicação de xenobióticos, por ser o fígado a principal fonte de GST em peixes. Por exemplo, Simonato *et al.* (2006) registraram um aumento da atividade da GST hepática de *Prochilodus lineatus* expostos ao óleo diesel. No entanto, tal resposta não foi observada nesse estudo. Como os mecanismos de defesa por meio da GST de *M. cf. bilineatus* foram detectados especialmente no tecido muscular, podemos inferir que este mecanismo da GST pode ocorrer tanto pela ação da conjugação da GSH ao xenobiótico ou ao metabólito produzido, como também pela ação da GST em produtos oxidativos gerados pela intoxicação do inseticida deltametrina.

Na literatura, há relatos sobre alterações nas atividades da acetilcolinesterase em ensaios *in vivo* causadas por exposição de peixes à deltametrina (Bálint *et al.* 1995; Rossi, 2013; Soares, 2016). Bálint *et al.* (1995) registraram uma diminuição de 20% da atividade da AChE no soro sanguíneo em *Cyprinus carpio* exposto à 2 µg.L<sup>-1</sup> de DT. No presente trabalho, não houveram alterações significativas nas atividades da AChE nos ensaios *in vivo*. Szegletes *et al.* (1995) também não encontraram alterações na atividade desta enzima em *Cyprinus carpio* exposta à concentração de 2 µg.L<sup>-1</sup> de DT, porém, houve uma alteração na distribuição das formas moleculares da AChE, indicando que a DT pode agir

na AChE mesmo sem alterar sua atividade. O fato é que o mecanismo de ação da DT inclui a inibição dos receptores nicotínicos de acetilcolina, que poderiam alterar indiretamente a atividade da AChE, mas o efeito inibitório direto da deltametrina sobre esta enzima ainda é pouco conhecido, como foi observado nos ensaios *in vitro*. Para Hossain *et al.* (2004), a deltametrina age na liberação de acetilcolina no hipocampo e essa liberação poderia induzir um mecanismo compensatório, onde a AChE seria estimulada a realizar uma regulação positiva adaptativa na hidrólise de acetilcolina. No entanto, Hossain *et al.* (2005) não encontraram efeito direto da deltametrina na atividade da AChE em cérebro de rato, mas observaram um aumento da atividade da HACU, mecanismo de absorção de colina dependente de Na<sup>+</sup>, que mantém a regulação de colina nos neurônios colinérgicos e, conseqüentemente, regula a síntese de acetilcolina realizada pela colina acetiltransferase, mostrando que a deltametrina está relacionada com processos colinérgicos, mas não diretamente sobre a atividade da enzima AChE. A interação entre piretróides e a enzima acetilcolinesterase deve ser melhor investigada em trabalhos futuros.

### Conclusão

A deltametrina é um inseticida altamente tóxico para indivíduos de *Microsternarchus cf. bilineatus* com concentração letal (CL<sub>50-96</sub> horas) de 2,15 µg.L<sup>-1</sup>. Para os períodos de exposição testados neste estudo, a AChE não foi claramente afetada pela deltametrina. De igual modo, a GST hepática não foi induzida nos indivíduos expostos. Por outro lado, a GST muscular foi induzida nos animais submetidos a concentrações agudas de deltametrina. Em resumo, a AChE não se mostrou um bom marcador bioquímico em *M. cf. bilineatus* expostos à deltametrina. Porém, a GST muscular foi induzida, provavelmente como um mecanismo para eliminar o poluente neste tecido, que pode ser por desintoxicação do xenobiótico, por meio da conjugação, ou por ação da GST em produtos gerados por estresse oxidativo. Os resultados de toxicidade encontrados neste trabalho podem também ser explicados pela ação da deltametrina em outras vias de intoxicação, como os canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem e receptores GABA, o que torna sugestivo investigar a ação deste piretróide em outros mecanismos fisiológicos destes peixes, como por exemplo, o efeito na sua eletrofisiologia, uma vez que células elétricas são ricas em canais de Na<sup>+</sup> e o funcionamento regular destes canais

controla a passagem dos impulsos elétricos que irão gerar as descargas do órgão elétrico destes peixes.

### Agradecimentos

Agradecemos à Rúbia Neris do Laboratório de Morfologia Funcional do INPA pelo apoio e suporte nas análises bioquímicas.

### Referências Bibliográficas

Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2): 298–318.

Alves-Gomes, J. A. 2001. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology*, 58: 1489-1511.

Anvisa, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>). Acesso em 04.06.2017.

Assis, C. R., Linhares, A. G., Oliveira, V. M., França, R. C. P., Carvalho, E. V. M., Bezerra, R. S., Carvalho, L.B. 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*, 441:141–150.

Badiou, A., Meled, M., & Belzunces, L. P. 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase—a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69: 246-253.

Balendiran, G. K., Dabur, R., Fraser, D. 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell biochemistry and function*, 22: 343–352.

Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z.S., Halasy, K., Nemcsók, J. 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33: 279-295.

Bastian, J. 1994. Electrosensory organisms. *Physics Today*, 30-37.

Bradbury, S. P.; Mckim, J. M.; Coats, J. R. 1987. Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute fenvalerate intoxication. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 27: 275-288.

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

Braz-Mota, S.; Sadauskas-Henrique, H.; Duarte, R. M.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. 2015. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135:53–60.

Bullock, T. H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Hellingenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D. L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T.A. 1979. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico eletrorecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. *Acta Amazônica*, 9 (3): 549-572.

Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 1–9.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88–95.

Glickman, A.H., Weitman, S.D., Lech, J.J. 1982. Differential toxicity of transpermethrin to rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation. *Toxicology and applied pharmacology*, 66: 153–161.

Gray JR, L.E.; Otsby, J. 1998. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicology and Industrial Health*, 14:159-184.

Guiloski, I. C.; Silva, E. G; Nishikawa, C. M.; Silva de assis, H. C. 2010. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais*, 8: 461-468.

Hagedorn, M. 1986. The ecology, courtship and mating of gymnotiform fish. *In*: Bullock, T. H.; Heiligenberg, W. (Ed.) *Electroreception*. Wiley-Interscience, publication, New York, p. 497-527.

Haverinen, J.; Vornanen, M. 2016. Deltamethrin is toxic to the fish (crucian carp, *Carassius carassius*) heart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129: 36-42.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 45: 51-88.

Hernandez-Moreno, D.; Soler, F.; Moguez, M. P.; Perez-Lopez, M. 2010. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of

continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of the Total Environment*, 408: 4976–4983.

Hopkins, C. D. 1974. Electric communication in fish. *American Scientist*, 62: 426-437.

Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., & Kobayashi, H. 2004. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *Neurotoxicology*, 25:825-833.

Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., & Kobayashi, H. 2005. Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life sciences*, 77: 795-807.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251: 6183–6188.

Kumar, A.; Rai, D. K.; Sharma, B.; Pandey, R. S. 2008.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in-vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93: 96-99.

Maduenho, L. P.; Martinez, C. B. R. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148: 265–272.

Marrero C, Taphorn D. 1991. Notas sobre la historia natural y la distribución de los peces Gymnotiformes en la cuenca del río Apure y otros ríos de la Orinoquia. *Biollania*, 8: 123–142.

Meng, L.; Pierre-Francois, N. R. M., Leary, M. L.; Mohammed Y. F.; Ferber, S. D.; Lin, J. W. 2016. Effects of Deltamethrin on crayfish motor axon activity and neuromuscular transmission. *Neuroscience Letters*, 617: 32–38.

Moraes, F. D., Venturini, F. P., Cortella, L. R. X., Rossi, P. A., & Moraes, G. 2013. Acute toxicity of pyrethroid-based insecticides in the Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2): 59-64.

Moraes, F. D. 2013. Estudos das respostas bioquímicas-fisiológicas e histopatológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz, 1829) exposto a cipermetrina (Galgotrin®). Dissertação de doutorado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 142p.

Monteiro, D. A.; Almeida, J. A.; Rantin, F. T.; Kalinin, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 141–149.

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

Parkes, T. L., Hilliker, A. J. and Phillips, J. P. 1993 Genetic and biochemical analysis of glutathione S-transferases in the oxygen defence system of *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 36:1007-1014.

Patar, A. A.; Hassan, W. R. M; Yusof, F. Z. M. 2015. Toxicity of malathion, dichlorvos and temephos on acetylcholinesterase in climbing perch (*Anabas testudineus*). *Advances and Environmental Biology*, 9: 81-86.

Pimpão, C.T.; Zampronio, A.R.; Silva de Assis, H.C. 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 122–127.

Rao, G.V.; Rao, K.S.J. 1995. Modulation in Acetylcholinesterase of Rat Brain by Pyrethroids *In Vivo* and an *In Vitro* Kinetic Study. *Journal of neurochemistry*, 65: 2259-2266.

Rao, J.V. 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline Wsh, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 78–84.

Reddy, P.M.; Philip, G.H. 1994. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 52: 619-626.

Rice, P. J.; Drewes, C. D.; Klubertanz, T. M.; Bradbury, S. P.; Coats, J. R. 1997. Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 696–704.

Rossi, P.A. 2013. Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) exposto a um inseticida a base de deltametrina. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 89p.

Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10(12).

Santos, M. A. T.; Areas, M. A.; Reyes, F. G. R. 2007. Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, 18: 339-349.



Silva de Assis, H. C.; Nicareta, L.; Salvo, L. M.; Klemz, C.; Truppel, J. H.; Calegari, R. 2009. Biochemical Biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multipinns*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 401-1407.

Soares, C. A. P. 2016. Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus* (matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 70p.

Soreq, H.; Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old factor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2.4: 294-302.

Souza, T. 2014. Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 53p.

Simonato, J. D., Guedes, C. L., & Martinez, C. B. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 112-120.

Szegletes, T.; Balint, T.; Szegletes, Z.; Nemcsok, J. 1995. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 258-263.

Vontas, J. G., Graham, J., & Hemingway, J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357: 65-72.

Waichman, A.V.; Römbke, J.; Ribeiro, M. O. A.; Nina, N. C. S. 2002. Use and fate of pesticides in the Amazon State, Brazil: Risk to human health and the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 9.6: 423-428.

Waichman, A.V.; Eve, E.; Nina, N. C. S. 2007. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26: 576-583.

Werner I, Moran K. 2008. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. *In: ACS symposium series*. Oxford University Press: 310-334.

Who – World health organization. 1990. Environmental Health Criteria 97 Deltamethrin. Geneva:International Programme on Chemical Safety – IPCS.

Figura 1. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* em ensaio *in vitro* expostos ao inseticida deltametrina. \*Indica diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Figura 2. Atividade da glutiona-S-transferase (GST) muscular de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* em ensaio *in vivo* expostos ao inseticida deltametrina. \*Indica diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água (Média  $\pm$  DP) dos experimentos relativos ao ensaio *in vivo* em *Microsternarchus cf. bilineatus* durante 96 horas de exposição a diferentes concentrações do inseticida deltametrina. As medições foram feitas a cada 24 horas, cada grupo contendo uma duplicata.

