



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GIOVANNI HENRIQUE FERRI

Avaliação do potencial de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae)  
como bioindicador no monitoramento do Masoten®

CAMPINAS

2019

GIOVANNI HENRIQUE FERRI

Avaliação do potencial de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae)  
como bioindicador no monitoramento do Masoten®

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre  
em Biologia Animal na área de concentração Relações  
Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
PELO ALUNO GIOVANNI HENRIQUE FERRI E  
ORIENTADO DR. MÁRCIA MAYHUMI ISHIKAWA.

Orientadora: Márcia Mayumi Ishikawa

Co-orientador: Claudio Martin Jonsson

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ferri, Giovanni Henrique, 1992-  
F416a Avaliação do potencial de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) como bioindicador no monitoramento do Masoten® / Giovanni Henrique Ferri. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Márcia Mayumi Ishikawa.  
Coorientador: Claudio Martin Jonsson.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Compostos organofosforados. 2. Triclorfon. 3. Tuvira (Peixe). 4. Peixe - Criação. I. Ishikawa, Márcia Mayumi. II. Jonsson, Claudio Martin. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the potential of *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) as a bioindicator in monitoring Masoten®

**Palavras-chave em inglês:**

Organophosphorus compounds

Trichlorfon

Tuvira (Fish)

Fish culture

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Mestre em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Márcia Mayumi Ishikawa [Orientador]

Thiago de Araújo Mastrangelo

Julio Ferraz de Queiroz

**Data de defesa:** 11-03-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9614-5874>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2241593688255316>

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Mayumi Ishikawa

Prof. Dr. Thiago de Araújo Mastrangelo

Prof.Dr. Julio Ferraz de Queiroz

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

*Você, eu, ninguém vai bater tão duro quanto à vida;  
Mas não se trata de bater duro;  
Se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente;  
O quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando;  
É assim que se consegue vencer!*

*Sylvester Stallone*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus e aos santos, pelas graças alcançadas ao longo deste trabalho e pela ajuda em superar desafios rigorosos que me foram impostos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que auxiliou para a realização deste estudo;

Ao projeto BRSAqua pelo apoio financeiro ao longo do trabalho;

A orientadora Dr. Márcia Mayumi Ishikawa, que me ajudou desde o começo para realização deste trabalho assim como um obrigado pela paciência que teve me aguentando nestes dois anos de trabalho;

Ao Doutor Claudio Martin Jonsson, por todos os ensinamentos científicos passados e pela ajuda dada;

Ao Doutor Francisco Tadeu Rantin, pelo suporte nas horas de precisão, o meu muito obrigado;

A Embrapa Meio Ambiente, por ceder seus laboratórios para a realização do presente trabalho, assim como para diversas análises realizadas ao longo destes dois anos;

Aos amigos de Embrapa, Dr. Gabriel Moura Mascarin, pela grande ajuda estatística e pelos momentos de risada que tivemos na FAJ, ao Gestor José Henrique Vallim nosso Tenente, pela ajuda e conhecimento assim como as mesmas risadas na FAJ, o meu mais sincero obrigado a vocês;

A gestora do Laboratório de Ecossistemas Aquáticos Ana Lúcia Marigo, pela grande ajuda dada neste tempo em que realizei meu experimento, assim como ao Gino e a Marisa também do mesmo laboratório;

Aos colegas de laboratório Israel, Michelly, Victor, Juliana, Fernanda, Thaís e Valery meu mais sincero obrigado por todos os momentos, desde risadas até as discussões científicas que tivemos;

Aos meus pais Jadir e Cláudia, por todo o apoio e ajuda, tanto nas horas fáceis quanto nas difíceis, por serem meus exemplos do que quero ser;

A minha irmã Mayra, cunhado Ediglei e sobrinha Gabriella, por me darem apoio e sempre estarem aqui por perto;

A minha namorada Michelle, por estar do meu lado, me incentivar e me ajudar, ainda mais quando penso em cálculos em um domingo a noite, você estava lá sempre;

A minha amiga Carla, pela imensa ajuda em corrigir o português do meu trabalho, sei que não foi uma missão fácil;

Sem mais... A todos aqueles que fizeram parte deste momento estando ou não presente, o meu muito obrigado!

## RESUMO

A exploração dos recursos naturais tem se intensificado muito nos últimos anos devido a forte pressão que o setor produtivo enfrenta para atender a demanda do mercado consumidor. Diante deste panorama, sistemas de produção de peixes intensivos são adotados para aumentar a produtividade, tal fato implica na abertura de portas para patógenos, assim como para a utilização de produtos químicos. Um dos químicos mais empregados para minimizar a perda da produção aquícola, é o triclorfon (TRC), pesticida organofosforado. Diversos são os peixes utilizados como bioindicadores de contaminação por TRC, dentre eles a tilápia-do-Nilo. Embora a tilápia seja a espécie mais utilizada, outras espécies nativas com potencial bioindicador necessitam de estudos. Diante deste fato este trabalho teve como intuito avaliar a eficácia da tuvira (*Gymnotus carapo*) como bioindicador no monitoramento do Masoten®. Para a determinação da CL<sub>50</sub>, 96 animais foram distribuídos em 32 aquários de vidro. Foram utilizados oito tratamentos (0,0; 5,0; 7,5; 15; 22,5; 37,5 e 45 mg L<sup>-1</sup>) com quatro repetições cada. A CL<sub>50</sub> foi de 6,38 mg L<sup>-1</sup>. Para a avaliação dos efeitos subletais, 10% da CL<sub>50</sub> foi utilizada, em quatro concentrações (0,0; 0,238; 0,438 e 0,638 mg L<sup>-1</sup>) com quatro repetições, onde foram realizadas duas coletas em 7 e 14 dias. Diariamente foram mensurados os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH, condutividade e oxigênio). Nos dois dias de coleta, 3 peixes de cada tratamento foram retirados para as análises hematológicas e enzimáticas. Os valores hematológicos se mostraram mais sensíveis durante os 7 primeiros dias de exposição, sendo que após isso o estresse do manejo diário tornou-se acentuado. Os valores da AChE apresentou diferença nos grupos 0,438 e 0,638 mg L<sup>-1</sup> em relação ao controle nos primeiros 7 dias. Ao final do dia 14, os mesmos grupos apresentaram diferenças, porém houve um aumento da atividade enzimática. Os valores da GST apresentaram diferenças apenas para o dia 14 para os tratamentos 0,238 e 0,438 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados da enzima FOX não corroboraram com os obtidos da literatura em nenhum dos dias de coleta. A CAT apresentou diferença do grupo 0,638 mg L<sup>-1</sup> em relação aos demais tratamentos apenas nos primeiros 7 dias de tratamento. Diante dos resultados obtidos, a tuvira apresenta potencial como bioindicadora de ambiente contaminados por Masoten®, entretanto mais estudos são necessários.

**PALAVRAS CHAVE:** Organofosforado; Triclorfon, Tuvira; Piscicultura.

## ABSTRACT

The exploitation of natural resources has been heavily itemized in recent years due to the strong pressure that the productive sector faces to meet the demand of the consumer market. Given this panorama, intensive fish production systems are adopted to increase productivity, this implies opening ports for pathogens as well as for the use of chemicals. One of the chemicals most used to minimize the loss of aquaculture production is trichlorfon (TRC), an organophosphorus pesticide. Several fish are used as bioindicators of CRT contamination, among them Nile tilapia. Although tilapia is the most used species, other native species with potential bioindicator need studies. In view of this fact, this work aimed to evaluate the efficacy of tuvira (*Gymnotus carapo*) as a bioindicator in the monitoring of Masoten®. For the determination of LC<sub>50</sub>, 96 animals were distributed in 32 glass aquariums. Eight treatments (0.0, 5.0, 7.5, 15, 22.5, 37.5 and 45 mg L<sup>-1</sup>) were used with four replicates each. The LC<sub>50</sub> was 6.38 mg L<sup>-1</sup>. For the evaluation of sublethal effects, 10% of the LC<sub>50</sub> was used in four concentrations (0.0, 0.238, 0.438 and 0.638 mg L<sup>-1</sup>) with four replicates, where two collections were performed in 7 and 14 days. The physical-chemical parameters of the water were measured daily (temperature, pH, conductivity and oxygen). On the two days of collection, 3 fish from each treatment were withdrawn for hematological and enzymatic analyzes. The hematological values were more sensitive during the first 7 days of exposure, after which the stress of the daily management became accentuated. The AChE values presented difference in the groups 0,438 and 0,638 mg L<sup>-1</sup> in relation to the control in the first 7 days. At the end of day 14, the same groups showed differences, but there was an increase in the enzymatic activity. GST values showed differences only for day 14 for treatments 0.238 and 0.438 mg L<sup>-1</sup>. The results of the FOX enzyme did not corroborate with those obtained from the literature on any of the days of collection. CAT presented a difference of the group 0.638 mg L<sup>-1</sup> in relation to the other treatments only in the first 7 days of treatment. In view of the obtained results, the tuvira presents potential as environmental bioindicator contaminated by Masoten®, however more studies are necessary.

**KEY WORDS:** Organophosphorus; Trichlorfon; Tuvira; Pisciculture.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Caminho de xenobióticos quando em contato com meio aquático

**Figura 2** – Fórmula estrutural genérica dos Organofosforados

**Figura 3** – a) Fórmula estrutural do Triclorfon. b) Fórmula estrutural do metabólito Diclorvós formado a partir da degradação do Triclorfon

**Figura 4** – Ilustração sináptica. a) Sinapse Elétrica evidenciando as proteínas denominadas de conexinas que permitem a passagem de íons neurais. b) Sinapse Química evidenciando as vesículas contendo neurotransmissores e sua fusão com a membrana plasmática pós-sináptica

**Figura 5** – Representação de tetrâmeros (A), dímeros (B), e monômero (C) das formas globulares de colinesterase

**Figura 6** – Representação ilustrativa do sítio esterásico no qual contém a tríade catalítica composta pelos aminoácidos Glutamina, Histidina e Serina

**Figura 7** – Mecanismo de inibição da AChE por contaminante organofosforado

**Figura 8** – Representação ilustrativa da distribuição de *Gymnotus* nas Américas

**Figura 9** - Morfologia externa de *G. carapo* mostrando as características marcantes do gênero.

**Figura 10** – Exemplares de *G. carapo* em unidades experimentais para teste definitivo de CL50.

**Figura 11** – Colheita de sangue por punção venocaudal em *G. carapo*

**Figura 12** – Evidências de lesões e natação errática em exemplares de tuvira (*G. carapo*) expostos a diferentes concentrações de Masoten®

**Figura 13** – Gráfico representando: Atividade da AChE na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias

**Figura 14** – Gráfico representando: Atividade específica da GST na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias

**Figura 15** – Gráfico representando: Atividade específica da FOX na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias

**Figura 16** – Gráfico representando: Atividade específica da CAT na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Características físico-químicas do pesticida organofosforado triclorfon.

**Tabela 2** – Variáveis físico-químicas da água nas diferentes concentrações de Masoten® para determinação da CL<sub>50</sub> em *G. carapo*.

**Tabela 3** – Número da mortalidade de *Gymnotus carapo* em diferentes concentrações de Masoten® para determinação da CL<sub>50</sub>.

**Tabela 4** – Valores obtidos na CL<sub>50</sub> de *G. carapo* expostos ao Masoten® por 24, 48, 72 e 96 horas.

**Tabela 5** – Valores da CL<sub>50</sub> do triclorfon para outras espécies de vertebrados e invertebrados de água doce.

**Tabela 6** – Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante a exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten®.

**Tabela 7** – Perfil hematológico durante o período de exposição crônica em *G. carapo* expostos a diferentes concentrações de Masoten®.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

BCh - Butirilcolina

BChE - Butirilcolinesterase

CAT - Catalase

CB – Carbamato

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Média

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Cond. – Condutividade

Erit – Eritrócito

GST – Glutationa-S-Transferase

Hb – Hemoglobina

Htc – Hematócrito

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

mM - Milimolar

NTs – Neurotransmissores

OF – Organofosforado

OD – Oxigênio Dissolvido

PA – Potencial de Ação

pH – Potencial Hidrogenionico

PPT – Proteína Plasmática Total

Temp - Temperatura

TRC – Triclorfon

V – Volt

VCM – Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Classificações dos Pesticidas .....	19
2.2 Pesticidas Organofosforados .....	20
2.3 Uso de Organofosforados em Piscicultura .....	21
2.4 Triclorfon .....	22
2.5 Ações Colinérgicas.....	23
2.6 Biomarcadores Enzimáticos .....	24
2.7 Enzimas Colinesterases .....	25
2.8 Acetilcolinesterase .....	26
2.9 Acetilcolinesterase como Biomarcadora de Organofosforados .....	27
2.10 Organismos Aquáticos como Bioindicadores Ambientais .....	29
2.11 Hematologia como Bioindicador Ambiental.....	29
2.12 Características e Biologia do gênero <i>Gymnotus</i> .....	30
3. OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos .....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1 Local de realização experimental .....	34
4.2 Obtenção dos organismos testes e aclimatação .....	34
4.3 Ensaio Agudo (CL50) .....	34
4.4 Testes Crônicos .....	35
4.5 Variáveis Físico-Químicas da Água.....	36
4.6 Perfil Hematológico .....	36
4.7 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) .....	38
4.8 Enzimas do Estresse Oxidativo .....	39
4.8.1 Determinação de Proteína Total .....	39
4.8.2 Atividade da Catalase (CAT) .....	39
4.8.3 Atividade da Lipoperoxidação Lipídica (FOX) .....	39
4.8.4 Atividade da Glutationa-S-transferase (GST) .....	39
5. MODELO ESTATÍSTICO .....	40
6. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	40

6.1	Teste Agudo .....	40
6.1.1	Variáveis Físico-Químicas da Água da CL <sub>50</sub> .....	40
6.1.2	Concentração Letal Média (CL <sub>50</sub> ) .....	41
6.2	Teste Crônico .....	45
6.2.1	Variáveis Físico-Químicas da Água do Teste Crônico .....	45
6.2.2	Perfil Hematológico .....	46
6.2.3	Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) .....	50
6.2.4	Enzimas do Estresse Oxidativo .....	52
6.2.4-1	Glutathione-S-Transferase (GST) .....	53
6.2.4-2	Atividade da Lipoperoxidação Lipídica (FOX) .....	54
6.2.4-3	Atividade da Catalase (CAT) .....	56
7.	CONCLUSÃO .....	58
8.	ANEXOS .....	59
9.	APÊNCICES .....	60
10.	REFERÊNCIAS .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população, a demanda pela produção alimentícia cresceu de forma significativa, intensificando assim setores como o da agricultura, pecuária e aquicultura. Portanto, para se garantir uma boa produção (livre de vetores de doenças e/ou parasitas) são comumente utilizados agrotóxicos produtos também conhecidos como xenobióticos, pesticidas, defensivos químicos, inibidores de crescimento (Peres; Moreira; Dubois, 2003).