Parâmetros	Tratamentos					
	Controle	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	27,80 $\pm$ 0,9	27,70 $\pm$ 1,0	27,70 $\pm$ 1,1	27,60 $\pm$ 1,1	27,80 $\pm$ 0,9	27,60 $\pm$ 0,8
Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	16,00 $\pm$ 4,5	15,00 $\pm$ 2,1	15,00 $\pm$ 3,7	14,00 $\pm$ 2,7	15,00 $\pm$ 4,4	13,00 $\pm$ 3,5
pH	6,90 $\pm$ 0,5	7,10 $\pm$ 0,4	7,10 $\pm$ 0,5	7,00 $\pm$ 0,5	7,10 $\pm$ 0,5	7,00 $\pm$ 0,5
Oxigênio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6,30 $\pm$ 0,4	5,90 $\pm$ 0,4	5,90 $\pm$ 0,8	5,40 $\pm$ 0,4	5,80 $\pm$ 0,9	5,90 $\pm$ 0,6
Na <sup>+</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,63 $\pm$ 0,7	1,49 $\pm$ 0,3	1,67 $\pm$ 0,5	1,65 $\pm$ 0,5	2,04 $\pm$ 1,0	1,64 $\pm$ 0,4
K <sup>+</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,39 $\pm$ 0,5	0,37 $\pm$ 0,5	0,40 $\pm$ 0,5	0,34 $\pm$ 0,5	0,61 $\pm$ 0,5	0,44 $\pm$ 0,5
Ca <sup>2+</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,10 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,1	0,14 $\pm$ 0,1	0,08 $\pm$ 0,2

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da enzima acetilcolinesterase (AChE) em tecido muscular e nervoso de *Microsternarchus cf. bilineatus* expostos à deltametrina. Os valores de  $K_m$  estão expressos em mmol e  $V_{max}$  em nmol de acetiltiocolina iodada/min/mg proteína.

Tratamentos	Parâmetros cinéticos enzimáticos			
	$K_m$ (Músculo)	$V_{max}$ (Músculo)	$K_m$ (Nervoso)	$V_{max}$ (Nervoso)
0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,5	270	0,3	32
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4	303	0,4	34
5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4	348	0,4	37
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3	323	0,3	31
50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3*	225	nd	nd

\*indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Nd: não determinado.

Tabela 3. Atividades das enzimas AChE e GST (Média  $\pm$  DP) em tecido muscular, nervoso e fígado de *Microsternarchus cf. bilineatus* em ensaio *in vivo* (96 horas). As atividades das enzimas estão expressas em nmol/min/mg proteína.

Tratamentos	Enzimas		
	GST (Fígado)	AChE (Músculo)	AChE (Cérebro)
0 $\mu\text{g L}^{-1}$	29,3 $\pm$ 12,9	1.112,2 $\pm$ 346,1	41,3 $\pm$ 29,8
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	25,8 $\pm$ 20,3	1.293,3 $\pm$ 387,2	47,4 $\pm$ 21,5
2 $\mu\text{g L}^{-1}$	27,0 $\pm$ 19,5	1.385,5 $\pm$ 461,0	61,6 $\pm$ 18,3
3 $\mu\text{g L}^{-1}$	17,5 $\pm$ 3,8	1.300,2 $\pm$ 287,0	43,5 $\pm$ 14,8
4 $\mu\text{g L}^{-1}$	29,2 $\pm$ 22,7	1273,4 $\pm$ 445,4	53,4 $\pm$ 17,4
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	38,5 $\pm$ 28,8	1.330,5 $\pm$ 295,9	41,3 $\pm$ 20,6

Tabela 4. Mortalidade de indivíduos de *Microsternarchus* cf. *bilineatus* expostos ao inseticida deltametrina por 96 horas.

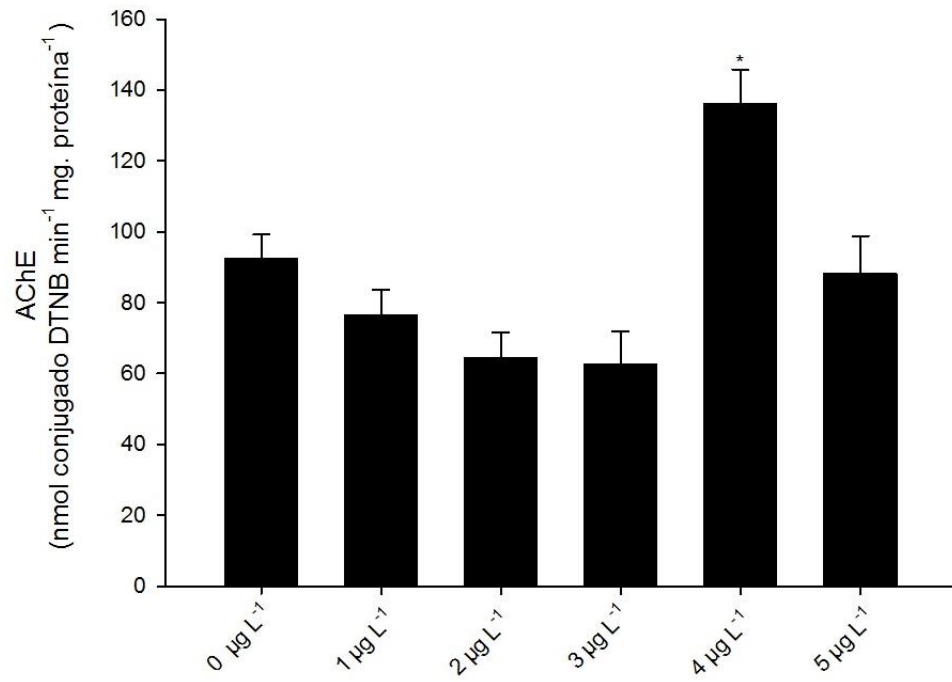
Tratamentos	N final	Mortalidade (%)
0 $\mu\text{g L}^{-1}$	14	0
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	12	14
2 $\mu\text{g L}^{-1}$	8	43
3 $\mu\text{g L}^{-1}$	4	71
4 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	79
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1	93

O número inicial de peixes foi n= 14

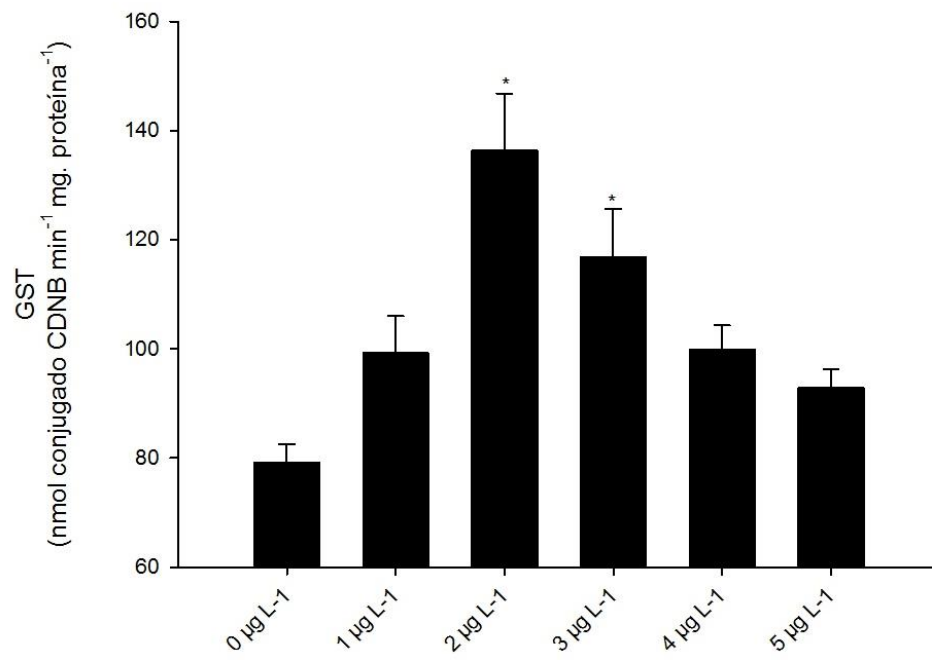
Tabela 5. Concentração mediana letal ( $CL_{50-96\text{horas}}$ ) do inseticida deltametrina registrada para diferentes espécies de peixes amazônicos.

Espécie	$CL_{50}(\mu\text{g.L}^{-1})$	Referências
<i>Microsternarchus</i> cf. <i>bilineatus</i>	2,15	Presente trabalho
<i>Brycon amazonicus</i>	2,6	Moraes <i>et al.</i> (2013)
<i>Carnegiella strigata</i>	4,0	Souza (2014)
<i>Colossoma Macropomum</i>	6,0	Souza (2014)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	17,3	Rossi (2013)
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	22,0	Souza (2014)
<i>Hemigrammus rodhostomus</i>	24,0	Souza (2014)
<i>Corydoras schwartzi</i>	215,0	Souza (2014)

**Fig. 1**



**Fig. 2**



## **CAPÍTULO 2**

---

\*Artigo formatado de acordo com as normas da revista Acta Amazonica

**Efeito da deltametrina nos padrões de descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus*  
cf. *bilineatus***



## Resumo:

O inseticida deltametrina (DT) é um piretróide amplamente utilizado na agricultura. O uso desordenado deste químico pode contaminar os ecossistemas aquáticos de diversas formas, dentre elas, por meio da lixiviação e escoamento superficial. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes concentrações (0, 2, 3 e 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) de DT em parâmetros da descarga do órgão elétrico (DOE) de *Microsternarchus cf. bilineatus* para um tempo de exposição de três horas, e em seguida verificar se há recuperação destes indivíduos expostos ao inseticida, quando transferidos para água livre do poluente. Paralelamente, foram estimadas atividades das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) nos tecidos muscular, nervoso e hepático ao longo do experimento, não sendo detectadas alterações significativas destas enzimas nos tecidos avaliados para este tempo de exposição. A DT alterou os parâmetros das DOEs dos peixes na primeira hora de exposição em todas as concentrações. A Taxa Média (Hz) foi o parâmetro que mais respondeu aos efeitos testados na análise. O efeito de diminuição da Taxa Média foi maior na concentração de 3 do que na de 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esse padrão não linear de resposta ao inseticida pode estar relacionado com a ativação de mecanismos de compensação fisiológica e bioquímica internos destes peixes, quando expostos a altas concentrações do poluente. Este efeito não linear não parece estar associado a um efeito mais agudo da deltametrina na concentração de 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  do que na de 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , pois o tempo de resposta foi menor para 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  do que para 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , indicando um efeito dose-dependente do inseticida deltametrina.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase, Biomonitoramento, Deltametrina, Descarga do órgão elétrico, Glutathione S-Transferase, Gymnotiformes, *Microsternarchus cf. bilineatus*, Piretróide.