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2017) o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, possuindo uma ampla cobertura legal no país, entretanto tais produtos podem vir a contaminar o solo e o ecossistema aquático.

Fatores antropogênicos estão intimamente ligados a introdução de xenobióticos no ambiente aquático. Dentre os mais comuns, podemos citar a remoção da mata ciliar, o escoamento de água superficial com contaminantes no solo e esgoto doméstico são as formas de chegada destes produtos em rios, lagos, açúdes e represas (Thomaz, 2008; Lourençato, 2010; Dellamatrice; Monteiro, 2014). Uma vez na água os xenobióticos podem contaminar lençóis freáticos (Figura 1), animais locais residentes e animais que estejam distantes do foco de contaminação (da Rocha, 2009).



Figura 1 – Caminho de xenobióticos quando em contato com meio aquático. Modificado de TOMITA; BEYRUTH, 2002.

Uma vez presente no ambiente aquático, os resíduos de agrotóxicos podem ligar-se ao material particulado em suspensão, assim como sedimentar-se no fundo e serem absorvidos por outros organismos, podendo ser desintoxicado posteriormente ou se acumular no organismo (Silvia; Santos, 2007).

Concomitantemente a estes processos temos o uso exacerbado de pesticidas em pisciculturas, onde sua utilização é muito empregada visando minimizar as perdas da produção (Rodrigues *et al.*, 1997; Rocha, 2009).

A aquicultura é uma atividade com grande importância no mercado de produção animal para o consumo humano, entretanto esta vem enfrentando nos últimos anos algumas dificuldades relacionadas à qualidade da água, doenças infecciosas e parasitárias, gerando enormes prejuízos para a economia (Pavanelli; Eiras; Takemoto, 2002).

O Brasil apresenta grande potencial para a prática da aquicultura devido ao seu território possuir enormes reservatórios de água (Zaniboni Filho, 1997). Nos sistemas intensivos de criação de peixes, o surgimento de parasitos e agentes potencialmente patológicos é facilitado pelo confinamento e grande número de estocagem de indivíduos (Klein *et al.*, 2004; Maximiano *et al.*, 2005).

Na aquicultura, inseticidas organofosforados (OFs) são os mais utilizados e inseridos para o controle de larvas de insetos predadores de peixes, juntamente com o seu uso para eliminação de ectoparasitos (Mataqueiro, 2002; da Rocha, 2009). Entretanto devido ao fato de escassez de conhecimento, grandes quantidades são inseridas no meio e peixes estão frequentemente expostos a estas substâncias que pode se bioacumular em sua musculatura (Dores; De-Lamonica, 2001; Canello Schalch *et al.*, 2005). No entanto os peixes são sensíveis às contaminações assim como a presença destes compostos pode interferir em processos fisiológicos e bioquímicos (Lang *et al.*, 1997).

Para se analisar a presença de contaminantes na água, diversos organismos podem ser utilizados, tais como plantas e crustáceos (Akaishi *et al.*, 2004). No entanto devido a grande sensibilidade e fácil manejo em laboratório, os peixes têm sido muito utilizados para o monitoramento no ambiente (Maia; Martos; Barrella, 2001).

Dentre os peixes utilizados como auxílio para o biomonitoramento ambiental, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a mais utilizada devido a sua ampla distribuição e

características ecológicas (Arias *et al.*, 2007), entretanto, sendo uma espécie exótica sua utilização torna-se questionável para monitoramento ambiental.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial da tuvira (*Gymnotus carapo*), peixe amplamente utilizado na pesca esportiva como ferramenta no monitoramento ambiental do pesticida Triclorfon (Masoten®) em viveiros.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Classificações dos Pesticidas

Segundo a Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989 são considerados agrotóxicos (vulgarmente denominados de pesticidas) “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

Sua denominação é dada de acordo com o organismo que se pretende eliminar, sendo assim classificados como herbicidas, fungicidas, rodenticidas, moluscicidas entre outros (Anwar, 1997).

Uma segunda classificação é utilizada quanto ao grau de toxicidade, podendo assim, ser classificados como: Extremamente tóxicos (Classe Ia), Altamente tóxicos (Classe Ib), moderadamente tóxicos (Classe II) e Discretamente tóxicos (Classe III). Sua classificação pode ocorrer também mediante ao grupo químico presente em sua formulação, sendo conhecidos como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (He, 1993; Linhares, 2013).

Sua origem também pode ser utilizada para sua classificação, isto é, orgânico ou inorgânico. Sendo que os orgânicos foram introduzidos, após a descoberta de que sais inorgânicos eram tóxicos ao homem, com isso ao longo do tempo compostos orgânicos foram introduzidos em sua formulação, gerando dois subgrupos: Sintéticos (incluídos os carbamatos e organofosforados) e os de Origem Vegetal (Vilarinho, 2011). Os inorgânicos são constituídos a base de Arsênio, Zinco, Cobre, entre outros e são considerados extremamente tóxicos ao homem (Peixoto, 2007).

A estrutura química também deve ser levada em consideração na classificação dos pesticidas, atualmente são encontrados os organofosforados que apresentam como molécula base o Fósforo, os carbamatos que possuem Carbono como elemento básico, triazinas que contém um anel aromático Benzeno como molécula base e os piretróides que apresentam Piretrina (Maraschin, 2003; Savoy, 2011).

## 2.2 Pesticidas Organofosforados

A história dos OFs apresenta um início nebuloso, entretanto acredita-se que ela comece na idade média com alquimistas da época. Seu estudo começa a ser impulsionado de fato em 1820 por Lassaigne proporcionando a esterificação do ácido fosfórico (Santos *et al.*, 2007; Silva, 2013). Os OF só aparecem com força no cenário mundial por volta de 1938, com sua descoberta por químicos alemães, entretanto sua introdução no mercado só acentuou-se entre as décadas de 60 e 80 (Araújo *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2007).

Os OFs passaram a serem os pesticidas mais utilizados no Brasil na década de 70, e com seu consumo exacerbado, aumentaram os relatos de casos de intoxicações em função de exposições agudas e crônicas. A intensificação de seu uso deve-se a proibição de inúmeros organoclorados. Além de seu vasto uso na lavoura, os OFs estão relacionados ao combate dos insetos vetores de dengue, febre amarela e doença de Chagas (Ecobichon, 1993; Barth; Biazon, 2010).

São compostos químicos que apresentam um átomo de fósforo (Figura 2) em sua estrutura central, circundado por grupamentos R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> que são grupos aril ou alquil ligados diretamente ao fósforo central, e X podendo ser representado pelos grupos halogênio, alifático, aromático ou heterociclo (Matos, 2012).

Tais compostos apresentam alta solubilidade, tornando-os de fácil absorção pelas vias respiratórias, cutâneas e digestivas (Barth; Biazon, 2010). Em seres humanos a principal via de contaminação é a digestiva com alimentos ou água contaminada, entretanto as demais vias de contaminação também estão presentes (Andrade; Campolina; Dias, 2001).

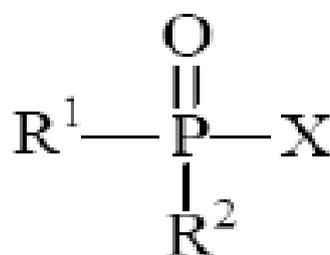


Figura 2 – Fórmula estrutural genérica dos Organofosforados. Modificado de MATOS, 2012.

### 2.3 Uso de Organofosforados em Piscicultura

A aquicultura baseia-se na produção de organismos aquáticos em qualquer estágio de seu desenvolvimento, para fins comerciais. Este tipo de produção torna-se vantajosa, pois minimiza a retirada de organismos do meio ambiente, reduzindo assim impactos (Silva, 2013). O Brasil possui um vasto território e clima tropical, fator que contribui para o desenvolvimento da aquicultura e por consequência a piscicultura na qual visa à criação de peixes (Pavanelli; Eiras; Takemoto, 2008), esta atividade está amplamente difundida por todo o país e atualmente cerca de 30 espécies de peixes com diferentes hábitos são cultivados (Botelho *et al.*, 2012).

Nas pisciculturas, os OFs são comumente utilizados em diversas etapas da produção, como por exemplo, no período de alevinagem para o controle de odonatas que causam predação e por consequência perda da produção (Garádi; Domarco; Rinheiro, 1988). O tratamento pode ser realizado de duas formas, sendo interna ou externa. Na forma externa o inseticida é administrado diretamente na água, este método é denominado de banho e pode ocorrer em um período de longa ou curta duração.

Os banhos podem ser realizados no próprio local de cultivo, onde a renovação de água é mínima e os animais ficam submetidos aos OFs por longos períodos (Pavanelli; Eiras; Takemoto, 1998; Mataqueiro, 2002). Entretanto a utilização dos OFs no controle de ectoparasitas nos ambientes de cultivos tem mostrado alterações fisiológicas em peixes mesmo quando são administradas em concentrações subletais (Rodrigues *et al.*, 1997).

Mataqueiro, (2002), Juarez e Rouse (1983) citam que na preparação dos viveiros utilizam-se concentrações de 0,25 a 3,00 ppm de OF, para eliminar parasitos no período de cultivo. Segundo Coppage e Matthews (1974) peixes expostos a pesticidas fosforados exibem inibição colinesterásica de 70 a 96%, além de apresentarem uma mortalidade entorno de 60%.

Boyd e Massaut, (1999) destacam o risco associado ao uso de produtos químicos em ambientes de cultivo, sobretudo ao uso de pesticidas e bactericidas, que possuem caráter bioacumulativo e secundariamente potenciais causadores de risco da saúde alimentar. Segundo dados de Hansen; Kapoor; Metcalf *et al.* (1972) foi constatada bioacumulação de organofosforados em espécies de *Gambusia* em apenas 32 dias de cultivo, onde órgãos como fígado e a musculatura foram os mais afetados.

## 2.4 Triclorfon

O Triclorfon (TRC) é um pesticida OF na forma sólida cristalina solúvel em água, que possui atividade anticolinérgica e vem sendo amplamente utilizadas para o controle de diversos artrópodes como grilos, percevejos, pulgas entre outros, e também no controle de ectoparasitos de peixes (Lopes *et al.*, 2006; Venturini, 2010). Suas propriedades físico-químicas estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1 - Características físico-químicas do pesticida organofosforado triclorfon

Características Físico-Químicas	Triclorfon
CAS	52-68-6
Nome Químico	dimetil 2,2,2 – tricloro – 1 – hidroxietil fosfato
Massa Molar	257.44 g/mol <sup>-1</sup>
Pressão de Vapor	1.04 x 10 <sup>-3</sup> PA
Ponto de Fusão	83-84 °C
Ponto de Ebulição	100 °C
Solubilidade em Água	1.20 x 10 <sup>5</sup> mg/L <sup>-1</sup>
Classificação Toxicológica	Classe II b

(International Programme on Chemical Safety, 1971; Lopes *et al.*, 2006)

Em solos aeróbios, o TRC apresenta curta duração, com uma meia-vida estimada em 27 dias. Possui uma baixa persistência no solo e tende a ir para águas subterrâneas, além de alta solubilidade em água, é estável em condições ácidas, onde apresenta meia-vida de 30 minutos em pH 9, 34 horas em pH 7 e 104 dias em pH 5 (Thomaz, 2008). A hidrólise do TRC ocorre de forma rápida, o que por sua vez gera o metabólito diclorvós (Figura 3), uma subespécie de organofosforados extremamente tóxico devido sua alta atividade anticolinesterásica (Hirata; Skortzaru; Narciso, 2003), em 96 horas presente na água apenas 0,7% da concentração inicial de TRC se encontram presentes (Yoshimura; Endoh, 2005).

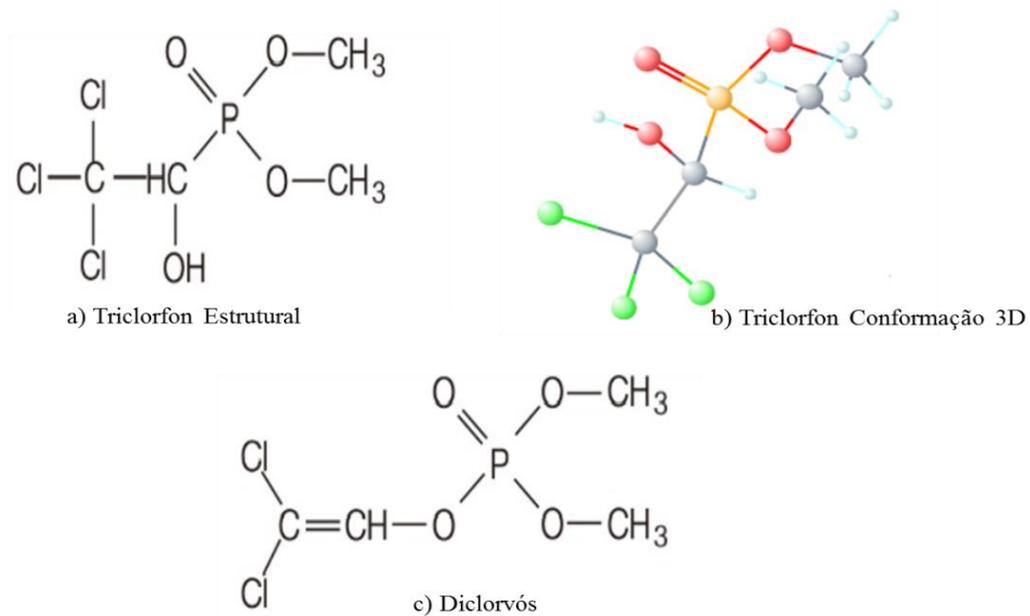


Figura 3 – a) Fórmula estrutural do Triclorfon. b) Fórmula estrutural do metabólito Diclorvós formado a partir da degradação do Triclorfon. Modificado de Chen *et al.*, 2016.

Kubtiza; Kubtiza (1998) recomendam sua utilização no combate contra parasitas em ambientes de cultivos intensivos devido a grande taxa populacional e a facilidade de dispersão de doenças. As doses indicadas na erradicação de ectoparasitas por TRC varia de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, entretanto os produtores utilizam-se de doses excessivas do composto (Chang *et al.*, 2006). Diante deste fato o uso indiscriminado do TRC em banhos com altas concentrações em pisciculturas vem sendo um fator agravante para a intoxicação dos peixes, onde sua principal via de absorção são brânquias e superfície corporal (Veiga *et al.*, 2002; Thomaz, 2008).

## 2.5 Ações Colinérgicas

Sinapses são os sítios de transmissões da informação neural, estas informações podem ocorrer de duas maneiras (Figura 4). Mediadas por transmissores químicos denominadas sinapses químicas ou transmitidas eletricamente também conhecidas como sinapses elétricas (Constanzo, 2010). As sinapses elétricas ocorrem quando dois neurônios encontram-se acoplados eletricamente por meio de junções comunicantes. Junções comunicantes são complexos existentes de poros e proteína, usualmente chamados de conexinas, que permitem que íons se movam entre as células neurais (Constanzo, 2010; Krebs; Weinberg; Akesson, 2012).

Diferente do que ocorre nas sinapses elétricas, nas sinapses químicas não há comunicação direta entre os neurônios. As sinapses químicas são compostas por um terminal denominado de pré-sináptico, uma fenda sináptica e um terminal pós-sináptico e sua comunicação se dá por intermediários conhecidos como neurotransmissores (NTs) responsáveis pelas ações colinérgicas. Sinapses químicas são em sua maioria unidirecionais, portanto para que ocorra a emissão de NT na fenda sináptica é necessário que haja a chegada de um potencial de ação (PA) (Koeppen; Stanton, 2009; Weinberg; Akesson, 2012).

A chegada do PA no axônio causa a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula por sua vez estimula a fusão das vesículas com NTs na membrana plasmática. Os NTs são então liberados na fenda sináptica, onde se difundem e se ligam aos receptores da membrana pós-sináptica. Os NTs atuam rapidamente nos neurônios, pois são catalisados rapidamente por neuromoduladores (Koeppen; Stanton, 2009).

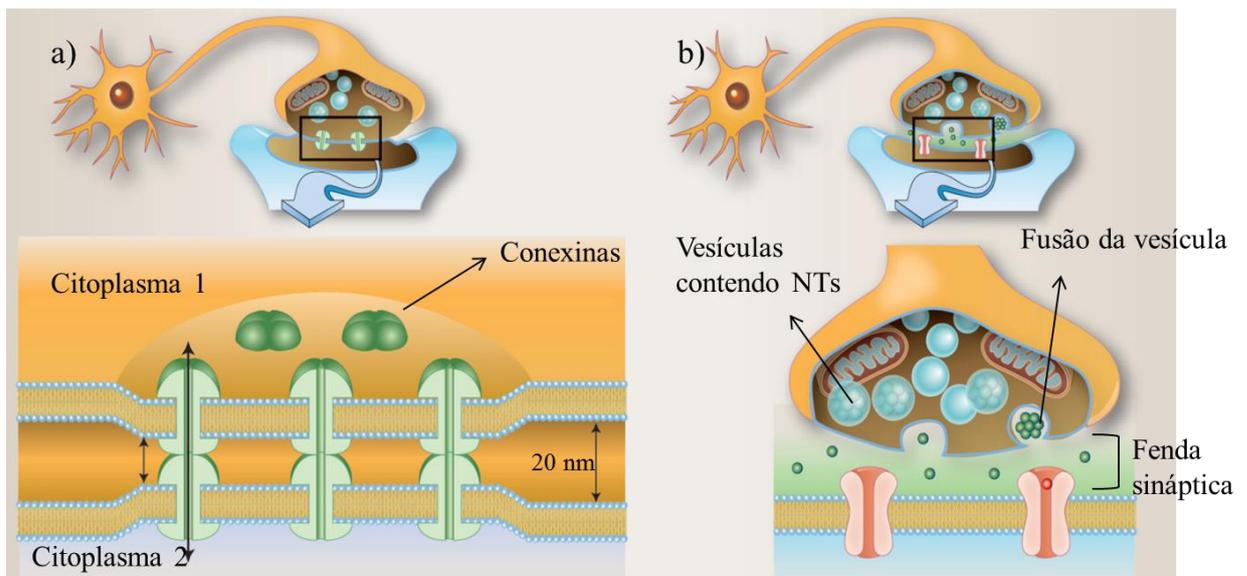


Figura 4 – Ilustração sináptica. a) Sinapse Elétrica evidenciando as proteínas denominadas de conexinas que permitem a passagem de íons neurais. b) Sinapse Química evidenciando as vesículas contendo neurotransmissores e sua fusão com a membrana plasmática pós-sináptica. Modificado de Krebs; Weinberg; Akesson 2012.

## 2.6 Biomarcadores Enzimáticos

Os biomarcadores são utilizados como auxílio no diagnóstico de intoxicações agudas e crônicas tanto de animais, como de plantas e humanos. Atualmente o interesse por

biomarcadores enzimáticos como forma de monitoramento aquático vem aumentando devido a sua grande sensibilidade (Cogo *et al.*, 2009).

As ações das atividades enzimáticas são utilizadas como biomarcadoras, devido ao fato dos agentes tóxicos apresentarem uma meia-vida relativamente longa e possuírem alta afinidade por elétrons encontrados nas estruturas das enzimas (Ivanina; Habinck; Sokolova, 2008; Cogo *et al.*, 2009).

Cada grupo de enzima apresenta uma estrutura tridimensional específica com um sítio ativo que se liga ao seu substrato específico, tal ligação é regida pela ordem em que seus aminoácidos estão dispostos na cadeia, porém suas estruturas podem ser desenoveladas quando se ligam aos compostos tóxicos, convertendo-se em cadeias polipeptídicas (onde não apresentam mais sua conformação original) (Lenhinger, 2011).

## **2.7 Enzimas Colinesterases**

São classificadas de acordo com suas propriedades de catálise e seu poder de especificidade a um substrato alvo, são também inibidoras e responsáveis pela distribuição de movimentos (Santos, 2009). Tais enzimas desempenham grande papel na neurotransmissão colinérgica tanto central como periférica e auxiliam na hidrólise e destoxificação de agentes xenobióticos (Massoulié *et al.*, 1993).

De modo geral as enzimas colinesterases podem ser denominadas de globulares ou assimétricas, onde formas globulares se apresentam como monômeros dímeros e tetrâmeros (Figura 5), podendo estar solúvel na linfa, plasma ou em outros tecidos banhados pela circulação. Pode ainda estar ancorada a membrana celular por intermédio de glicofosfolípídeos, lipídeos ou proteína transmembrana de ancoragem rica em prolina, encontradas no coração, fígado, neurônios de sinapses cerebrais e eritrócitos (Chatonnet; Lockridge, 1989; Zhang; Mccammon, 2005; Assis, 2011).

A forma assimétrica esta associada a uma cauda de colágeno (Q), podendo conter de 1 a 3 tetrâmeros em sua extremidade, se fixam na lâmina basal por dois domínios de ligação a heparina, onde interage com o heparan sulfato das junções neuro-musculares (Chatonnet; Lockridge, 1989; Assis, 2011).

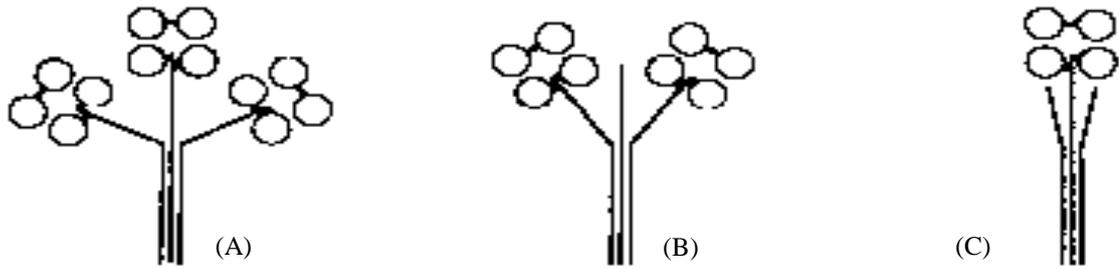


Figura 5 – Representação de tetrâmeros (A), dímeros (B), e monômero (C) das formas globulares de colinesterases. Modificado de MOSSOULIÉ; BOM, 1982.

O grupo colinesterase encontra-se dividido em dois subgrupos, sendo eles as acetilcolinesterases (AChE), responsáveis por degradar ésteres do ácido acético, e o subgrupo butirilcolinesterase (BChE), popularmente conhecido como colinesterase não específica, exerce pouca ação na ACh, entretanto exerce grande função hidrolítica na enzima butirilcolina (BCh) (Chatonnet; Lockridge, 1989). Tais subgrupos distinguem-se por serem transcritos por genes distintos e por possuírem pesos moleculares diferentes (Massoulié; Bom, 1982; Fraga, 2010).

## 2.8 Acetilcolinesterase

É uma enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas e pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Rang, 2001; Petronilha; Pintob; Villara, 2011). É uma glicoproteína globular, encontrada nos neurônios colinérgicos, próximo ao local onde ocorrem as sinapses, permanece armazenada em vesículas sinápticas (Massoulié *et al.*, 1993).

Contêm dois sítios ativos em sua porção inferior, situado a 20 Å de profundidade (Sussman; Harel, 1991), um sítio esterásico, no qual apresenta a tríade com função catalítica, onde há ligação do grupamento éster e carbonila da ACh e outro sítio aniônico onde liga-se a cadeia de nitrogênio quaternário carregado positivamente da ACh (Figura 6) (Taylor; Brown, 1999; Santos, 2009), a compreensão do mecanismo catalítico e modo de ação da AChE tornou-se possível pelos estudos de Sussman; Harel (1991) com a determinação da estrutura tridimensional da enzima dimérica de *Torpedo californica*.

Acredita-se ainda que a AChE apresente um papel não-catalítico, onde estruturas variantes desta enzima em outros tecidos do corpo humano esteja envolvida em funções de

crescimento celular, neurogênese, hematopoiese, e processos patológicos envolvidas com estresse e deterioração de neurônios colinérgicos (Coyle; Price; Delong, 1983; Layer, 1990; Lev-lehman *et al.*, 1994; Darboux *et al.*, 1996; Sapolsky, 1996).

A AChE apresenta diversos inibidores, dentre todos entre os que mais apresentam destaque são os pesticidas OF e CBs, os quais representam um maior grau de toxicidade ao homem (Casarett; Klassen; Doulls, 1996).