## 1. Introdução

A Ordem Gymnotiformes abriga os peixes elétricos da América do Sul. Esse grupo pode representar cerca de 90% da fauna bentônica das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (Hagedorn, 1986; Marrero e Taphorn, 1991; Moller, 1995). Os peixes elétricos apresentam como característica mais peculiar, a presença de um órgão elétrico constituído por células eletrogênicas e um sistema de eletrorecepção distribuído por toda a superfície do corpo. O órgão elétrico e os órgãos eletroreceptores atuam em conjunto compondo o Sistema Eletrogênico e Eletrosensório (SEE) (Alves-Gomes *et al.* 1995; Alves-Gomes, 2001). Os eletroreceptores monitoram constantemente o campo elétrico gerado a cada descarga do órgão elétrico (DOE). Distorções neste campo podem ser causadas por organismos ou objetos que possuam uma condutividade elétrica diferente da água onde o peixe se encontra e, desta forma, o SEE permite que os gymnotiformes obtenham informações sobre o meio em que se encontram, mesmo no escuro (Hopkins, 1974; Bullock *et al.* 1979; Hagedorn e Carr, 1985). Estudos realizados em vários laboratórios independentes também têm demonstrado que estes peixes mudam o padrão das suas descargas elétricas como resposta a mudanças físicas e químicas da água onde se encontram. Por esta razão, estes peixes possuem um grande potencial para serem usados em sistemas de biomonitoramento de ambientes aquáticos de água doce.

Neste sentido, alguns trabalhos foram realizados sobre o efeito de poluentes nas características biofísicas das descargas de peixes gymnotiformes (Pimentel-Souza, 1988; Pimentel-Souza e Siqueira, 1992; Thomas *et al.* 1996a, 1996b; Thomas, 2000; Rossoni, 2005; Schwertner, 2005; Ferreira, 2009; Moraes *et al.* 2013; Nunes, 2016). Thomas *et al.* (1996 a ou b?) propuseram um sistema de monitoramento biológico com o uso da espécie *Apteronotus albifrons*, da família Apteronotidae. Este sistema desenvolvido em laboratório visou fornecer informações rápidas e automatizadas sobre mudanças na qualidade da água do ambiente, por meio da mensuração de mudanças no comportamento elétrico de *A. albifrons*. Para um sistema de biomonitoramento, com o uso destes peixes, ser efetivo e poder funcionar como um sistema de alarme, é necessário que as respostas sejam detectadas em tempo real, e que os peixes respondam logo nas primeiras horas de exposição.

Alguns estudos comportamentais têm sido realizados com o gênero *Microsternarchus*, principalmente devido à estabilidade temporal do seu padrão de descarga, quando comparado ao das outras espécies (Nogueira, 2006; Ferreira, 2009; Petersen, 2013; Vargas, 2014; Nunes, 2016). Esta estabilidade temporal é um ponto chave para a viabilização desta espécie como biomonitor de qualidade de ambientes aquáticos. Além disso, estes peixes são abundantes em igarapés do baixo Rio Negro, o que possibilita uma continuidade em estudos de biomonitoramento.

Ainda que na literatura haja trabalhos sobre os efeitos de diferentes substâncias nas DOEs de espécies do gênero *Microsternarchus*, ainda não há estudos sobre o efeito de agrotóxicos nas descargas destes peixes. Por outro lado, devido ao aumento do consumo de agrotóxicos no Brasil, a preocupação com a contaminação de ecossistemas aquáticos por esses químicos e poluentes em potencial tem crescido. Os agrotóxicos podem alcançar os diferentes tipos de ambientes aquáticos de várias formas, incluindo a lixiviação e escoamento superficiais (ambos aumentados em áreas de desmatamento), uso intensivo desses produtos de forma inadequada, descarte inadequado de embalagens, dentre outras. Os agrotóxicos presentes nos ecossistemas aquáticos podem penetrar nos organismos pela superfície do corpo, principalmente através das brânquias e cavidade oral e também pela ingestão da água e de alimentos contaminados (Tomita e Beyruth, 2002).

Segundo Waichman *et al.* (2002; 2007) em uma avaliação sobre o uso de agrotóxicos nos municípios de Manaus, Manacapuru, Iranduba e Careiro da Várzea, foi observado que os agricultores destas localidades utilizavam dezoito tipos diferentes de agrotóxicos. Destes, 11 são inseticidas, sendo a deltametrina a mais utilizada. A deltametrina é um piretróide do tipo II e age no sistema nervoso central de invertebrados e vertebrados (Verschoyle e Aldridge, 1980). Seus mecanismos de ação incluem efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh), em receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e em canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem, resultando numa ativação persistente destes canais de  $\text{Na}^+$  e despolarização da membrana (Demoute, 1989). Por apresentar uma característica lipofílica, este inseticida possui uma alta taxa de absorção através das brânquias dos peixes, o qual pode explicar, em parte, a alta sensibilidade destes animais à exposição por estes piretróides (Santos *et al.* 2007).

Diversos biomarcadores bioquímicos são comumente utilizados para avaliar os mecanismos de toxicidade em peixes expostos a diferentes agrotóxicos (Haluzová *et al.* 2011; Dong *et al.* 2013; Braz-Mota *et al.* 2015). Devido ao seu papel na desintoxicação de xenobióticos, a glutatona-S-transferase (GST) tem sido usada para avaliar possíveis mecanismos bioquímicos de defesa de *M. cf. bilineatus* frente à exposição da deltametrina. Esta enzima é muito importante para a fase II de biotransformação de xenobióticos, atuando por conjugação da glutatona reduzida (GSH) ao metabólito produzido pela fase I de biotransformação, ou diretamente ao xenobiótico (Balendiran *et al.* 2004). Da mesma forma, a enzima acetilcolinesterase (AChE) tem papel essencial na manutenção das funções nervosas. Sua inibição gera um acúmulo de acetilcolina nas sinapses químicas que resulta em uma transmissão contínua e desordenada dos impulsos nervosos (Soreq e Seidman, 2001). A inervação das células órgão elétrico de peixes gymnotiformes é controlada por sinapses colinérgicas e a deltametrina age nos receptores nicotínicos da acetilcolina, podendo agir na enzima AChE e alterar o padrão de funcionamento do órgão elétrico.

Neste estudo, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do inseticida deltametrina nas propriedades biofísicas da DOEs de *Microsternarchus cf. bilineatus*, ao mesmo tempo que as atividades das enzimas GST e AChE foram medidas em diferentes tecidos dos indivíduos expostos. O tempo de exposição foi de três horas, buscando-se estabelecer se este espaço de tempo seria suficiente para alterar o metabolismo destes peixes de forma significativa, o que é importante na consolidação de um sistema de biomonitoramento de qualidade de água em tempo real e de prevenção de acidentes.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Área de coleta e manutenção dos peixes em cativeiro

As coletas foram realizadas no igarapé Tapuru (licença/SISBIO/55408-2) no município de Novo Airão (S 02° 43' 38.1"; O 60° 57' 39.5") a 180 km de Manaus. Foram coletados 40 espécimes de *Microsternarchus cf. bilineatus* pesando  $0,89 \pm 0,33$  g e medindo  $6,79 \pm 0,90$  cm de comprimento (média  $\pm$  DP). Os peixes foram aclimatados no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE) do Instituto Nacional de

Pesquisas da Amazônia (INPA), mantidos em aquários de manutenção com volume de 40 litros, com filtração e aeração constante, com água advinda do poço artesiano do INPA ( $\text{Na}^+$  1,68  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ;  $\text{K}^+$ , 0,41  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ; 0,07  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ ; pH 6,84; oxigênio dissolvido 5,92  $\text{mg.L}^{-1}$ ; condutividade de 20,2  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  e temperatura de 28° C). Essa água foi mantida em um tanque de 1.000 litros com filtração biológica e aeração constante por pelo menos sete dias antes de ser usada nos aquários dos peixes. O tempo de aclimação dos peixes variou entre os grupos: foram quatro lotes de peixes com tempos de aclimação diferentes (4 meses, 2 meses e 2 semanas). Diariamente os animais foram alimentados com náuplios de *Artemia salina* e *Enchytraeus albidus*. Em seguida, os restos de alimentos e dejetos foram aspirados do fundo dos aquários e o nível da água completado ao nível inicial. A temperatura da água dos aquários experimentais foi mantida entre 25 e 27 °C com o auxílio de um condicionador de ar externo.

## 2.2 Procedimento experimental

A deltametrina foi adquirida a partir da formulação comercial Decis® CE (Bayer Vapi PVT LTD, Gujarat, Índia). Foi preparada uma solução-estoque de 25  $\text{mg L}^{-1}$  a partir do formulado. As concentrações selecionadas para o experimento de gravação foram definidas em função da concentração mediana letal ( $\text{CL}_{50}$ ) do inseticida deltametrina em indivíduos de *Microsternarchus cf. bilineatus* determinada no Capítulo 1 deste trabalho. Usou-se a  $\text{CL}_{50}$  como referência e, a partir dela foram testadas doses com concentrações crescentes, uma vez que o objetivo também foi testar o efeito destas doses nas primeiras horas após exposição. Assim, foram testadas as concentrações de 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $\text{CL}_{50}$ ), 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (150%  $\text{CL}_{50}$ ) e 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (200%  $\text{CL}_{50}$ ).

Para cada grupo amostral foram utilizados 10 indivíduos, além de mais 10 indivíduos que foram usados no grupo controle (0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Antes do período de gravação, os peixes foram aclimatados por duas horas já dentro dos cilindros, no fundo do aquário experimental. Cada peixe foi gravado por oito horas, sendo as primeiras duas horas de gravação consideradas como pré-exposição, 3 horas de exposição e mais três horas de recuperação.

Após o período de aclimação, a fase pré-exposição foi iniciada. A fase pré-exposição é uma fase do experimento cujo objetivo é monitorar os parâmetros da descarga

dos peixes em estado normal, antes de serem expostos ao contaminante. Este período também serve de controle para cada indivíduo nas análises estatísticas. A fase de exposição inicia-se com a adição do inseticida na água. Após o final da fase de exposição, os peixes foram transferidos para um outro aquário com água livre do contaminante para se avaliar a recuperação destes animais. Nesta fase de recuperação, o objetivo foi observar se existe um restabelecimento do padrão de descarga dos peixes após o período de exposição ao contaminante para valores obtidos no período que antecedeu à exposição à deltametrina.

No final das gravações todos os peixes foram anestesiados por hipotermia e eutanasiados por secção medular, pesados, medidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C para estudos posteriores. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do INPA (Protocolo 020/2016).