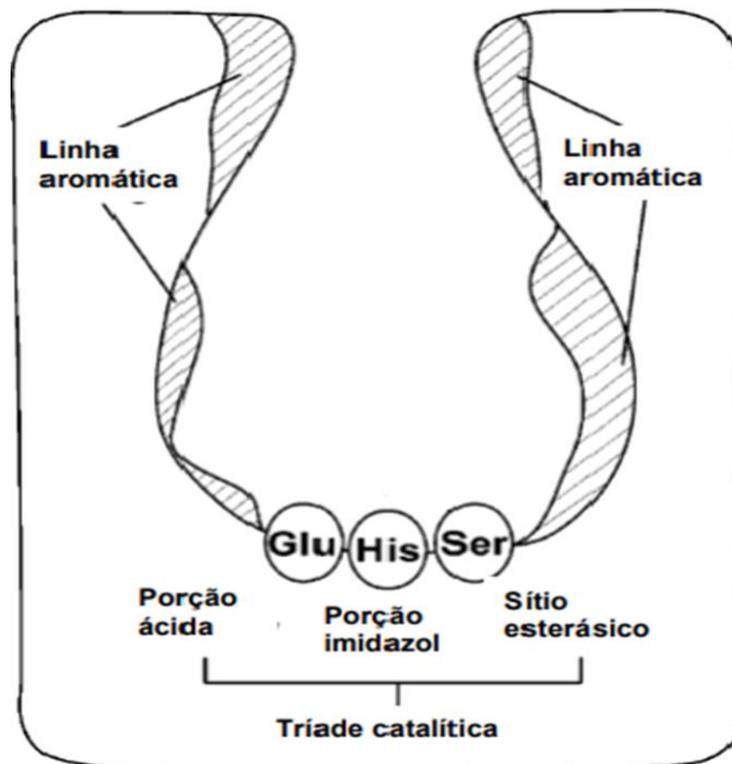


Figura 6 – Representação ilustrativa do sítio esterásico no qual contém a tríade catalítica composta pelos aminoácidos Glutamina, Histidina e Serina. Modificado de CASIDA; QUISTAD, 2004.

## 2.9 Acetilcolinesterase como Biomarcadora de Organofosforados

A inibição da AChE se fortificou com a introdução de compostos OFs no ambiente, sua inibição está intimamente ligada com mecanismos de ação tóxica (podendo ser reversíveis ou irreversíveis) (HOSKINS *et al.*, 1986). A atividade da AChE é utilizada como ferramenta para aplicação de estudos utilizando-se de organismos invertebrados e vertebrados. Desde 1950 a utilização de peixes se intensificou, sendo assim uma indicadora de ambiente previamente exposto a OF e outros pesticidas comuns na agricultura (Klemz; Silva de assis, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

Os OFs ligam-se (processo denominado de fosforilação) semelhantemente a acetilcolina no sítio esterásico da AChE, com a fosforilação do grupamento hidroxila do resíduo de serina presente na enzima promovendo assim sua inibição (Figura 7). Tal substância posteriormente seria hidrolisada e a enzima regenerada (Baron, 1991; Soares, 1998). Nas ligações entre AChE e OF, inicialmente temos uma ligação iônica, com o passar do tempo a enzima é fosforilada e a ligação torna-se covalente, gerando o processo de “envelhecimento enzimático”, de tal modo que a enzima perde seu poder de regeneração, desta forma os OFs são conhecidos como inibidores irreversíveis da AChE (Quinby; Wash, 1964; Soares, 1998; Guiloski, 2009).

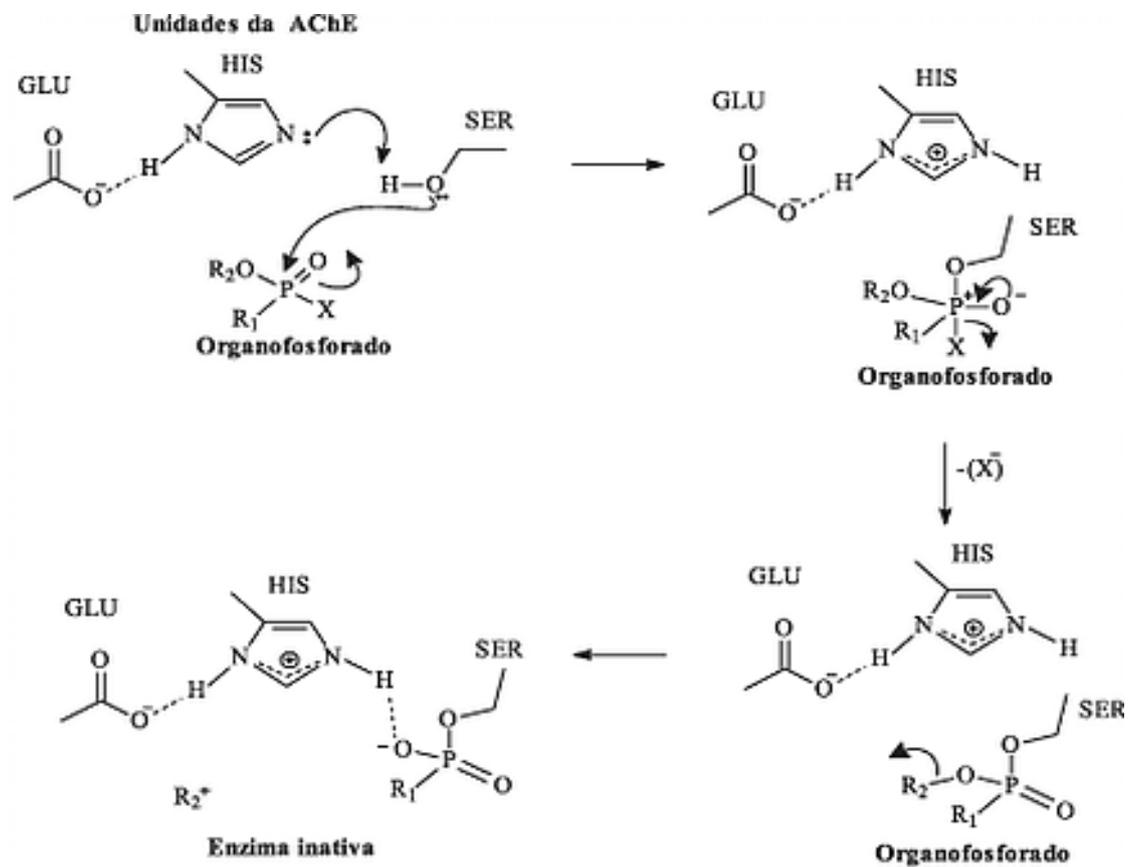


Figura 7 – Mecanismo de inibição da AChE por contaminante organofosforado. Modificado de SANTOS *et al.*, 2007.

## **2.10 Organismos Aquáticos como Bioindicadores Ambientais**

Bioindicadores são aquelas espécies utilizadas como primeiros indicadores de alterações ambientais (Adams, 2002). No ambiente aquático diversos organismos podem ser utilizados como sentinelas, tais como plantas, moluscos, crustáceos, peixes entre outros animais (Lins *et al.*, 2017).

Para ser considerado como um bioindicador ideal, uma série de características são levadas em consideração, tais como a plasticidade do animal ou planta a sobreviver a um ambiente considerado saudável, mas também suportar o ambiente exposto ao contaminante alvo, abundância do organismo e facilidade no manuseio em laboratório (Lins *et al.*, 2017).

Diante deste fato, os peixes apresentam características favoráveis como bioindicadores, pois apresenta um número elevado de indivíduos, importância ecológica e possuem um alto nível de estratégias comportamentais e reprodutivas, assim como o fato de serem muito sensíveis a variações em seus meios, podendo ser considerados excelentes organismos modelo para ensaios em ecotoxicologia (Fávaro; Oliveira, 2012; Rand, 2008).

## **2.11 Hematologia como Bioindicador Ambiental**

A hematologia consiste em estudar as alterações dos padrões e possíveis distúrbios morfológicos das células existentes no sangue. Seu estudo é baseado pela quantificação de eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Tavares-Dias; Moraes, 2004), assim como nos demais componentes existentes tais como, proteína plasmática, hemoglobina.

Os parâmetros sanguíneos assim como bioquímicos e enzimáticos, auxiliam na condução de estudos sobre contaminação ambiental (Silva; Lima; Blanco, 2012). Segundo Adhikari *et al.* (2004), os parâmetros hematológicos podem ser considerados com indicadores fisiohistopatológicos de um corpo como todo, sendo assim, uma das peças fundamentais para o diagnóstico da funcionalidade do sistema do peixe exposto a um contaminante.

A utilização da hematologia como biomarcadora ambiental, pode permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos, podendo ser indicadores da exposição ou de efeito de xenobióticos (Mayer *et al.*, 1992; Rocha, 2009). A composição do sangue está sujeita a diversos fatores fisiológicos, tais como, sexo, estágio gonadal, sexo entre outros. Em

contrapartida também pode ser influenciada por fatores externos como infecções e estresse (McCormick; Naiman, 1985).

Os principais órgãos hematopoiéticos em teleósteos são baço e rim cefálico, segundo Dheer et al. (1987), a hematopoiese sofre influência de fatores ambientais. Diante deste fato a hematologia fornece informações cruciais sobre a fisiologia e saúde dos organismos sob condições de estresse segundo Cazenave; Wunderlin; Hued (2005).

## 2.12 Características e Biologia do gênero *Gymnotus*

O gênero *Gymnotus* é conhecido popularmente como sarapó, tuvira, peixe espada, entre outros (Rotta, 2004; Rosa, 2015). Encontram-se distribuídos em praticamente toda a América do Sul e Central (Figura 8) com exceção do Chile e Belize (ROSA, 2015).

Segundo Betancur *et al.* (2013) ocupam a seguinte posição sistemática:

**Megaclasse** Osteichthyes

**Superclasse** Actinopterygii

**Classe** Actinopteri

**Subclasse** Neopterygii

**Infraclasse** Teleostei

**Corte** Elopomorpha

**Subcorte** Ostariophysii

**Seção** Otophysi

**Superordem** Characiphysae

**Ordem** Gymnotiformes

**Família** Gymnotidae

**Gênero** *Gymnotus*

**Espécie** *G. carapo*

Os Gymnotiformes são importantes componentes da ictiofauna de água doce, sendo todos obrigatoriamente representantes de águas dulcícolas, na qual a bacia Amazônica representa a maior diversidade (Mago-Leccia, 1994). Esta é uma ordem composta por um

grupo monofilético (capazes de produzir impulsos elétricos) na qual são conhecidas cinco famílias, sendo elas: Apterontidae, Hypopomidae, Sternopygidae, Rhamphichthyidae e Gymnotidae (Albert; Crampton, 2005).

Segundo Froese; Pauly (2014) estão descritas 39 espécies pertencentes ao gênero *Gymnotus*, sendo que destas 24 ocorrem em território brasileiro e deste número, 20 espécies são encontradas na bacia Amazônica (Campos-da-paz; Backup 2007; Maxime; Albert, 2009).

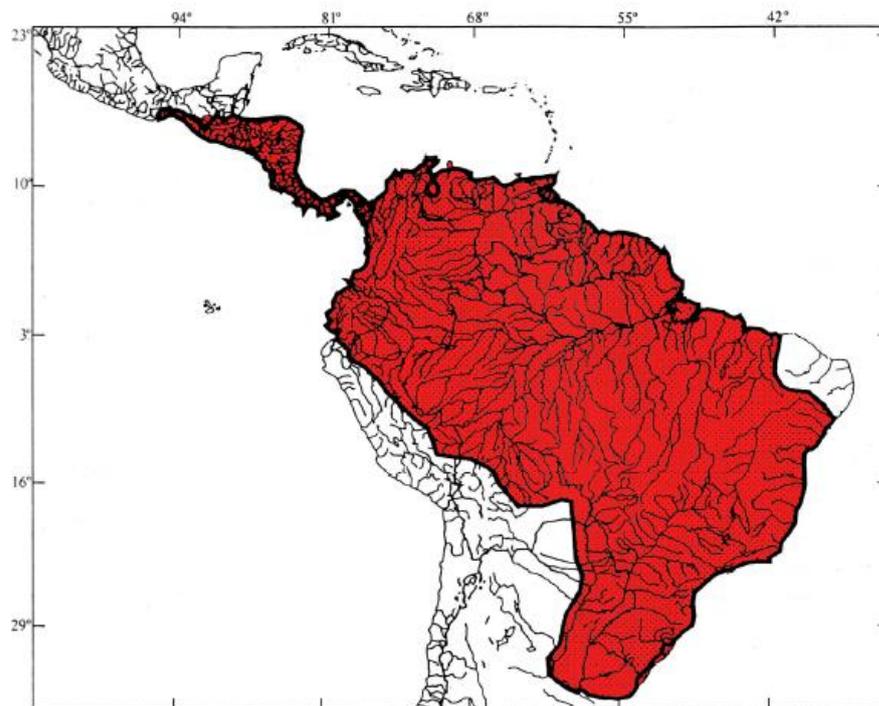


Figura 8 – Representação ilustrativa da distribuição de *Gymnotus* nas Américas. Modificado de Albert; Campos da Paz, 1998.

Os Gymnotidae apresentam algumas características marcantes (Figura 9), tais como corpo alongado com presença de escamas ciclóides, boca superior não prostrátil voltada para cima e maxila inferior conspícua, ausência de nadadeiras dorsal e ventral, entretanto com presença de nadadeira anal longa composta de numerosos raios, utilizando-se desta nadadeira para auxiliar sua locomoção (Britski; Silimon; Lopez, 1999; Minas gerais, 2000; Theodoro, 2003; Rotta, 2004; Claro, 2008; Baroni, 2010).