### 2.3 Gravações das DOEs

Para gravação dos sinais elétricos, os peixes foram transferidos dos aquários de manutenção para aquários experimentais de 12L. O sinal elétrico (DOE) dos peixes foi captado por três eletrodos (eletrodo positivo na frente da cabeça, eletrodo negativo atrás da cauda e eletrodo de referência no meio, entre os dois). A amplificação do sinal variou entre 50 e 1.000 vezes, dependendo do tamanho do peixe, e foi feita por intermédio de um amplificador modelo BMA-200 (CWE Inc., Ardmore PA, USA). Após amplificado, o sinal foi digitalizado com 14 bits de resolução por um conversor analógico-digital Datatranslation® (DT 9804, Data Translation Inc., Marlboro, USA). O sinal digitalizado foi monitorado em um osciloscópio Tektronik® (TDS 2024, Tektronix Inc., Beaverton, USA), ao mesmo tempo foi gravado em um computador para análises posteriores. O aquário experimental foi colocado dentro de uma caixa de Faraday para minimizar os ruídos elétricos externos. Para manter a orientação em relação aos eletrodos e evitar movimentos que prejudicassem a captação dos sinais elétricos, os peixes foram acomodados em cilindros plásticos perfurados, colocados no fundo do aquário. As descargas elétricas foram registradas de 10 em 10 minutos por um período de 5 segundos, durante todo o tempo do experimento.

### 2.3.1 Extração dos dados das DOEs

Um protocolo desenvolvido com software MATLAB 7.6.0® controlou a aquisição do sinal elétrico. Nas gravações obtidas, um segundo protocolo desenvolvido em Matlab foi usado para automaticamente analisar os arquivos contendo as DOEs de cada indivíduo, em cada experimento. Este protocolo, resumidamente, calcula a média das descargas de cada indivíduo, para cada gravação de 5 seg, e desta média são extraídos uma série de parâmetros associados aos aspectos temporais e da forma de onda das DOEs. Entre os parâmetros calculados, os principais usados nas análises estatísticas comparativas foram: a Taxa Média de repetição, que representa o número de descargas do órgão elétrico que o peixe realiza durante cada segundo, computado como a média dos cinco segundos. Este valor é apresentado como o número de descargas por segundo e expressas em Hertz (Hz); relação pico-a-pico (PPrel), que é a relação entre a amplitude da primeira fase (positiva) e a amplitude da segunda fase (negativa) do pulso; P/S ratio, que é a relação entre a duração efetiva da DOE e a duração da fase silenciosa; PPF (Peak Power Frequency), que é a frequência de maior energia dentre as frequências que compõem o sinal do peixe; Área total e duração da DOE, Área e duração relativas das fases 1, 2 e 3 (Figura 1).

## 2.4 Biomarcadores bioquímicos

### 2.4.1 Glutathione-S-transferase (GST)

As atividades da GST foram determinadas pelo método descrito por Keen *et al.* (1976). As amostras de tecido muscular e fígado foram retiradas de cada indivíduo e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM; pH 7,5). Os homogeneizados foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g, e o sobrenadante foi usado para estimar a atividade da enzima. Resumidamente, 30 µL da amostra foi adicionado em 120 µL de tampão de ensaio contendo 1 mM de glutathione reduzida (GSH). O substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) foi omitido para o controle. A concentração de substrato foi previamente estimada para cada tecido, sendo 0,16 mM para o tecido muscular e 0,77 mM para o fígado, conforme o  $K_m$  da enzima. A alteração na absorvância foi registrada a 340 nm, e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 9,6

$\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  As atividades da enzima foram expressas em  $\text{nmol CDNB min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ . As proteínas totais foram estimadas pelo método de Bradford (1976).

#### 2.4.2 Acetilcolinesterase (AChE)

Atividades da enzima AChE foram determinadas pelo método de Ellman *et al.* (1961), utilizando acetiltiocolina iodada (AtCh) como substrato. As amostras de tecido muscular e nervoso foram retiradas e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM; pH 7,5). Os homogeneizados foram centrifugados por 5 minutos a 10.000, e o sobrenadante foi usado para estimar a atividade da enzima. Utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  da amostra (homogeneizados) em microplaca contendo 120  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio com a concentração de acetiltiocolina iodada estimada para cada tecido baseada na determinação do  $K_m$ . A alteração na absorvância foi registrada a 412 nm, e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de  $13,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . As atividades da enzima foram expressas em  $\text{nmol acetiltiocolina.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ . A concentração de proteína foi estimada pelo método de Bradford (1976).

### 3. Análises estatísticas

Para comparar os efeitos da fase experimental (pré-exposição, exposição e recuperação); as concentrações (0, 2, 3 e 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); o tempo de observação experimental e a interação entre o tempo e a fase experimental nos parâmetros de descarga foi usado o Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM). As variáveis fixas em todos os modelos foram as mencionadas acima, e Taxa Média, PPrel e P/Sratio foram as variáveis dependentes. Para controlar a dependência das amostras (medidas feitas no mesmo indivíduo repetidas vezes), o peixe (cada indivíduo testado) e o lote a que o peixe pertenceu entraram como variáveis randômicas nos modelos. Essa estrutura analítica levou em consideração a individualidade das alterações nos parâmetros de descarga de cada peixe e permitiu a análise de todos os peixes em conjunto sem precisar transformar ou padronizar os valores. Foram feitos testes *pos hoc* para comparar os efeitos dentro dos



tratamentos (concentração e fase experimental). Foi aplicada a correção de Bonferroni para testes múltiplos, mas para evitar o erro tipo I, foi adotado o nível de significância = 0,001. Por fim, verificou-se o ajuste dos modelos inspecionando gráficos de resíduos diagnósticos. As análises e gráficos resultantes foram feitos no programa R (R Core Team 2016), usando os pacotes *lme4* (Bates et al. 2015), *multcomp* (Hothorn et al. 2008) e *ggplot2* (Wickham 2009).

Como análise complementar, foi feita um teste de correlação cruzada (cross-correlation) entre os sinais dos peixes individualmente, para cada concentração e para cada fase do experimento. Nesta análise, a média do sinal elétrico (DOE) de cada peixe, obtida na primeira gravação do experimento (pré-exposição) foi comparada por meio de uma análise de correlação cruzada com a DOE média de cada gravação subsequente. Desta forma, para cada peixe, houve 47 valores de correlação cruzada para cada concentração testada (t1xt2, t1xt3... t1xt48), sendo 11 durante o pré-teste, 18 durante o período de teste e 18 durante o período de recuperação. Nesta análise, o índice 1 significa que os sinais comparados foram idênticos. Os valores da correlação cruzada foram calculados segundo protocolo disponível na caixa de ferramenta para análise de sinais do programa MATLAB.

#### 4. Resultados

Dentre todos os parâmetros analisados, a Taxa Média, o PPrel e o P/S ratio mostraram mudanças significativas durante o período de exposição e recuperação. Estes parâmetros das DOEs estão relacionados tanto com o ritmo das descargas (Taxa Média) como com a forma da onda (PPrel e P/Sratio) (Tabela 1).

Foi observado efeito significativo da interação entre o tempo e a fase experimental em todos os três parâmetros analisados. Este resultado sugere que o efeito do tempo nos parâmetros analisados dependeu da fase experimental, ou seja, os parâmetros mudaram de formas distintas, ao longo do tempo, entre as fases experimentais (principalmente entre teste e recuperação). Mesmo havendo efeitos significativos desta interação entre os parâmetros analisados, só foi observado efeito significativo das diferentes fases experimentais isoladas na Taxa Média e no P/S ratio (Tabela 1). Diferenças entre as fases experimentais foram observadas em todas as comparações, inclusive no controle. No entanto, o mesmo efeito foi mais evidente nos grupos expostos à deltametrina.

Em relação à taxa de descarga, a tendência geral observada para todos os tratamentos, foi uma diminuição da Taxa Média durante a exposição e recuperação. Isto também foi observado no grupo controle, mas essa diminuição se apresentou com uma inclinação bem maior nos grupos expostos ao inseticida. Quando se compara a diferença entre a taxa de descarga entre a primeira e última hora de gravação (Tabela 4), somente foi observada diferença significativa nos peixes expostos à deltametrina e não no grupo controle. Na fase de recuperação os peixes tenderam a retornar à frequência inicial. Nos grupos expostos, esse retorno é lento e gradual, enquanto no controle há um retorno muito mais rápido após a manipulação dos peixes (período de teste), e a frequência se estabiliza rapidamente logo em seguida (Figura 2). Ainda que a mudança na Taxa Média tenha sido maior em valores absolutos, para a concentração de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que para  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , a maior concentração provocou uma diminuição considerável do desvio padrão da descarga durante exposição e recuperação. A diminuição do desvio padrão significa uma descarga mais estável e preditiva, o que não é observado nas concentrações menores. É um indicativo de que os peixes expostos ao inseticida reduziram suas taxas metabólicas à níveis mais basais. Todos os grupos recuperaram o padrão da Taxa Média inicial aos níveis pré-exposição (Tabela 2). Mas é possível notar na Figura 2 que o grupo exposto à concentração de  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  teve uma recuperação mais lenta, quando comparada com a dos outros grupos de tratamento. O P/S ratio teve o comportamento semelhante à Taxa Média (Figura 3), e o PPreel só teve efeito significativo na interação fase experimental e tempo (Figura 4).

Ainda é possível notar, nas figuras da Taxa Média, que as respostas ocorreram na primeira hora de exposição do inseticida, em 1 hora na concentração de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ , 30 minutos em  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em 10 minutos na concentração de  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Neste caso, o tempo de resposta foi definido como o momento em que a média das gravações dos peixes ficou abaixo do intervalo de confiança (baseado nas médias da pré-exposição). Isto aponta para um efeito dose-dependente da deltametrina nas DOEs de *Microsternarchus* (Figura 5).

Na análise de cross-correlation foi possível observar o mesmo padrão de respostas entre os diferentes tratamentos com o efeito de diminuição das frequências maior na concentração de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que em  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 6).

Não foram observadas alterações significativas nas enzimas AChE muscular e cerebral e na GST do fígado e muscular dos peixes expostos as diferentes concentrações do inseticida, para o período de três horas de exposição.

## 5. Discussão

Nossos resultados corroboram a hipótese na qual, para o tempo de exposição de três horas, as diferentes concentrações do inseticida deltametrina alteram de forma diferente os padrões de descarga do órgão elétrico de *Microsternarchus* cf. *bilineatus*. Na literatura encontram-se trabalhos que utilizam a Taxa Média (Hz) como parâmetro para avaliar o efeito de diferentes xenobióticos na descarga do órgão elétrico de peixes gymnotiformes (Schwertner, 2006; Rossoni, 2006; Ferreira, 2009; Moraes, 2013; Ferreira 2016, Nunes, 2016). O padrão de diminuição da frequência frente à exposição de xenobióticos parece ser uma resposta geral, comum e inerente a estes peixes quando expostos a um agente estressante, mesmo que somente mecânico. De fato, neste trabalho, o parâmetro que mais respondeu ao efeito da deltametrina foi a Taxa Média.

As alterações dos parâmetros das DOEs ocorridas no grupo controle também foram observadas por Nunes (2016), provavelmente devido aos procedimentos experimentais de manipulação. Mesmo considerando que neste trabalho o procedimento tenha sido brando, pois um pequeno volume de deltametrina foi diluído na água onde o peixe se encontrava do grupo exposto, e um pequeno volume de água no grupo controle, o efeito foi estatisticamente significativo. Ao compararmos as alterações no grupo controle com os outros grupos, porém, foi evidente o aumento do efeito das fases experimentais quando em exposição à deltametrina.

O efeito do tempo nos parâmetros das DOEs pode indicar um efeito cumulativo tempo-dependente do inseticida, pois os menores valores de frequência atingidos pelos peixes foram nas últimas horas de exposição ao inseticida (Tabela 4). O mesmo efeito foi observado na Taxa Média da descarga de *Gymnotus sylvius* em exposição crônica de metilmercúrio por 18 dias (Moraes, 2013). Diferentemente do que foi observado por Ferreira (2009) em *Microsternachus bilineatus* exposto à gasolina e ao óleo diesel, onde os peixes tenderam a retornar os valores da sua frequência ao padrão inicial, neste trabalho, o efeito da deltametrina permaneceu até o final da fase de exposição. Este fato pode ser

atribuído à característica de baixa taxa de eliminação de piretróides pelos peixes, quando comparados com mamíferos e aves. Experimentos com a truta arco-íris indicaram que a taxa de eliminação do piretróide fenvalerato foi muito menor do que em aves e mamíferos, sendo que 80 a 90% da dose permaneceram em amostras teciduais pelo período de 8 a 48 horas depois que a exposição foi cessada (Di Giulio e Hinton, 2008). Os peixes retêm os piretróides por mais tempo no organismo e alguns trabalhos indicam que isso se deve a deficiência de peixes em carboxilesterases, enzimas que participam da hidrólise de piretróides (Demoute, 1989; Bradbury e Coats, 1989).

O fato da diminuição da Taxa Média ter sido maior na concentração de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que em  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , caracteriza um padrão não linear de resposta das DOEs de peixes gymnotiformes a diferentes poluentes, fatos estes já registrados na literatura (Rossoni, 2005; Ferreira, 2009; Nunes, 2016). É possível que, dependendo da concentração e do tipo de poluente considerado, diferentes tipos de mecanismos de defesa e de compensação fisiológicos e bioquímicos internos seja acionados. A redução da Taxa Média de Descarga (TMD) parece ser uma resposta básica, que ocorre automaticamente para diferentes tipos de situações estressantes. Porém, a intensidade desta diminuição e o tempo necessário para o retorno aos valores iniciais do pré-teste, são o que diferenciam as respostas destes peixes às diferentes concentrações. Uma redução maior da TMD para a concentração de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que para  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  sugere que os gymnotiformes devem possuir um mecanismo regulador interno que liga e/ou desliga certos procedimentos de ajustes internos, quando os níveis de um determinado poluente (ou substância tóxica) atinge um determinado nível crítico no organismo. O efeito não linear de resposta da Taxa Média nas diferentes concentrações não parece estar associado a um efeito mais agudo da deltametrina na concentração de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que na de  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , pois se observarmos o tempo de resposta das frequências entre os tratamentos, o tempo de resposta foi bem menor para  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  do que para  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os peixes expostos à maior concentração de deltametrina ( $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ao invés de diminuírem constantemente a Taxa Média em resposta ao estímulo, mantiveram-na estável por um tempo. Esse comportamento pode estar associado à ativação destes mecanismos de compensação internos e também explicar a baixa variabilidade (desvio padrão) das frequências na concentração de  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , quando comparada com o desvio padrão das taxas de descargas nos grupos expostos às menores concentrações de deltametrina.

Estudos adicionais e específicos sobre estes mecanismos internos seriam necessários em gymnotiformes, mas é possível que um desses mecanismos de ajuste fisiológico interno frente à exposição de altas concentrações de poluentes esteja relacionado com a atividade da enzima GST. No Capítulo 1 deste trabalho, foi observado um aumento significativo da atividade desta enzima em concentrações de 2 e 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Na Tabela 3 é possível notar uma tendência de aumento da atividade da GST muscular na concentração de 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, as atividades da GST muscular e do fígado não tiveram alterações estatisticamente significativas. É possível, ainda, que a fase de recuperação tenha influenciado nestes resultados, já que os peixes foram transferidos para água limpa antes de terem suas atividades enzimáticas mensuradas.

A deltametrina age em receptores nicotínicos da acetilcolina e que podem afetar indiretamente a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Porém, neste trabalho, a ausência de diferenças significativas nas atividades da AChE cerebral e muscular de *Microsternarchus cf. bilineatus* entre os tratamentos experimentados, pode indicar que o tempo de exposição pode não ter sido suficiente para a deltametrina afetar direta ou indiretamente as atividades das enzimas. No experimento *in vivo* do Capítulo 1 também não foram observadas alterações desta enzima nestes peixes expostos à deltametrina mesmo por um período de 96 horas.

Sabe-se que piretróides do tipo II agem diretamente no sistema nervoso central e podem agir em receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA; Demoute, 1989). O controle das descargas do órgão elétrico é feito por um núcleo cerebral, denominado de núcleo marcapasso (NM), localizado no Sistema Nervoso Central, mais especificamente no bulbo cerebral dos peixes. Kawasaki e Heiligenberg (1990) relataram o efeito de bloqueadores de GABA no NM de *Hypopomus* que resultaram na diminuição de frequência e interrupções nas DOEs destes peixes. Com base nestes resultados, é possível argumentar que a deltametrina possa ter agido diretamente nesse núcleo de comando das descargas, ativando os receptores GABA, o que ocasionou em alteração do ritmo das DOEs de *Microsternarchus cf. bilineatus*. Além disso, a deltametrina poderia agir diretamente no OE, ligando-se aos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem, resultando numa ativação persistente destes canais e despolarização da membrana, que geraria descargas repetitivas e perturbações sinápticas que caracterizam os sintomas de intoxicação por hiperexcitabilidade (Sonderlund *et al.* 2002). Contudo, não se observou este tipo de

alteração nas DOEs de *Microsternarchus* cf. *bilineatus*, pois os canais dependentes de voltagem do eletrócito de *Microsternarchus* são responsáveis pela fase negativa da DOE deste gênero e, não foi observada nenhuma mudança na forma de onda nos peixes expostos durante o experimento.

## Conclusão

A deltametrina, nas doses e tempo de exposição estudados, causou efeitos quantificáveis e significativos nos padrões da DOE de *Microsternarchus* cf. *bilineatus*. A resposta desta espécie mostrou um efeito tanto dose-dependente, quanto tempo-dependente. A capacidade desta espécie de alterar seu comportamento de forma detectável logo nas primeiras horas de exposição ao inseticida deltametrina, é considerada primordial para a implementação de sistemas de biomonitoramento de qualidade de água em tempo real. A deltametrina não alterou as atividades das enzimas AChE e GST em exposição de três horas.

## Agradecimentos

Agradecemos à Rúbia Neris pelo apoio e suporte nas análises bioquímicas realizadas neste trabalho.

## Referências Bibliográficas

Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2): 298–318.

Alves-Gomes, J. A. 2001. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology*, 58:1489-1511.

- Balendiran, G. K., Dabur, R., Fraser, D. 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell biochemistry and function*, 22: 343–352.
- Bradbury, S. P., & Coats, J. R. 1989. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 373-380.
- Braz-Mota, S.; Sadauskas-Henrique, H.; Duarte, R. M.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. 2015. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135:53–60.
- Bullock, T. H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Hellingenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D. L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T.A. 1979. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico eletrorecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. *Acta Amazônica*, 9 (3): 549-572.
- Demoute, J. P. 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest Management Science*, 27.4: 375-385.
- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 1–9.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88–95.
- Ferreira, D. J. S. 2009. Utilização de *Microsternarchus bilineatus* (Ostariophysi, Gymnotiformes, Hypopomidae) como biomonitor: o efeito de combustíveis automotivos derivados do petróleo na Descarga do Órgão Elétrico. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 67p.
- Ferreira, D. J. S. 2016. Efeito de combustíveis derivados do petróleo na descarga do órgão elétrico de *Parapterontus hasemani* (Ellis 1913) (Ostariophysi, Gymnotiformes). Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 147p.

- Hagedorn, M. & Carr, C. 1985. Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 33: 254-265.
- Hagedorn, M. 1986. The ecology, courtship and mating of gymnotiform fish. In: Bullock, T. H.; Heiligenberg, W. (Ed.) *Electroreception. Wiley-Interscience, publication*, New York, p. 497-527.
- Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Havelková, M., Šíroká, Z., & Svobodová, Z. 2011. Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests. *Interdisciplinary toxicology*, 4: 85-89.
- Giulio, R. T.; Hinton, D. E. 2008. *The toxicology of fishes. Crc Press.*
- Hopkins, C. D. 1974. Electric communication in fish. *American Scientist*, 62: 426-437.
- Kawasaki, M.; Heiligenberg, W. 1990. Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *Journal of Neuroscience*, 10(12): 3896-3904.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251: 6183–6188.
- Marrero C, Taphorn D. 1991. Notas sobre la historia natural y la distribución de los peces Gymnotiformes en la cuenca del río Apure y otros ríos de la Orinoquia. *Biollania*, 8: 123–142.
- Moller, P. 1995. Taxonomy, Zoology, general ecology. In: Moller, P. 1995. *Electric fishes-fishes and behavior*. Chapman & Hall. London. 427- 467 pp.
- Moraes, F.; Maximino, C.; Carvalho, F.; Alves, A.; Paula, H.; Junior, A. 2013. Effects of methylmercury on electric organ discharges in the weak electric fish *Gymnotus sylvius*. *Psychology & Neuroscience*, 6.1: 123-127.
- Nogueira, A.P.R. 2006. Caracterização e análises do repertório eletrocomunicativo de *Microsternarchus cf. bilineatus* Fernández-Yepes, 1968 (Pisces:Gymnotiformes) durante a maturação sexual em cativeiro. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal da Amazônia, Manaus, Amazonas. 82 p.



- Nogueira, A.P.R. 2011. Diversidade específica em *Microsternarchus* (Gymnotiformes: Hypopomidae) da bacia do rio Negro e comportamento agonístico em cativeiro de uma nova espécie do gênero. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 131p.
- Nunes, D. M. F. 2016. O efeito sinérgico de poluentes urbanos nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. (Gymnotiformes). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 50p.
- Petersen, T. A. 2013. Caracterização das respostas comportamentais, por meio de Descargas do Órgão Elétrico (DOEs), de duas linhagens de peixes elétricos do gênero *Microsternarchus* (Gymnotiformes) quando expostas a diferentes regimes de sinais interferentes. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 115p.
- Pimentel-Souza, F. 1988. Electric organ discharge frequencies from two weakly electric Gymnotiform fish exposed to carbon dioxide, conductivity and pH changes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 119-12.
- Pimentel-Souza, F. E Siqueira, A. F. 1992. Effect of external carbon dioxide concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish *Apteronotus albifrons*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25 (2): 175-180.
- Rossoni, D. M. 2005. A utilização das descargas dos órgãos elétricos de *Apteronotus hasemani* e *Apteronotus bonapartii* (Apteronotidae Gymnotiformes) como bioindicadores em ambientes aquáticos. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 86p.
- Santos, M. A. T.; Areas, M. A.; Reyes, F. G. R. 2007. Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, 18: 339-349.
- Schwertner, G. 2005. Apteronotidae (Pisces: Gymnotiformes) como modelo de biomonitor para compostos BTX [dissertation]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas.

- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D.; Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59.
- Soreq, H.; Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old factor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2.4: 294-302.
- Thomas, M., Florion, A.; Chrétien, D.; Terver, D. 1996a. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analyses of the continuous electrical signal emitted by the tropical fish, *Apteronotus albifrons*. *Water Research*, 30: 3083-3091.
- Thomas, M., Chrétien, D., Florion, A.; Terver, D. 1996b. Real-time detection of potassium cyanide pollution in surface waters using electric organ discharges wave emitted by the tropical fish, *Apteronotus albifrons*. *Environmental Technology*, 17: 561-574.
- Thomas, M. 2000. Integrating Physical, Chemical and Biological Monitoring. *Security of Public Water Supplies*, 107-114.
- Tomita, R. Y. e Z. Beyruth. 2002. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático." *Biológico*, 64.2: 135-142.
- Vargas, J. I. C. 2014. Efeito do hormônio gonadotrófico na maturação gonadal e na descarga do órgão elétrico no gênero *Microsternarchus* (Gymnotiformes: Hypopomidae). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 80p.
- Verschoye, R.D., Aldridge, W.N. 1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 45: 325-329.
- Waichman, A.V.; Römbke, J.; Ribeiro, M. O. A.; Nina, N. C. S. 2002. Use and fate of pesticides in the Amazon State, Brazil: Risk to human health and the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 9.6: 423-428.
- Waichman, A.V.; Eve, E.; Nina, N. C. S. 2007. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26: 576-583.

Wickham, H. 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B.; Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.

Hothorn, T.; Bretz F.; Westfall, P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346--363.

R Core Team (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Figura 1. Esquema representativo das medições realizadas da descarga do órgão elétrico. F1; F2 e F3 representam as fases 1, 2 e 3. A1; A2; A3 representam as amplitudes das fases 1, 2 e 3. D1; D2; D3 representam a duração das fases 1, 2 e 3. Colchetes horizontais representam a amplitude pico-a-pico ou amplitude total (A1+A2). Colchetes verticais representam a duração total da descarga (D1+D2+D3). Adaptado de Nogueira (2006).

Figura 2. Representação gráfica das variações de Taxa Média (Hz) mensuradas a cada 10 minutos ao longo de oito horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.

Figura 3. Representação gráfica das variações em P/Sratio mensuradas a cada 10 minutos ao longo de oito horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.

Figura 4. Representação gráfica das variações de PPreI mensuradas a cada 10 minutos ao longo de oito horas, totalizando 48 gravações. As fases experimentais pré-teste, teste e recuperação estão representadas pelas cores vermelho, azul e verde, respectivamente. As linhas horizontais representam o intervalo de confiança.

Figura 5. Análise de cross-correlation entre o sinal elétrico da primeira gravação do pré-teste e todos as demais gravações subsequentes. Nesta análise, o índice 1 representa dois sinais 100% idênticos.

Figura 6. Tempo de resposta da Taxa Média (Hz) de *Microsternarchus cf. bilineatus* exposto a três concentrações testadas do inseticida deltametrina.

Tabela1. Resultados estatísticos dos parâmetros das DOEs nas diferentes variáveis fixas.

Variáveis fixas	Parâmetros das DOEs (variáveis dependentes)		
	Taxa Média (Hz)	P/Sratio	PPrel
Fase experimental	< 0.001	< 0.001	0,117
Tratamento	< 0.001	0,361	0,399
Tempo	< 0.001	0,593	0,096
Fase experimental:Tempo	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Tabela 2. Comparação dos valores de Taxa Média entre as fases experimentais nas diferentes concentrações do inseticida deltametrina.

Fases experimentais	Tratamentos			
	0 µg.L <sup>-1</sup>	2 µg.L <sup>-1</sup>	3 µg.L <sup>-1</sup>	4 µg.L <sup>-1</sup>
Pré-teste – Teste	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Teste – Recuperação	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Pré-teste – Recuperação	0,484	0,671	0,555	0,008

Tabela 3. Atividades das enzimas AChE e GST em tecido muscular, nervoso e hepático de *Microsternarchus cf. bilineatus* em exposição a deltametrina por três horas. As atividades das enzimas estão em nmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup> (Média ± DP), n=10.

Tratamentos	Atividades enzimáticas			
	GST (músculo)	GST (fígado)	AChE (músculo)	AChE (Nervoso)
0 µg.L <sup>-1</sup>	149,2 ± 33,3	34,3 ± 36,3	1535,5 ± 381,0	49,1 ± 13,3
2 µg.L <sup>-1</sup>	98,2 ± 30,6	45,8 ± 34,3	1540,1 ± 620,6	46,7 ± 11,9
3 µg.L <sup>-1</sup>	120,2 ± 58,3	43,5 ± 26,5	1312,1 ± 532,9	66,6 ± 39,7
4 µg.L <sup>-1</sup>	179,1 ± 95,8	48,1 ± 53,9	1312,5 ± 465,7	46,0 ± 14,0

Tabela 4. Valores de Taxa Média (Hz) na primeira e última hora de exposição ao inseticida deltametrina de indivíduos *Microsternarchus cf. bilineatus*.

Tratamentos	Taxa Média (Hz)	
	1º hora de exposição	Última hora de exposição
0 µg.L <sup>-1</sup>	60,1 ± 8,69	53,53 ± 6,65
2 µg.L <sup>-1</sup>	56,10 ± 16,27	41,20 ± 11,33*
3 µg.L <sup>-1</sup>	51,35 ± 8,36	36,59 ± 13,29*
4 µg.L <sup>-1</sup>	50,43 ± 7,87	37,48 ± 3,32*

\*indica diferença estatisticamente significativa entre 1º e última hora de exposição (P<0,05).

Fig 1.

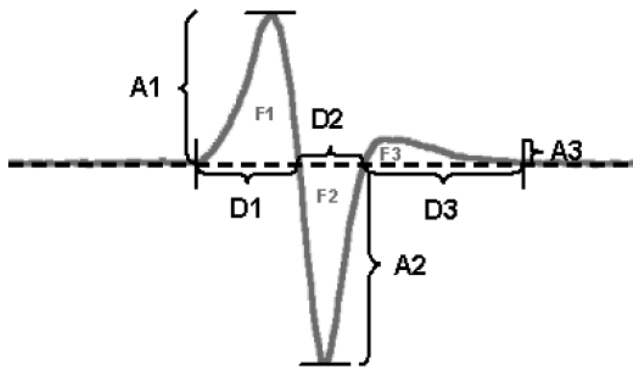


Fig 2.

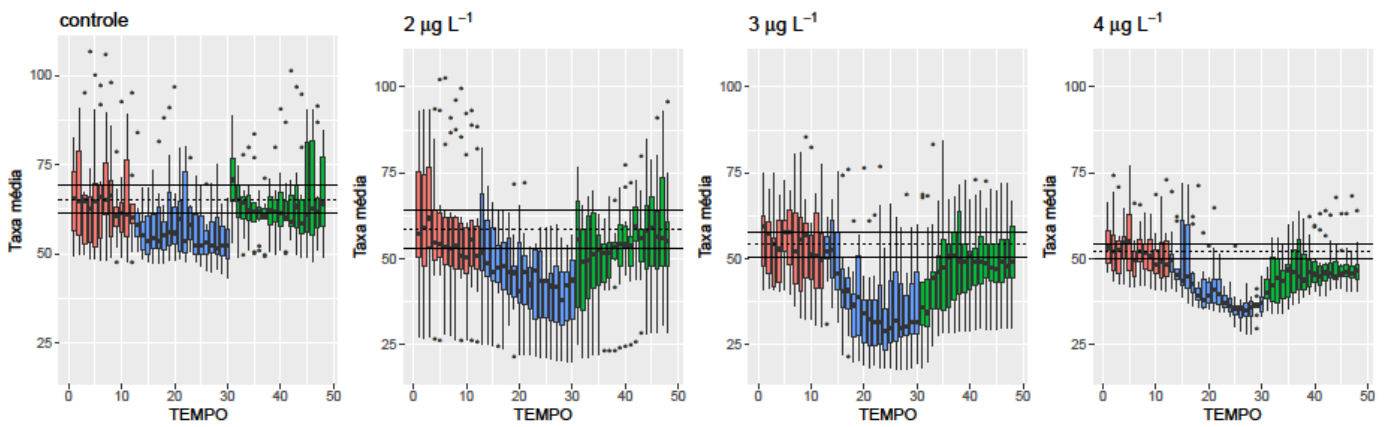
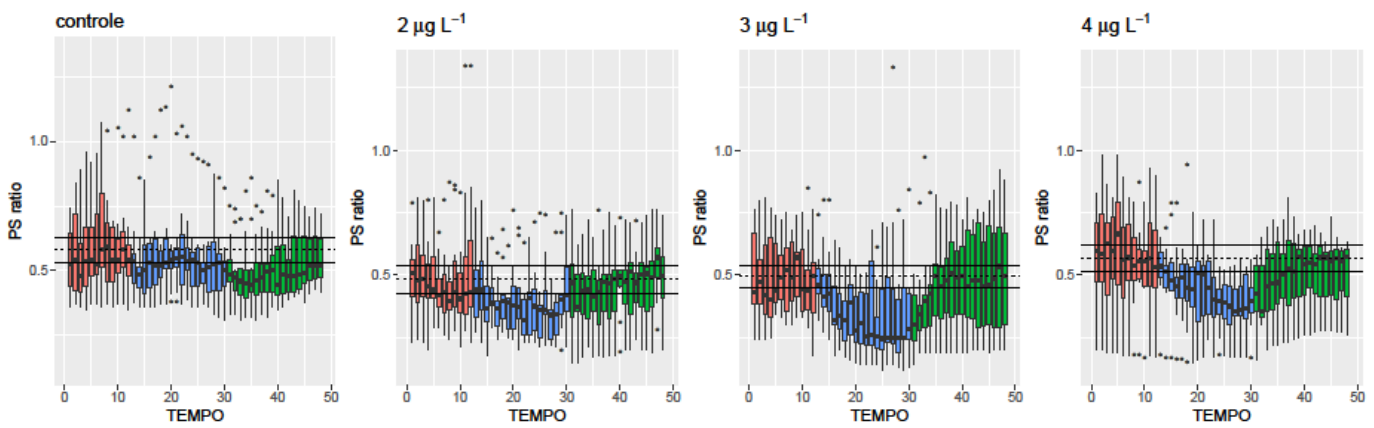
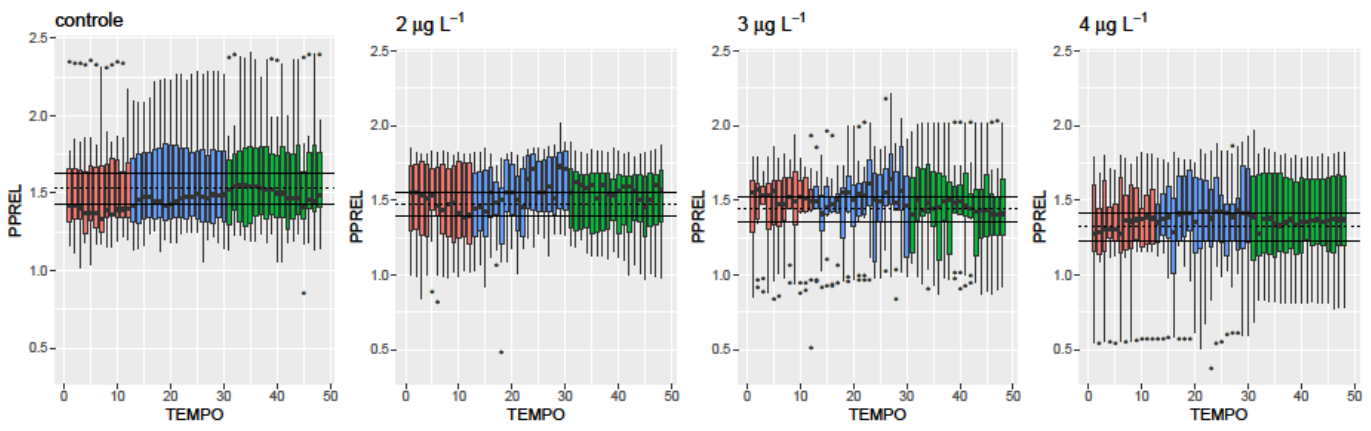