Outra característica da espécie é a presença de respiração acessória, feita através de um ducto pneumático que liga o dorso do esôfago à bexiga natatória, desta forma conseguindo assim assimilar o oxigênio atmosférico para suas trocas gasosas (Bragança; Menin; Costa, 1992; Moraes; Avilez; Altran, 2002; Rotta, 2004).



Figura 9 - Morfologia externa de *G. carapo* mostrando as características marcantes do gênero. Ferri, G. H 2018.

Sua capacidade de gerar campos elétricos é extremamente útil tanto para a eletrolocalização de objetos ou outros organismos, quanto para sua interação social (Campos da Paz, 2003). Os impulsos são produzidos por órgãos específicos, que são originados de células musculares diferenciadas (órgão de descarga elétrica). Tais descargas são específicas para cada espécie e são utilizadas como um dos caracteres taxonômicos deste grupo (Albert; Crampton, 2001; Lovejoy *et al.*, 2010).

São peixes considerados de porte médio podendo atingir cerca de 50 cm de comprimento e pesar aproximadamente 300g. Vivem em ambientes lênticos, águas turvas normalmente com baixa oxigenação e presença de muita matéria orgânica que estão associadas a processos de inundação (Pereira; Resende, 2000; Ventura *et al.*, 2016). Possuem comportamento territorialista podendo em algumas ocasiões ser agressivos (Campos da Paz, 2003).

Seus hábitos alimentares estão associados aos locais em que vivem, sendo assim estudos no qual seu conteúdo estomacal foi analisado, revelam que tuviras tem preferência por larvas de insetos, pois são de fácil ingestão. Esta preferência deve-se ao fato de viverem em ambientes com baixa oxigenação o que torna escasso o tipo de alimento (Pereira; Resende, 2006). Entretanto outros organismos compõem sua dieta como alguns pequenos peixes, moluscos, espécies de plantas e até mesmo indivíduos da própria espécie (Bullock *et al.*, 2006; Isaac *et al.*, 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial da espécie *Gymnotus carapo* sobre o efeito do pesticida organofosforado Triclorfon (Masoten®) como uma nova ferramenta para o uso de bioindicadores.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração letal média (CL50<sub>96h</sub>);
- Avaliar o comportamento, lesões e mortalidade das tuviras expostos a concentrações subletais;
- Caracterizar os parâmetros hematológicos das tuviras submetidos às concentrações subletais;
- Determinar as enzimas do estresse oxidativo extraídas do fígado e músculo de *Gymnotus carapo*;
- Determinar a atividade da acetilcolinesterase em *Gymnotus carapo* exposta em diferentes concentrações de TRC.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecossistemas Aquáticos da Embrapa Meio Ambiente localizado em Jaguariúna – SP, entre os meses de Setembro e Dezembro de 2018. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA (Embrapa Meio Ambiente) Protocolo n° 006/2017.

### 4.2 Obtenção dos organismos testes e aclimação

Os animais foram obtidos de um produtor localizado na cidade de Limeira – SP. Após a aquisição, os animais foram levados até a Embrapa Meio Ambiente, aclimatados em tanques de polipropileno com capacidade para 500L, com sistema de filtragem e aeração constante pelo período de 7 dias. Para o monitoramento físico-químico da água do taque durante o período de aclimação, utilizou-se sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan), onde se mensurou dados de temperatura (temp.)  $23.9 \pm 1.02$ , pH  $7.03 \pm 0.29$ , condutividade (Cond.)  $0.124 \pm 0.02$  e oxigênio dissolvido (OD)  $7.38 \pm 0.34$ , a amônia foi determinada pelo kit Amônia Tóxica água doce (Labcon Test) valores de  $0.009 \pm 0.01$ .

### 4.3 Ensaio Agudo (CL50)

Após o período de aclimação, 96 exemplares de *G. carapo* foram distribuídos em 32 aquários retangulares de vidro com volume útil de 250L com aeração constante promovida por um soprador 0,1 cv/h (Figura 10).

Foram utilizadas oito concentrações (0,0 (controle); 5,0; 7,5; 15; 22,5; 30; 37,5 e 45 mg L<sup>-1</sup>) com média de peso de 91.83; 93.27; 90.59; 93.10; 90.80; 89.98; 91.50; 92.15 respectivamente, contendo Masoten® (determinadas através de um ensaio piloto), com quatro repetições cada. Para cada repetição havia 3 animais, totalizando 12 animais por tratamento. Os animais foram mantidos em um sistema semi-estático por um período de 96 horas sem fornecimento de alimentação como sugerido pela OECD (1992), assim como mantidos em fotoperíodo de 8/16. Determinou-se um período de dezesseis horas de escuridão devido às

características noturnas do animal teste, durante as horas claras a intensidade de luz se manteve em 184 lx.

Durante este período os animais mortos foram retirados dos aquários e contados, a qualidade da água também foi monitorada durante todo o período experimental as 09h00min horas.



Figura 10 – Exemplos de *G. carapo* em unidades experimentais para teste definitivo de CL50. Ferri, G. H 2018.

#### 4.4 Testes Crônicos

Após a determinação da CL50, foi realizado o teste crônico ou subletal. A partir do valor obtido no teste agudo, 10% deste valor foi considerado como base para o início do teste crônico por um período de 14 dias. Para isto 160 animais foram distribuídos em 16 aquários (os mesmos utilizados para o teste agudo), com volume útil de 250L contendo aeração constante promovida por um soprador 0,1 cv/h. Foram utilizados 4 tratamentos sendo um controle e três concentrações ( $0,638 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $0,438 \text{ mg L}^{-1}$ ; e  $0,238 \text{ mg L}^{-1}$ ) com peso médio

de 68.63; 68.50; 68.37 e 68.55 respectivamente, cada um contendo quatro repetições cada em um sistema semi-estático. Em cada unidade experimental foram colocados 10 animais, totalizando 40 animais por tratamento. Foram realizadas duas coletas, sendo uma após 7 dias de exposição e a outra após 14 dias.

#### **4.5 Variáveis Físico-Químicas da Água**

Durante o período de determinação da CL50 (96 horas) de exposição e teste crônico, foram mensuradas as variáveis físico-químicas da água com auxílio de sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan), onde dados de temperatura (Temp), pH, condutividade elétrica (Cond) e oxigênio dissolvido (O.D) no período da manhã.

#### **4.6 Perfil Hematológico**

Após o período de 7 e 14 dias, 3 animais de cada repetição foram retirados para as análises sanguíneas, totalizando 12 animais por tratamento em cada coleta. A coleta de sangue foi realizada após indução anestésica com benzocaína 100 g L<sup>-1</sup> (banho de imersão), onde foi realizada punção venocaudal (Figura 11) com auxílio de seringas contendo EDTA (3%). As amostras foram utilizadas para determinação do hematócrito (Htc) pelo método do microhematócrito segundo Goldenfarb (1971), hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina proposto por Collier (1944), proteína plasmática total (PPT) com o auxílio do refratômetro, Glicose e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer.



Figura 11 – Colheita de sangue por punção venocaudal em *G. carapo*. Ferri, G. H 2018.

Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) foram analisados segundo Wintrobe (1934).

Para os índices hematimétricos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- VCM

O VCM é utilizado como auxílio para a observação dos eritrócitos. Para o cálculo foram utilizados os valores de hematócrito e a contagem de eritrócitos, segundo a fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Ht} \times 10}{\text{RBC (mm}^3\text{)}}$$

- HCM

O HCM é a concentração de hemoglobina por eritrócito. Para este cálculo foi utilizado os valores de hemoglobina total e contagem de eritrócitos, segundo a fórmula :

$$\mathbf{HCM} = \frac{[Hg] \times 10}{\text{RBC (mm}^3\text{)}}$$

- CHCM

A concentração de hemoglobina dentro do eritrócito é calculada pelo CHCM e para isto foram utilizados os valores de hemoglobina total e de hematócrito. Seu valor é dado em porcentagem, segundo a fórmula:

$$\mathbf{CHCM} = \frac{[Hg] \times 100}{Ht}$$

#### 4.7 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

Os ensaios de atividade da AChE foram realizados segundo proposto por Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). As amostras de músculos foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,0 centrifugadas a 12000 x g a 4°C por vinte minutos, sendo o sobrenadante utilizado como fonte enzimática. Este método se baseia na taxa de produção de tiocolina a partir de acetiltiocolina hidrolisada pela ação da AChE.

A reação é continuada pela reação do tiol formado com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB), formando então o ânion ácido 5-tio-2nitrobenzóico (TNB) que possui coloração de cor amarela. A taxa de formação de TNB é mensurada a 412 nm por um período

de 5 minutos a uma temperatura de 30°C e a unidade expressada unidade de acetilcolina hidrolisada por miligrama de proteína.

## **4.8 Enzimas do Estresse Oxidativo**

### **4.8.1 Determinação de Proteína Total**

A quantificação da proteína total foi realizada segundo o método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As amostras de fígado foram diluídas em tampão Tris-HCL 0,1M a pH 6,8 lidas a 595 nm em leitor de microplacas.

### **4.8.2 Atividade da Catalase (CAT)**

Sua alta velocidade de reação desta enzima, associada juntamente a uma baixa afinidade, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos primeiros 15 segundos da reação, 240nm ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (AEBI, 1984).

### **4.8.3 Atividade da Lipoperoxidação Lipídica (FOX)**

O ensaio de lipoperoxidação foi determinada pelo método FOX proposto por Jiang *et al.* (1991), correspondendo a uma reação de auto oxidação de lipídios (LH) que conduzem a lipoperoxidação (LOOH). O ensaio da FOX se baseia na oxidação do Fe<sup>2+</sup> por LOOH em pH ácido na presença de um pigmento complexador de Fe<sup>3+</sup> (Xilenol Orange). O complexo formado pode ser quantificado pelo aumento de sua absorbância em 560 nm sendo expresso em nmol.g<sup>-1</sup> de tecido.

### **4.8.4 Atividade da Glutathione-S-transferase (GST)**

A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig; Jakoby, 1981). A GST é considerada um biomarcador de fase II do metabolismo e de estresse oxidativo, e como

tal pode ser utilizada para avaliar a ocorrência de efeitos subletais em organismos expostos a diversos contaminantes.

## **5. MODELO ESTATÍSTICO**

Todas as análises dos testes subletais foram determinadas pelo programa R. A enzima AChE, GST, FOX foram calculadas pelo Modelo geral linear com distribuição normal de dados Two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A CAT foi transformada por raiz quadrática para distribuição normal dos dados Two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados hematológicos de Glicose, Hb, Htc, PPT, VCM, CHCM e HCM Two-way ANOVA e quando necessário utilizou-se teste Tukey a 5% de probabilidade, já Erit. seguiu-se pelo modelo linear generalizado com distribuição negativa binomial e função de ligação “log”

## **6. RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **6.1 Teste Agudo**

#### **6.1.1 Variáveis Físico-Químicas da Água da $CL_{50}$**

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o período de exposição da toxicidade letal encontram-se descritas na Tabela 2. Houve diferença ( $p > 0,05$ ) para a temperatura, entretanto os valores obtidos no presente estudo encontram-se de acordo para a espécie, pois segundo Marques; Calhaeiros (2013) em seu estudo com tuviras comercializadas na região do Mato Grosso, estes animais suportam uma variação em torno de 18°C de temperatura, podendo habitar águas entre 17 – 35°C.

O O.D mesmo estando abaixo do valor recomendado pela OECD (1992), não foi um fator limitante para o comprometimento do experimento, pois a espécie apresenta respiração acessória. Quanto ao pH não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos e os mesmos também encontram-se de acordo com as exigências da espécie, o mesmo também foi evidenciado nas concentrações de amônia.

Houve diferença nos tratamentos para a variável condutividade. Este parâmetro é facilmente influenciável pela quantidade de íons dissolvidos na água. Um fator que pode explicar a diferença entre os tratamentos é a concentração de TRC nos diferentes tratamentos, sendo assim os tratamentos com maiores concentrações tendem a ter maiores valores de condutividade.

Tabela 2 – Variáveis físico-químicas da água nas diferentes concentrações de Masoten® para determinação da CL<sub>50</sub> em *G. carapo*.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Parâmetros Físico-Químicos				
	Temp. (°C)	pH	OD (mg L <sup>-1</sup> )	Cond. (mS cm)	Amônia (mg <sup>-1</sup> L)
0	23.00 <sup>b</sup>	7.50 <sup>a</sup>	7.06 <sup>ab</sup>	0.113 <sup>d</sup>	0.001 <sup>a</sup>
5	22.86 <sup>b</sup>	7.50 <sup>a</sup>	7.00 <sup>ab</sup>	0.114 <sup>d</sup>	0.005 <sup>a</sup>
7.5	23.47 <sup>b</sup>	7.44 <sup>a</sup>	7.02 <sup>ab</sup>	0.116 <sup>cd</sup>	0.003 <sup>a</sup>
15	23.27 <sup>b</sup>	7.47 <sup>a</sup>	6.75 <sup>b</sup>	0.119 <sup>bcd</sup>	0.001 <sup>a</sup>
22.5	23.18 <sup>b</sup>	7.46 <sup>a</sup>	6.9 <sup>ab</sup>	0.121 <sup>bc</sup>	0.007 <sup>a</sup>
30	23.60 <sup>b</sup>	7.42 <sup>a</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	0.122 <sup>b</sup>	0.001 <sup>a</sup>
37.5	24.70 <sup>a</sup>	7.38 <sup>a</sup>	7.16 <sup>a</sup>	0.130 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>
45	24.81 <sup>a</sup>	7.39 <sup>a</sup>	7.11 <sup>ab</sup>	0.134 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

### 6.1.2 Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>)

Os resultados da mortalidade das tuviras expostos a diferentes concentrações de Masoten® estão apresentados na tabela 3, onde as mortes iniciaram-se na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, assim como mortes nas primeiras 24 horas de exposição.

Tabela 3 – Mortalidade de *Gymnotus carapo* em diferentes concentrações de Masoten® para determinação da CL<sub>50</sub>

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de exposição em horas			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
5	0	1	0	4
7,5	0	0	2	4
15	2	2	6	2
22,5	6	2	3	0
30	6	4	1	0
37,5	7	5	-	-
45	3	9	-	-

Em ensaios de toxicidade são analisadas qualquer resposta apresentada pelo organismo teste, estas respostas em animais aquáticos se dão pela letalidade, alteração comportamental ou sobrevivência (Andrade *et al.*, 2005; Ferreira, 2016).

Os sinais clínicos de intoxicações pelo triclorfon foram observados 2 horas após a inoculação em cada unidade experimental nas concentrações de 45, 37,5 e 30 mg L<sup>-1</sup>, onde pode ser observado, natação errática, concentração dos animais nas áreas com aeração, espasmos musculares, perdas de escamas, lesões epiteliais e agressividade (Figura 12), isto deve-se ao fato da inibição da atividade da enzima AChE como evidenciado por Rodrigues (1997) em seu experimento com *Prochilodus scropha*.

Para as demais concentrações também foram observadas natação errática e espasmos a partir de 72 horas de exposição exceto no grupo controle, onde não foi evidenciado nenhum dos sinais citados acima.



Figura 12 – Evidências de lesões e natação errática em exemplares de tuvira (*G. carapo*) expostos a diferentes concentrações de Masoten®. Ferri, G. H 2018.

Estudos de toxicidade aguda de TRC têm sido muito realizados com diferentes espécies de organismos aquáticos, tanto para vertebrados, como para invertebrados. A  $CL_{50}$  24, 48, 72 e 96 horas determinada para *G. carapo* contaminados por Masoten® encontram-se descrita na tabela 4.

Segundo Yoshimura; Endoh (2005), conforme ocorre à degradação do TRC na água, mais alta se torna sua toxicidade para os organismos aquáticos, tal fato se deve ao aumento da concentração de seu metabólito, o diclorvós. Afim dê-se evitar os efeitos indesejáveis de seu metabólito, o experimento foi mantido em um sistema semi-estático, onde foi realizada uma troca de água ao longo de todo o período.

Tabela 4 – Valores obtidos na  $CL_{50}$  de *G. carapo* expostos ao Masoten® por 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempo (hrs)	CL 50 mg L <sup>-1</sup>	95 % Limite de confiança (mg L <sup>-1</sup> )	
		L. Inferior	L. Superior
24	40.65	23.21	58.09
48	18.95	15.02	22.88
72	12.53	9.47	15.59
96	6.38	4.47	8.30

É possível analisar através da tabela 4, que com o aumento da variável tempo, há uma diminuição da concentração necessária de TRC para causar uma mortalidade de 50%. O Masoten® que possui em sua formulação TRC, apresentou mais toxicidade para *G. carapo* do que em outras formulações para diferentes espécies de organismos aquáticos como representado na tabela 5.

Tabela 5 – Valores da CL<sub>50</sub> do triclorfon para outras espécies de vertebrados e invertebrados de água doce.

Espécies	CL <sub>50</sub> <sup>96h</sup>	Autores
<i>Cyprinus carpio</i>	15 mg/L	Hashimoto <i>et al.</i> (1982)
<i>Oryzias latipes</i>	17,6 mg/L	Yoshimura; Endoh (2004)
<i>Colossoma macropomum</i>	0,82 mg/L	Rocha (2009)
<i>Procambarus clarkii</i>	0,73 mg/L	Cebrian <i>et al.</i> (1991)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0,19 mg/L	Mataqueiro <i>et al.</i> (2008)
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	17,2 mg/L	Flores; Vizcarra (2008)
<i>Oreochromis niloticus</i>	21,7 mg/L	Alkahem <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnotus carapo</i>	6,38 mg/L	Presente Trabalho

Segundo os dados citados na tabela 5, nota-se uma grande variação nos valores da CL<sub>50</sub><sub>96h</sub> variando de 0,19 mg L<sup>-1</sup> para *Piaractus mesopotamicus* (Mataqueiro, 2006) até 21,7 para a espécie mais cultivada *Oreochromis niloticus* (Alkahem *et al.*, 1998).

Quando comparada com as demais espécies, *G. carapo* se mostrou mais sensível a ambiente contaminado por TRC do que as espécies de carpa comum (*Cyprinus carpio*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), medaka (*Oryzias latipes*) e ao ciclídeo americano (*Cichlasoma urophthalmus*).

*G. carapo* também apresentou maior resistência quando comparado a embriões de zebrafish, onde os mesmos apresentaram CL<sub>50</sub> de 25,4 mg L<sup>-1</sup> quando submetidos a contaminação por TRC (Coelho *et al.*, 2011).

As variações de concentrações nos diferentes animais podem estar associadas a dois fatores sendo um deles o fator biótico e o segundo abiótico. No fator biótico a resposta fisiológica de cada animal está envolvida, entretanto o pH, um fator abiótico também apresenta grande influência no grau de toxicidade do TRC, onde ácidos favorecem a estabilidade da molécula e pH alcalinos favorecem a degradação do TRC em diclorvós (Giovanoli-jakubzak; Fitak; Chodkowski, 1971; da Rocha, 2009). Neste estudo o pH manteve-se ligeiramente alcalino, entretanto esta variação não causou influencias relevantes

ao resultado obtido, o fator que pode ter influenciado a manutenção do pH foi a troca de água realizada.

## **6.2 Teste Crônico**

### **6.2.1 Variáveis Físico-Químicas da Água do Teste Crônico**

Durante os 14 dias do teste crônico foram mensurados diariamente os valores de Temp.; pH; O.D; e Cond. Os valores de amônia foram mensurados a cada dois três dias a partir da data de inoculação do Masoten®. Os valores obtidos ao longo dos 14 dias de teste estão descritos na tabela 6.

Durante os 14 dias de exposição não houve diferenças ( $p < 0.05$ ) para a temperatura ficando em torno de 25°C. Rotta (2004) em seu estudo apontou que tuviras podem ocorrer em águas com uma variação de 20 - 35°C, Pimentel-Souza et al. (1976) relata que estes animais preferem águas com uma temperatura em torno de 24°C. Neste estudo, no entanto proporcionou uma faixa agradável de cultivo aos animais.

Quanto ao O.D, devido aos locais onde habitam e sua respiração acessória, estes animais conseguem sobreviver em ambientes anóxicos, segundo a regulamentação da OECD (1992) este parâmetro é de suma importância tendo de estar acima de 8 mg L<sup>-1</sup>. No presente trabalho manteve-se abaixo do valor estipulado para a OECD (1992) em torno de 6 mg L<sup>-1</sup>, não sendo, entretanto, um fator limitante devido aos animais suportarem ambientes com baixa oxigenação.

Quanto aos demais parâmetros não há mais estudos detalhando suas necessidades fisiológicas, Resende (1999) capturou exemplares de tuvira com pH variando de 4.9 – 6.8, segundo este resultado, os dados obtidos de pH no atual trabalho apresentaram-se dentro do normal para a espécie, assim como para condutividade onde o mesmo autor mostra tuviras sobrevivendo em um espectro muito grande, variando entre 18 – 117 mS cm.

Todos os tratamentos apresentaram valores maiores ao descrito por Resende (1999), Silva et al. (2003) por sua vez, descreveu a ocorrência de tuviras em um faixa ainda maior de condutividade variando de 20 – 635 mS cm. O tratamento com 0.438 mg L<sup>-1</sup> que diferiu significativamente dos demais tratamentos, apresentando o menor valor quando comparado aos outros grupos.

Dados sobre amônia são escassos para a espécie de estudo, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos estando todos dentro dos limites aceitáveis ao cultivo de peixes.

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante a exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten®.

Parâmetros Físico-Químicos					
Concentração mg L <sup>-1</sup>	Temp.	pH	O.D	Cond.	Amônia
0.0	25.31± 0.71 <sup>a</sup>	7.36± 0.29 <sup>a</sup>	6.60± 0.71 <sup>a</sup>	0.566± 0.04 <sup>a</sup>	0.06± 0.06 <sup>a</sup>
0.238	25.33± 0.78 <sup>a</sup>	7.43± 0.20 <sup>a</sup>	6.54± 0.54 <sup>a</sup>	0.488± 0.07 <sup>a</sup>	0.03± 0.01 <sup>a</sup>
0.438	24.86± 0.73 <sup>a</sup>	7.64± 0.13 <sup>a</sup>	6.74± 0.68 <sup>a</sup>	0.160± 0.06 <sup>b</sup>	0.04± 0.01 <sup>a</sup>
0.638	25.62± 0.75 <sup>a</sup>	7.30± 0.37 <sup>a</sup>	6.41± 0.66 <sup>a</sup>	0.372± 0.05 <sup>a</sup>	0.03± 0.01 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). Médias± Desvio Padrão.

### 6.2.2 Perfil Hematológico

Os valores hematológicos durante a exposição crônica pelo período de 7 e 14 dias encontram-se dispostos na tabela (7).

Tabela 7 – Perfil hematológico durante o período de exposição crônica em *G. carapo* expostos a diferentes concentrações de Masoten®.

Concentração	Variáveis Sanguíneas							
	7 dias							
Triclorfon (mg L <sup>-1</sup> )	Htc (%)	PPT	Hb (g dL)	Erit. (x10 <sup>6</sup> L)	CHCM (g dL)	VCM (fL.)	HCM (pg)	Glicose (mg dL)
0.0	42.0± 5.3 <sup>a</sup>	4.8± 0.5 <sup>a</sup>	20.2± 3.5 <sup>b</sup>	3.97± 0.3 <sup>a</sup>	48.5± 6.1	108.3± 20.6 <sup>a</sup>	52.3± 10.5 <sup>a</sup>	73.6± 6.6 <sup>a</sup>
0.238	36.0± 5.2 <sup>a</sup>	4.7± 0.3 <sup>a</sup>	16.7± 3.8 <sup>a</sup>	3.29± 0.1 <sup>a</sup>	45.9± 8.4	110.9± 16.1 <sup>a</sup>	50.1± 7.1 <sup>a</sup>	95.0± 12.3 <sup>b</sup>
0.438	36.0± 3.6 <sup>a</sup>	4.4± 0.1 <sup>b</sup>	15.1± 2.4 <sup>a</sup>	2.45± 0.4 <sup>b</sup>	42.2± 4.6	154.6± 30.6 <sup>a</sup>	64.3± 10.4 <sup>a</sup>	83.8± 12.6 <sup>a</sup>
0.638	38.0± 2.1 <sup>a</sup>	4.5± 0.4 <sup>a</sup>	15.5± 2.0 <sup>a</sup>	3.18± 0.1 <sup>a</sup>	40.9± 4.0	122.3± 13.6 <sup>a</sup>	50.3± 10.1 <sup>a</sup>	88.7± 4.6 <sup>a</sup>
Variáveis Sanguíneas								
14 dias								
0.0	42.0± 2.9 <sup>a</sup>	4.5± 0.1 <sup>a</sup>	16.1± 1.9 <sup>a</sup>	3.79± 0.6 <sup>a</sup>	38.3± 3.2	156.0± 29.3 <sup>a</sup>	60.0± 14.5 <sup>a</sup>	97.6± 5.3 <sup>a</sup>
0.238	40.0± 1.6 <sup>a</sup>	4.3± 0.1 <sup>a</sup>	20.9± 4.0 <sup>b</sup>	3.42± 0.7 <sup>a</sup>	52.4± 3.2	119.0± 24.5 <sup>a</sup>	62.4± 13.0 <sup>a</sup>	98.1± 3.0 <sup>a</sup>
0.438	36.0± 2.3 <sup>a</sup>	4.5± 0.2 <sup>a</sup>	16.0± 3.6 <sup>a</sup>	2.60± 0.4 <sup>b</sup>	44.0± 7.7	141.3± 23.6 <sup>a</sup>	63.4± 20.6 <sup>a</sup>	99.2± 12.2 <sup>a</sup>
0.638	42.0± 2.0 <sup>a</sup>	4.4± 0.3 <sup>a</sup>	14.7± 2.4 <sup>a</sup>	2.96± 0.3 <sup>b</sup>	34.3± 5.6	144.0± 16.3 <sup>a</sup>	49.6± 8.3 <sup>a</sup>	98.8± 1.7 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). Htc = Hematócrito; PPT = Proteína Plasmática Total; Erit. = Eritrócitos; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. Médias± Desvio Padrão.