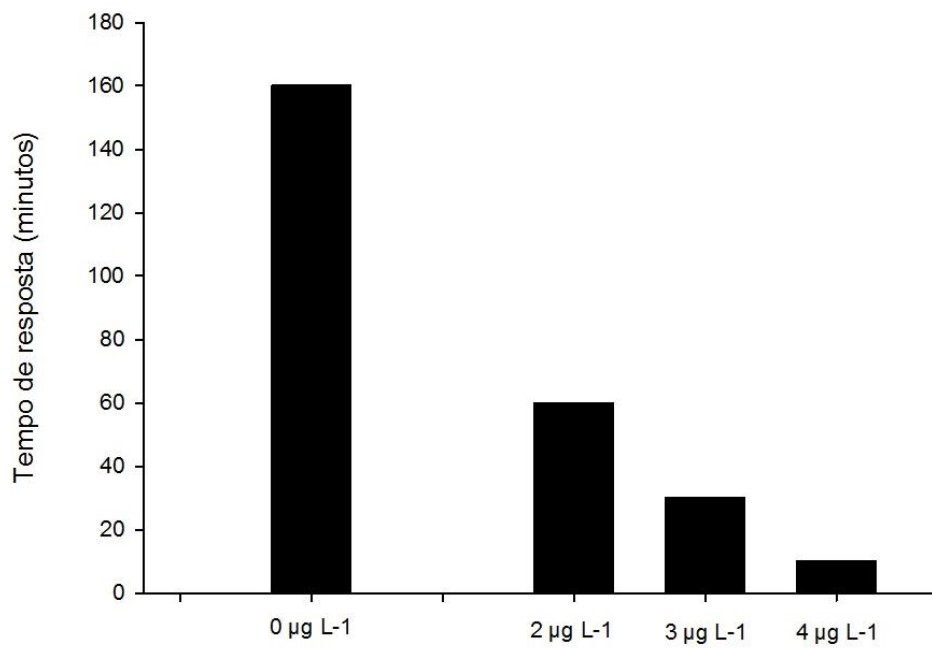
Fig 3.



**Fig. 4**

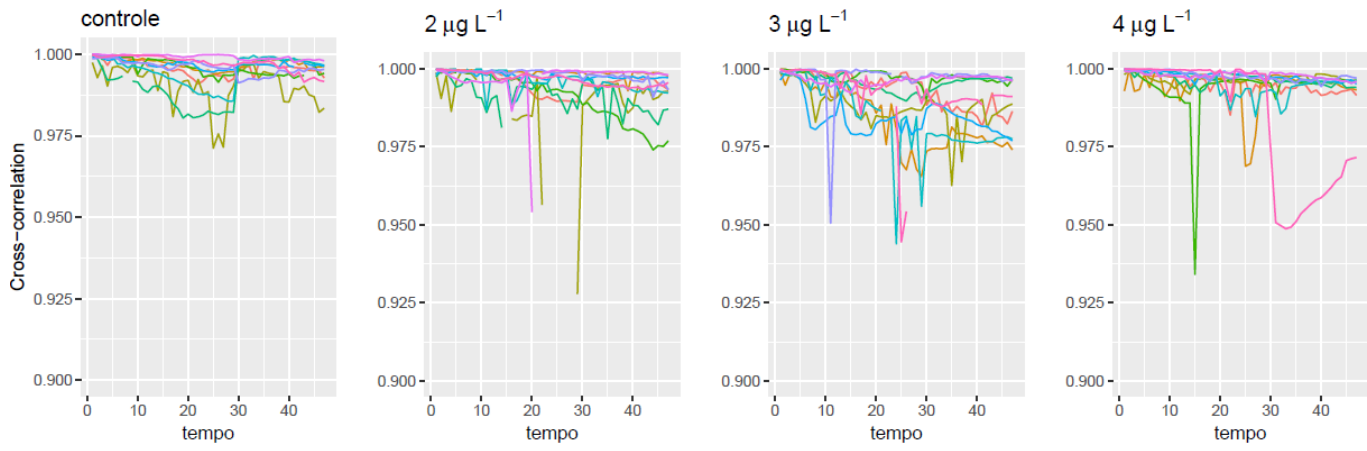


**Fig. 5**





**Fig. 6**



## CONCLUSÃO FINAL

A deltametrina demonstrou ser um inseticida altamente tóxico para indivíduos de *Microsternarchus cf. bilineatus*, com concentração letal (CL<sub>50</sub>-96 horas) de 2,15 µg.L<sup>-1</sup>. Este é o menor valor de CL<sub>50</sub> registrado na literatura para qualquer espécie de peixe amazônico. A atividade da GST muscular de indivíduos expostos no experimento *in vivo* foi induzida em concentrações de 2 e 3 µg.L<sup>-1</sup>, o que pode refletir no papel do músculo na defesa contra a ação deste inseticida, que pode ser por desintoxicação do xenobiótico, por meio da conjugação, ou por ação da GST em produtos gerados por estresse oxidativo. Este inseticida aumentou a atividade da AChE muscular em exposição *in vitro*, mas não alterou a atividade da AChE muscular e cerebral nos experimentos *in vivo* em 96 horas de exposição. Podemos concluir que a deltametrina não tem ação direta clara na atividade da AChE no tempo de exposição usado, e que os resultados de toxicidade encontrados neste trabalho podem ser melhores explicados pela ação da deltametrina em outras vias de intoxicação, como os canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem e receptores GABA. O experimento de gravação das descargas demonstrou uma diminuição da Taxa Média (Hz) das DOEs dos peixes expostos a concentrações de 2, 3 e 4 µg.L<sup>-1</sup> de deltametrina em menos de três horas de ensaio. Para o período de exposição usado, a variável Taxa Média de descarga foi a única variável relacionada à DOE que apresentou resultados consistentemente relacionados com a dose e o tempo de exposição. Aparentemente, para doses acima de 3µg.L<sup>-1</sup>, mecanismos diferenciados de compensação internas, fisiológicos e bioquímicos, atuam na proteção do organismo frente à presença de poluentes. A resposta da Taxa Média da DOE da espécie *Microsternarchus cf. bilineatus* na primeira hora de exposição ao inseticida deltametrina registrada neste estudo é considerada primordial para a implementação de sistemas de biomonitoramento de qualidade de água. A deltametrina não alterou as atividades das enzimas AChE e GST em exposição de três horas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, J.S.; Crampton, W.G.R. 2005. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In: Bullock, T.H.; Hopkins, C.D.; Popper, A.N.; Fay, R.R. (Eds.) *Electroreception*. Vol. 21. Springer Handbook of Auditory Research, Springer-Verlag, New York. 360 - 409 p.

Alves-Gomes, J. A., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2): 298–318.

Alves-Gomes, J. A. 1997. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. In: Barbosa R. I.; Ferreira E. J. & Costellón E. G. (Eds.). *Homem, ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM.

Alves-Gomes, J. A. 2001. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology*, 58: 1489-1511.

Anvisa, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>). Acesso em 04.06.2017.

Anvisa, 2012. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012. (<http://www.portal.anvisa.gov.br>) Acesso em 11.09.17.

Assis, C. R., Linhares, A. G., Oliveira, V. M., França, R. C. P., Carvalho, E. V. M., Bezerra, R. S., Carvalho, L.B. 2012. Comparative effect of pesticides on brain

acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*, 441:141–150.

Badiou, A., Meled, M., & Belzunces, L. P. 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase—a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69: 246-253.

Balendiran, G. K., Dabur, R., Fraser, D. 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell biochemistry and function*, 22: 343–352.

Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z.S., Halasy, K., Nemcsók, J. 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33: 279-295.

Bastian, J. 1994. Electrosensory organisms. *Physics Today*, 30-37.

Bell, C.C.; MAler, L. 2005. Central neuroanatomy of electrosensory systems in fish. In: Bullock, T.H.; Hopkins, C.D.; Popper, A.N.; Fay, R.R. (Eds) *Electroreception*. Springer, New York. 111pp.

Bradbury, S. P.; Mckim, J. M.; Coats, J. R. 1987. Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute fenvalerate intoxication. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 27: 275-288.

Bradbury, S. P., & Coats, J. R. 1989. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 373-380.

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

Braz-Mota, S.; Sadauskas-Henrique, H.; Duarte, R. M.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. 2015. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135:53–60.

Bullock, T. H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Hellingenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D. L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T.A. 1979. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico eletrorecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. *Acta Amazônica*, 9 (3): 549-572.

Cox-Fernandes, C.; Nogueira, A.; Alves-Gomes, J. A. 2014. *Procerusternarchus pixuna*, a new genus and species of electric knifefish (Gymnotiformes: Hypopomidae, Microsternarchini) from Negro Rivers, South America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 163: 93.