Os parâmetros hematológicos estão sendo cada vez mais utilizados nos estudos toxicológicos, pois são considerados como auxiliares na avaliação dos efeitos de um agente gerador de estresse (Queiroz, 2012; Corral, 2014), através de seus índices hematimétricos. Segundo Heath (1995) a exposição a poluentes pode ocasionar um aumento ou diminuição dos parâmetros hematológicos, mediante a isto os estudos hematológicos são importantes para ensaios toxicológicos (Sampath *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos nos primeiros 7 dias sugerem diferença entre os tratamentos e o grupo controle, ou seja, observa-se que embora a diferença não tenha sido significativa, é evidente que o grupo controle respondeu ao ambiente laboratorial em que foram submetidos, ocasionado pelo estresse de aclimatação, trocas de água e disputa por alimento. Este é um indicativo de que os animais responderam positivamente ao agente estressor, pois seu sistema fisiológico foi ativado, elevando sua capacidade respiratória e defesa, sendo demonstrado pelo aumento no número de eritrócitos (Erit.), hemoglobina (Hb) e hematócrito (Htc), ao mesmo tempo em que os valores de glicemia demonstraram a ausência de estresse.

Nos grupos submetidos ao tratamento com o TRC demonstraram menor resposta com relação à elevação da capacidade respiratória e aumento da glicemia sugerindo estresse decorrente da exposição ao TRC. Mesmo não havendo diferenças estatísticas para os valores de Htc entre os tratamentos, este resultado pode estar associado a um efeito do TRC sobre a capacidade osmoregulatória dos animais, inibindo assim sua resposta fisiológica.

O principal fator que altera os parâmetros sanguíneos é o desequilíbrio osmorregulatório, podendo assim causar uma hemoconcentração ou hemodiluição (Pimpao, 2006). Chandrasekara; Pathiratne (2005), submeteram carpas comum (*Cyprinus carpio*) a baixas concentrações de TRC (0.25 e 0.5 mg L<sup>-1</sup>) e evidenciaram que os valores de hematócrito não diferenciaram do controle.

Em seu trabalho Tavares-Dias *et al.* (1999b) utilizando *Piaractus mesopotamicus* submetidos a 0.4 mg L<sup>-1</sup> de TRC evidenciou a redução do nível de Erit. assim como da taxa de Hb. Já Sampath *et al.* (1993), utilizando *Oreochromis mossambicus* e Ranzani-Paiva (1987) com *Cyprinus carpio* evidenciaram o aumento da taxa de Hb e de Erit. Mataqueiro (2002) verificou o aumento dos Erit. Em *Piaractus mesopotamicus* expostos por 8 dias ao OF metil-paration.

O perfil hematológico após 14 dias apresentou resposta diferente do perfil de 7 dias, provavelmente, pela interferência do estresse decorrente do próprio ambiente laboratorial e do manejo durante o experimento.

No segundo período, após 14 dias, observa-se que a glicemia demonstra estresse em todos os grupos, incluindo no grupo controle. Nesta segunda fase, observa-se que o grupo controle não demonstra capacidade de resposta respiratória, assim como os grupos tratados com maiores concentrações, sendo diferente no tratamento  $0.238 \text{ mg L}^{-1}$  que apresentou aumento de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. A exposição a esta baixa concentração de TRC deve ter favorecido a resposta dos animais, mesmo com o estresse submetido durante o experimento. Dados semelhantes foram encontrados por Aguiar; Correa e Moraes, (2000) onde *Brycon cephalus* expostos ao methyl-parathion por 4 horas apresentaram elevação dos valores de hemoglobina nas menores concentrações.

Diante deste resultado, duas possíveis hipóteses podem ser construídas. A primeira hipótese consiste na de que o TRF manteve efeito inibitório dos tratamentos  $0.638$  e  $0.438 \text{ mg L}^{-1}$ , entretanto este efeito já não foi observado para os animais expostos a  $0.238 \text{ mg L}^{-1}$ . Outra hipótese surge quando comparamos a diferença estatística que houve no grupo controle, pois clinicamente os animais já mantinham seus parâmetros igual aos dos grupos tratados com  $0.438$  e  $0.638 \text{ mg L}^{-1}$ .

Este resultado pode ter sido ocasionado pelo estresse crônico que o grupo sofreu, pois os animais encontravam-se em aquários de vidro, não havia esconderijos para minimizar brigas, assim como a própria luminosidade pode ter sido um fator estressor. Isto explicaria o fato do grupo controle ter tido um resultado elevado de glicose no dia 14 quando comparado ao primeiro dia, mesmo não havendo diferenças estatísticas.

Em seu estudo Agrahari et.al (2007), expos o peixe *Channa punctatus* a  $0.96$  e  $1.86 \text{ mg L}^{-1}$  de monocrotophos (OF) por um período de 15 e 60 dias e observaram a diminuição dos níveis de glicose, este mesmo padrão também foi constatado por Venturini (2010) em seu trabalho com pacus.

Tal padrão não foi observado neste estudo, o aumento significativo do grupo controle pode estar associado a algum estresse exposto anteriormente a realização do trabalho tal como pesca manuseio ou temperatura (Urbini et al., 2004), a temperatura manteve-se estável durante todo experimento, descartando-se assim esta como fator estressor. Em contrapartida

todos os tratamentos apresentaram aumento após o final do período experimental, podendo este estar relacionado à dieta dos animais ao longo do período de exposição ou sobre possíveis efeitos do TRC nos organismos.

Quando comparada aos níveis de glicose de tuviras de isqueiros do Mato Grosso do Sul, sem exposição a nenhum contaminante (Ventura *et al.*, 2018) o presente estudo com tuviras oriundas do Estado de São Paulo, apresentou valores mais altos de glicose, o que pode ser um indicativo da ação do TRC nos níveis de glicose dos animais.

Ferreira (2016) avaliou o perfil hematológico de tambaquis sob influência do TRC, e constatou o aumento dos índices CHCM e HCM em relação ao controle, entretanto não houve diferenças para o VCM. Rocha (2009), também avaliou tambaquis contaminados por TRC, entretanto não constatou diferenças significativas nos índices CHCM, HCM e VCM dos grupos expostos em relação ao controle. O aumento do CHCM do grupo 0.238 em relação ao controle e ao grupo 0.638 mg L<sup>-1</sup> nos mostra que houve uma compensação do transporte de O<sub>2</sub> corroborando o aumento de Hb deste grupo.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo quando comparado aos resultados obtidos por Rocha (2009), onde os valores de HCM e VCM não diferenciaram significativamente.

### **6.2.3 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

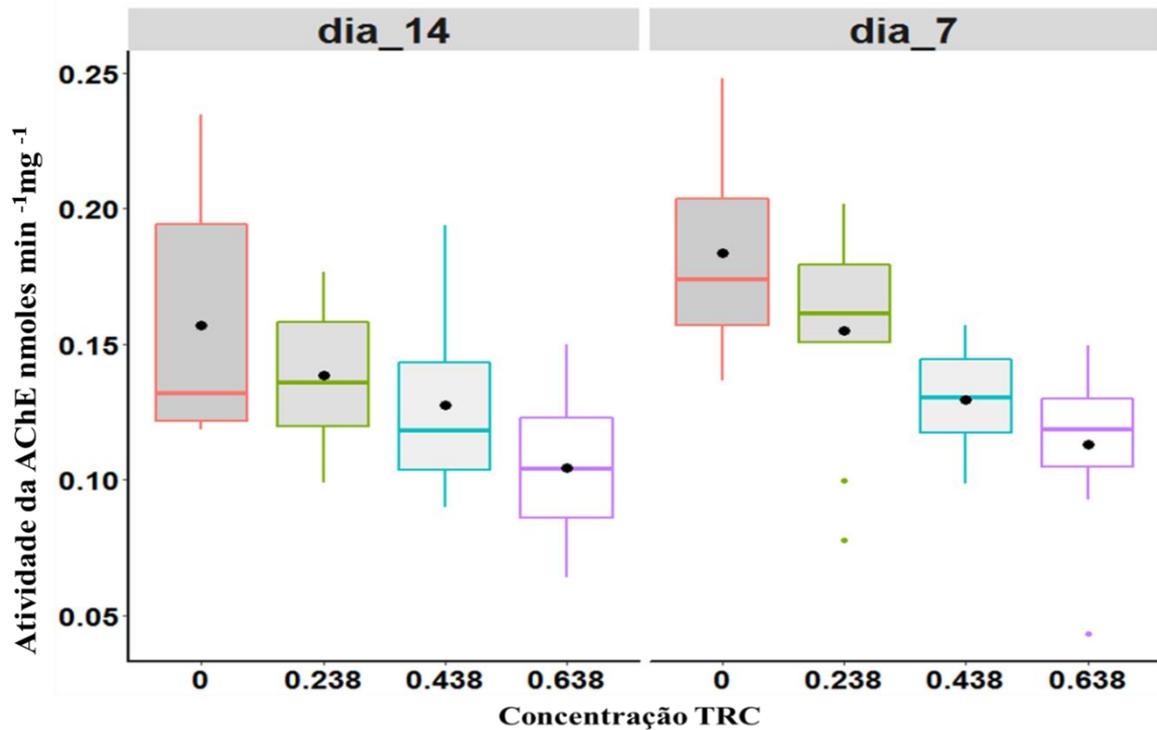
As atividades enzimáticas da AChE de *G. carapo* expostos a diferentes concentrações do Masoten® em um período de 7 e 14 dias, encontram-se dispostas no gráfico (1).

Foi possível observar que a exposição por um período prolongado de 7 dias ao Masoten® ocasionou um decréscimo na atividade enzimática ( $p < 0,05$ ) dos grupos 0.638 e 0.438 mg L<sup>-1</sup> em relação ao grupo controle, todavia o grupo 0.238 mg L<sup>-1</sup> não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle.

Quando analisado apenas às diferentes concentrações de TRC, o grupo exposto a 0.638 mg L<sup>-1</sup> diferiu significativamente do grupo 0.238 mg L<sup>-1</sup>, mas não diferiu de 0.438 mg L<sup>-1</sup>, assim como quando comparados entre si, 0.438 e 0.238 mg L<sup>-1</sup> não se difeririam ( $p > 0,05$ ). Em 14 dias de exposição foi possível evidenciar diferenças significativas entre o grupo controle quando comparado ao grupo 0.638 mg L<sup>-1</sup>, o que não foi possível ser evidenciado nas

demais concentrações. Quando comparadas, as diferentes concentrações do Masoten® (princípio ativo TRC) não apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) na inibição da AChE.

Gráfico 1 – Atividade da AChE na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias.



A AChE vem sendo utilizada como marcadora de intoxicação por OFs a muito tempo em diversos estudos, tais como o de Guimaraes; Silva de Assis; Boeger (2006), que avaliaram os efeitos do TRC sobre sua atividade em *Oreochromis niloticus*, e encontraram que nas primeiras 4 horas de exposição a 0.25 ppm não houve diferença entre os animais expostos quando comparados ao grupo controle, entretanto a partir de 8 horas já foi possível evidenciar diferenças significativas, onde esta diferença se manteve nas 96 horas de experimento.

Os resultados encontrados por Guimaraes; Silva de Assis; Boeger (2006) corroboram com os encontrados do presente estudo, onde todos os tratamentos apresentaram diferenças quando comparados ao grupo controle nos primeiros 7 dias de exposição.

Segundo Silva de Assis et al. (1993) após sua inibição, a AChE pode permanecer por até 30 dias inibida quando exposta a uma dose única, entretanto, o padrão apresentado por *G. carapo* foi diferente do trabalho descrito acima, pois em 14 dias de exposição contínua, os grupos que receberam diferentes concentrações de TRC, já não apresentavam diferenças

significativas nas atividades enzimáticas, porém ainda permaneciam com atividades menores que o grupo controle.

A recuperação da atividade enzimática de *G. carapo* pode estar associada a dois fatores, sendo um abiótico e outro fator biótico.

Quanto ao fator abiótico, a degradação do produto pode ter auxiliado na recuperação da atividade enzimática da AChE, pois segundo Lopes et al. (2006) a duração do TRC é de aproximadamente 57 horas, entretanto com sua degradação, há o surgimento de seus metabólitos, sendo um deles o diclorvós sendo este também um inibidor da AChE (DAS, 2013), entretanto outros metabólitos não estão bem elucidados até o momento.

Outro fator envolvido, sendo este biótico pode estar associado a maior atividade enzimática da AChE devido ao fato de ter pertencido a um grupo de peixes elétricos, com capacidade de gerar pulsos com cerca de 5 V. Estes são produzidos em células musculares diferenciadas que são conhecidos como órgão de descarga elétrica (Albert; Crampton, 2001; Lovejoy et al., 2010).

Segundo Fernandes-Souza et al. (1979), a descarga elétrica pode ser produzida por células diferenciadas no músculo ou neurônios especializados. Os órgãos elétricos derivados de células musculares são denominados de miogênicos. Devido ao fato dos representantes do grupo Gymnotidae apresentarem esta capacidade, a recuperação da atividade enzimática mesmo estando em exposição prolongada em concentrações baixas, pode estar associadas a uma maior produção da enzima AChE.

Em seu estudo Rao (2004), relatou que a atividade da AChE muscular de *Oreochromis mossambicus* apresentou uma recuperação completa cerca de 13 dias após a exposição de curta duração (96 horas) a 3 diferentes OFs. O presente trabalho não apresentou período de recuperação dos animais, entretanto, após o término da exposição houve uma recuperação da atividade da enzima, corroborando com a hipótese da atividade enzimática estar associada ao fato da produção de impulsos elétricos.