Demoute, J. P. 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest Management Science*, 27.4: 375-385.

Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 1–9.

Elliott, M., Farnham, A. W., Janes, N. F., Needham, P. H., & Pulman, D. A. 1973. A photostable pyrethroid. *Nature*, 246: 169-170.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88–95.

Ferraris Jr, C. J., de Santana, C. D., & Vari, R. P. 2017. Checklist of Gymnotiformes (Osteichthyes: Ostariophysi) and catalogue of primary types. *Neotropical Ichthyology*, 15.

Ferreira, D. J. S. 2009. Utilização de *Microsternarchus bilineatus* (Ostariophysi, Gymnotiformes, Hypopomidae) como biomonitor: o efeito de combustíveis automotivos derivados do petróleo na Descarga do Órgão Elétrico. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 67p.

Ferreira, D. J. S. 2016. Efeito de combustíveis derivados do petróleo na descarga do órgão elétrico de *Parapterontus hasemani* (Ellis 1913) (Ostariophysi, Gymnotiformes). Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 147p.

Giulio, R. T.; Hinton, D. E. 2008. The toxicology of fishes. *Crc Press*.

Glickman, A.H., Weitman, S.D., Lech, J.J. 1982. Differential toxicity of transpermethrin to rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation. *Toxicology and applied pharmacology*, 66: 153–161.

Gray JR, L.E.; Otsby, J. 1998. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicology and Industrial Health*, 14:159-184.

Guiloski, I. C.; Silva, E. G; Nishikawa, C. M.; Silva de assis, H. C. 2010. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais*, 8: 461-468.

Hagedorn, M. & Carr, C. 1985. Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 33: 254-265.

Hagedorn, M. 1986. The ecology, courtship and mating of gymnotiform fish. *In*: Bullock, T. H.; Heiligenberg, W. (Ed.) *Electroreception*. Wiley-Interscience, publication, New York, p. 497-527.

Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Havelková, M., Šíroká, Z., & Svobodová, Z. 2011. Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests. *Interdisciplinary toxicology*, 4: 85-89.

Haverinen, J.; Vornanen, M. 2016. Deltamethrin is toxic to the fish (crucian carp, *Carassius carassius*) heart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129: 36-42.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 45: 51-88.

Hernandez-Moreno, D.; Soler, F.; Moguez, M. P.; Perez-Lopez, M. 2010. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of the Total Environment*, 408: 4976–4983.

Hopkins, C. D. 1974. Electric communication in fish. *American Scientist*, 62: 426-437.

Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., & Kobayashi, H. 2004. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *Neurotoxicology*, 25:825-833.

Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., & Kobayashi, H. 2005. Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life sciences*, 77: 795-807.

Kawasaki, M.; Heiligenberg, W. 1990. Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary

pacemaker of a gymnotiform electric fish. *Journal of Neuroscience*, 10(12): 3896-3904.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251: 6183–6188.

Kumar, A.; Rai, D. K.; Sharma, B.; Pandey, R. S.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in-vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93: 96-99.

Maduenho, L. P.; Martinez, C. B. R. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148: 265–272.

Mago-Leccia, F. 1994. Electric fishes of the continental water of America (Peces eléctricos de las aguas continentales de America). *Biblioteca de La Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*. v. 29, Caracas. 221p.

Maia, C.R. 2011. Diferenciação genética e relações filogenéticas entre as linhagens de *Microsternarchus* (gymnotiformes: hypopomidae) na bacia do rio Negro, em função de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 73 p.

Maldonado-Ocampo, J.A.; López-Fernández, H.; Taphorn, D.C.; Bernard, C.R.; Crampton, W.G.R. E Lovejoy, N.R. 2013. *Akawaio penak*, a new genus and species of Neotropical electric fish (Gymnotiformes, Hypopomidae) endemic to the Upper Mazaruni River in the Guiana Shield. *Zoologica Scripta* 43: 24-33.

Marrero C, Taphorn D. 1991. Notas sobre la historia natural y la distribution de los peces Gymnotiformes en la cuenca del río Apure y otros rios de la Orinoquia. *Biollania*, 8: 123–142.



Meng, L.; Pierre-Francois, N. R. M., Leary, M. L.; Mohammed Y. F.; Ferber, S. D.; Lin, J. W. 2016. Effects of Deltamethrin on crayfish motor axon activity and neuromuscular transmission. *Neuroscience Letters*, 617: 32–38.

Moller, P. 1995. Taxonomy, Zoology, general ecology. *In: Moller, P. 1995. Electric fishes- fishes and behavior*. Chapman & Hall. London. 427- 467 pp.

Monteiro, D. A.; Almeida, J. A.; Rantin, F. T.; Kalinin, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 141–149

Moraes, F. D., Venturini, F. P., Cortella, L. R. X., Rossi, P. A., & Moraes, G. 2013. Acute toxicity of pyrethroid-based insecticides in the Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2): 59-64.

Moraes, F. D. 2013. Estudos das respostas bioquímicas-fisiológicas e histopatológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz, 1829) exposto a cipermetrina (Galgotrin ®). Dissertação de doutorado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 142p

Moraes, F.; Maximino, C.; Carvalho, F.; Alves, A.; Paula, H.; Junior, A. 2013. Effects of methylmercury on electric organ discharges in the weak electric fish *Gymnotus sylvius*. *Psychology & Neuroscience*, 6.1: 123-127.

Nogueira, A.P.R. 2006. Caracterização e análises do repertório eletrocomunicativo de *Microsternarchus cf. bilineatus* Fernández-Yepes, 1968 (Pisces:Gymnotiformes) durante a maturação sexual em cativeiro. Dissertação de Mestrado, Instituto

Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal da Amazônia, Manaus, Amazonas. 82 p.

Nogueira, A.P.R. 2011. Diversidade específica em *Microsternarchus* (Gymnotiformes: Hypopomidae) da bacia do rio Negro e comportamento agonístico em cativeiro de uma nova espécie do gênero. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 131p.

Nunes, D. M. F. 2016. O efeito sinérgico de poluentes urbanos nos padrões de descarga de *Microsternarchus* sp. (Gymnotiformes). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 50p.

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

Parkes, T. L., Hilliker, A. J. and Phillips, J. P. 1993 Genetic and biochemical analysis of glutathione S-transferases in the oxygen defence system of *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 36:1007-1014.

Patar, A. A.; Hassan, W. R. M; Yusof, F. Z. M. 2015. Toxicity of malathion, dichlorvos and temephos on acetylcholinesterase in climbing perch (*Anabas testudineus*). *Advances and Environmental Biology*, 9: 81-86.

Petersen, T. A. 2013. Caracterização das respostas comportamentais, por meio de Descargas do Órgão Elétrico (DOEs), de duas linhagens de peixes elétricos do gênero *Microsternarchus* (Gymnotiformes) quando expostas a diferentes regimes de sinais interferentes. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 115p.

Pimentel-Souza, F. 1988. Electric organ discharge frequencies from two weakly electric Gymnotiform fish exposed to carbon dioxide, conductivity and pH changes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 119-12.

Pimentel-Souza, F. E Siqueira, A. F. 1992. Effect of external carbon dioxide concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish *Apteronotus albifrons*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25 (2): 175-180.

Pimpão, C.T.; Zampronio, A.R.; Silva de Assis, H.C. 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 122–127.

Rao, G.V.; Rao, K.S.J. 1995. Modulation in Acetylcholinesterase of Rat Brain by Pyrethroids *In Vivo* and an *In Vitro* Kinetic Study. *Journal of neurochemistry*, 65: 2259-2266.

Rao, J.V. 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 78–84.

Reddy, P.M.; Philip, G.H. 1994. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 52: 619-626.

Rice, P. J.; Drewes, C. D.; Klubertanz, T. M.; Bradbury, S. P.; Coats, J. R. 1997. Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 696–704.

Rossoni, D. M. 2005. A utilização das descargas dos órgãos elétricos de *Apteronotus hasemani* e *Apteronotus bonapartii* (Apteronotidae Gymnotiformes) como bioindicadores em ambientes aquáticos. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 86p.

Rossi, P.A. 2013. Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) exposto a um inseticida a base de deltametrina. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 89p.

Santos, M. A. T.; Areas, M. A.; Reyes, F. G. R. 2007. Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, 18: 339-349.

Silva de Assis, H. C.; Nicareta, L.; Salvo, L. M.; Klemz, C.; Truppel, J. H.; Calegari, R. 2009. Biochemical Biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multipinis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 401-440.

Simonato, J. D., Guedes, C. L., & Martinez, C. B. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 112-120.

Soares, C. A. P. 2016. Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus* (matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 70p.

Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D.; Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59.

Soreq, H.; Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old factor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2.4: 294-302.

Souza, T. 2014. Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 53p.

Spiro, J.E. 1997. Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cells enables a neural oscillator to produce distinct behaviors, *Journal of Neurophysiology*. 78: 835-847.

Schwertner, G. 2005. Apterontidae (Pisces: Gymnotiformes) como modelo de biomonitor para compostos BTX [dissertation]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas.

Szegletes, T.; Balint, T.; Szegletes, Z.; Nemcsok, J. 1995. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 258-263.

Thomas, M., Florion, A.; Chrétien, D.; Terver, D. 1996a. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analyses of the continuous electrical signal emitted by the tropical fish, *Apteronotus albifrons*. *Water Research*, 30: 3083-3091.

Thomas, M., Chrétien, D., Florion, A.; Terver, D. 1996b. Real-time detection of potassium cyanide pollution in surface waters using electric organ discharges wave emitted by the tropical fish, *Apteronotus albifrons*. *Environmental Technology*, 17: 561-574.

Thomas, M., Florion, A.; Chrétien, D. 1998. A new warning biomonitor using a weakly electric fish *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 51: 605-620.

Thomas, M. 2000. Integrating Physical, Chemical and Biological Monitoring. *Security of Public Water Supplies*, 107–114.

Tomita, R. Y. e Z. Beyruth. 2002. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático." *Biológico*, 64.2: 135-142.

Vargas, J. I. C. 2014. Efeito do hormônio gonadotrófico na maturação gonadal e na descarga do órgão elétrico no gênero *Microsternarchus* (Gymnotiformes: Hypopomidae). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 80p.

Verschoye, R. D., & Aldridge, W. N. 1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of toxicology*, 45: 325-329.

Vontas, J. G., Graham, J., & Hemingway, J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357: 65-72.

Waichman, A.V.; Römbke, J.; Ribeiro, M. O. A.; Nina, N. C. S. 2002. Use and fate of pesticides in the Amazon State, Brazil: Risk to human health and the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 9.6: 423-428.

Waichman, A.V.; Eve, E.; Nina, N. C. S. 2007. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26: 576-583.

Werner I, Moran K. 2008. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. *In: ACS symposium series*. Oxford University Press: 310-334.

Who – World health organization. 1990. Environmental Health Criteria 97 Deltamethrin. Geneva:International Programme on Chemical Safety – IPCS.