#### **6.2.4 Enzimas do Estresse Oxidativo**

De modo geral os xenobióticos são uma das principais fontes de EROS (espécies reativas de oxigênio) no sistema biológico. Em concentrações denominadas como

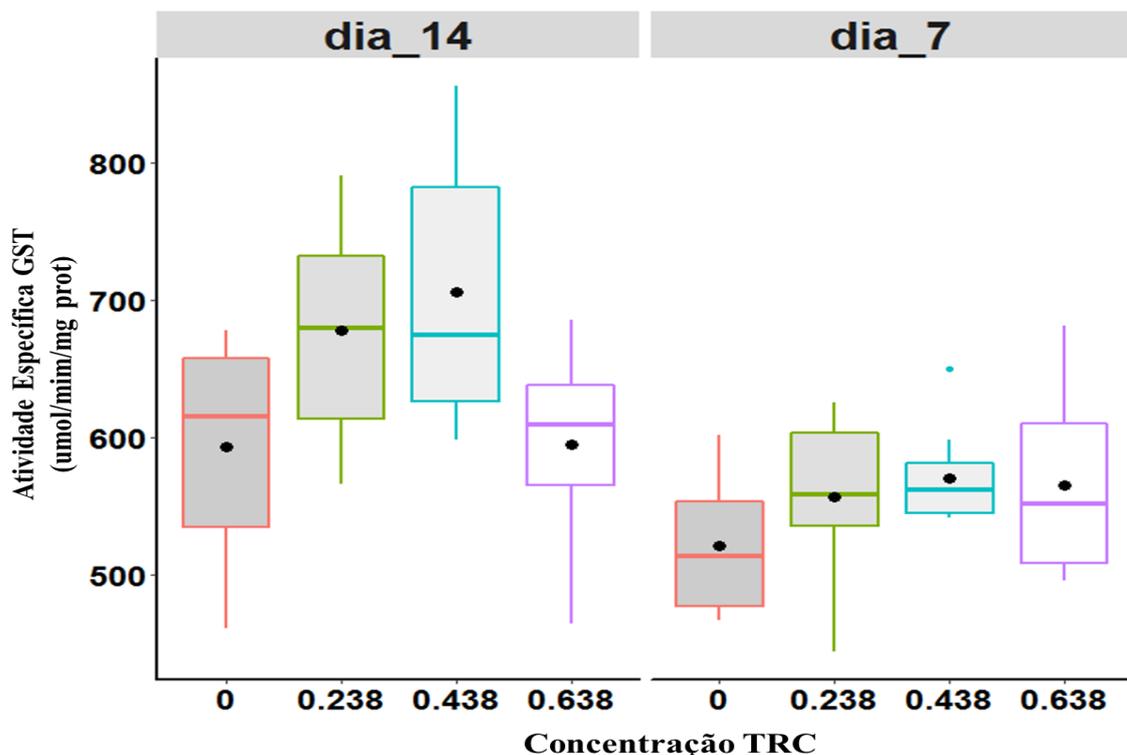
fisiológicas, são moléculas essenciais para a homeostase do corpo (Droge, 2002). Todavia, a exposição de poluentes, pode gerar o desequilíbrio celular entre os níveis antioxidantes e pró-oxidantes, levando assim a uma sobreposição de agentes pró-oxidantes (Sies, 1991), levando ao início do processo de estresse oxidativo.

#### 6.2.4-1 Glutathione-S-Transferase (GST)

As atividades enzimáticas da GST dos animais expostos a diferentes concentrações do Masoten® pelo período de 7 e 14 dias, encontram-se dispostas no gráfico (2).

Durante os primeiros 7 dias de exposição não foi possível evidenciar diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle. Após 14 dias de exposição contínua ao TRC, o grupo controle apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos 0.238 e 0.438  $\text{mg L}^{-1}$ , entretanto os mesmos tratamentos não diferenciaram-se entre si. O tratamento com a maior concentração de TRC (0.638  $\text{mg L}^{-1}$ ) não apresentou diferença ao grupo controle, assim como apresentou diferença significativa aos grupos 0.238 e 0.438  $\text{mg L}^{-1}$ .

Gráfico 2 – Atividade específica da GST na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias.



A GST é uma enzima da fase II da biotransformação e vem ganhando espaço como biomarcadora enzimática a exposição de xenobióticos (Cortella, 2010), desempenhando um papel fundamental em processos de desintoxicação por catalisar a conjugação da GSH, facilitando assim sua excreção.

Isik; Celik (2008) reportam dados para GST do fígado de truta arco-íris contaminadas por diazinon e methyl parathion (MP), onde os animais contaminados a 0.5 ppm apresentaram redução quando comparados ao controle para MP, entretanto para diazinon houve um aumento a esta mesma concentração. Já a 1.0 ppm para MP houve aumento dos valores e para diazinon os níveis não se mostraram diferentes em relação ao controle.

Monteiro et al. (2006) avaliando o estresse oxidativo de *Brycon cephalus* exposto a Folisuper 600® (MP) evidenciaram um aumento significativo dos valores da atividade da GST no fígado dos animais expostos a 2 mg L<sup>-1</sup> quando comparados ao grupo controle. Narra et al. (2017) em 15 dias de exposição por clorpirifós e monocrotophos em *Clarias batrachus* evidenciaram um aumento nos níveis de GST ao longo do experimento nos dois contaminantes quando comparados ao grupo controle.

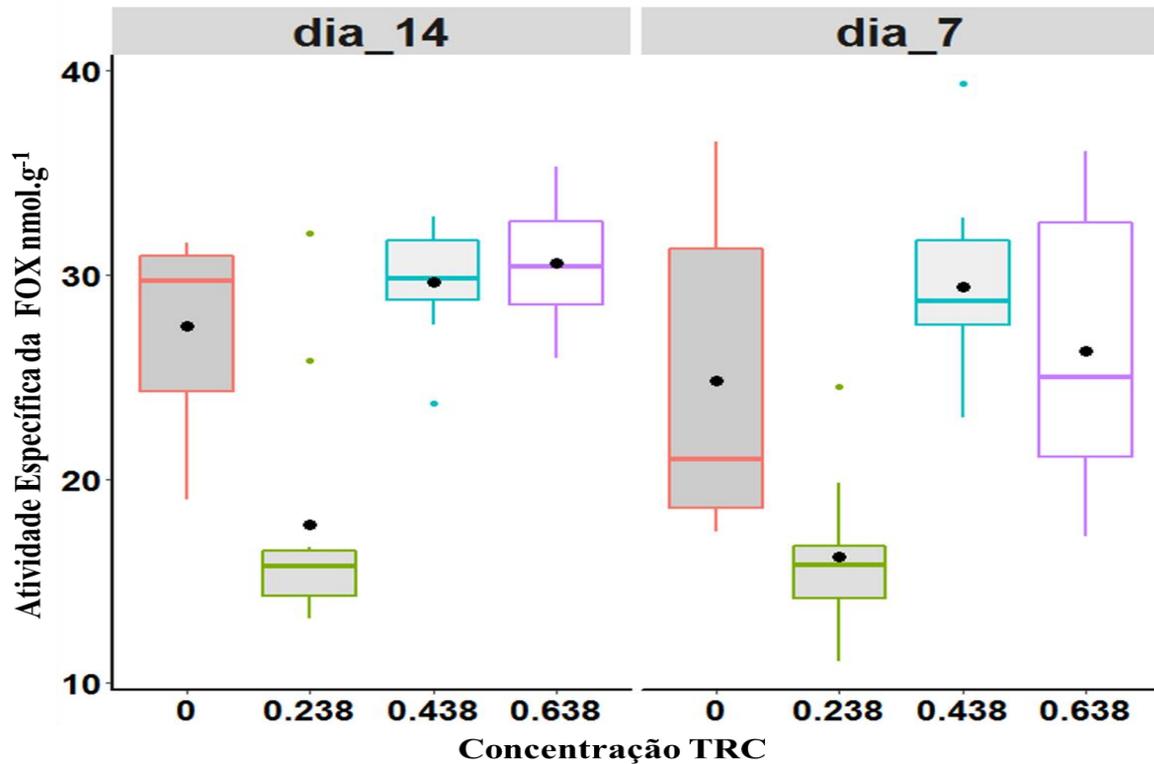
A elevação da GST também foi evidenciada em *O. niloticus* expostas a diazinon (Uner et al., 2007). O aumento da GST nos tratamentos 0.238 e 0.438 mg L<sup>-1</sup> no tecido hepático pode estar associado ao desenvolvimento de um sistema de defesa afim de neutralizar os efeitos do TRC contra o pesticida. O aumento de sua atividade indica o processo de desintoxicação.

#### **6.2.4- 2. Atividade da Lipoperoxidação Lipídica (FOX)**

As atividades enzimáticas da FOX dos animais expostos a diferentes concentrações do Masoten® pelo período de 7 e 14 dias , encontram-se dispostas no gráfico (3).

O valor obtido pela atividade da FOX durante a primeira coleta apresentou diferença significativa apenas para o tratamento 0.238 mg L<sup>-1</sup> quando comparado aos demais tratamentos, o que se manteve até o dia 14.

Gráfico 3 – Atividade específica da FOX na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias.



A hiperatividade da colinesterase após a inibição da AChE induz aos efeitos EROS no sistema biológico, o que por sua vez leva a peroxidação lipídica Slaninova *et al.*; 2009; (Lushchak, 2016). Acredita-se que a peroxidação lipídica possa ser a primeira etapa dos danos a membrana ocasionados por um xenobiótico (Hazarika *et al.*, 2003).

Monteiro *et al.* (2006) não evidenciaram diferenças significativas na FOX em fígado do *brycon cephalus* expostos a 2 mg L<sup>-1</sup> de MP. Esse mesmo padrão foi observado por Thomaz *et al.* (2009) avaliando a função cardio-respiratória de *O. niloticus* em 0.5 mg L<sup>-1</sup>.

Raibeemol e Chitra (2018) avaliando *Pseudetroplus maculatus* também evidenciaram um aumento significativo da FOX em relação ao grupo controle

O presente trabalho apresentou um padrão diferente aos demais, onde apenas o grupo 0.238 mg L<sup>-1</sup> se mostrou valores muito menores quando comparado aos outros tratamentos.

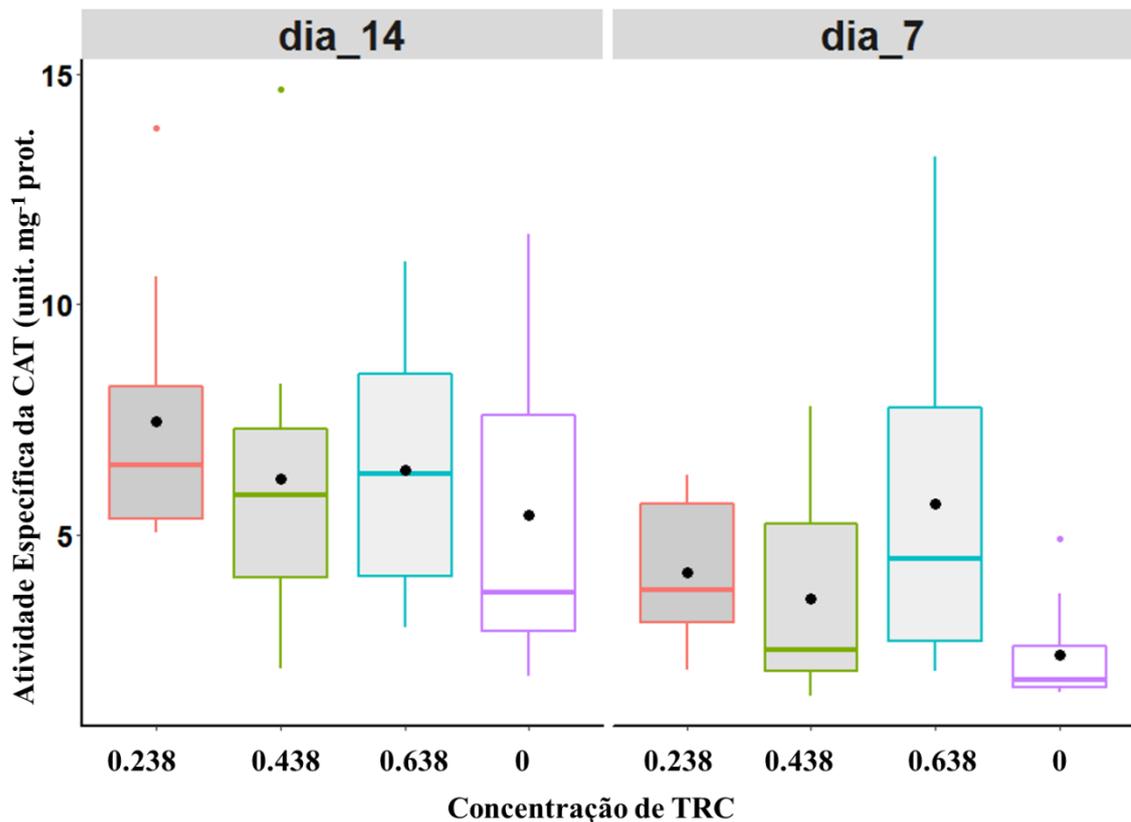
Tais dados não corroboram aos dados obtidos na enzima GST, onde o grupo apresentou valores elevados o que indica que o mecanismo antioxidante estava ativado, podendo este resultado de peroxidação lipídica estar associado a algum fator exógeno ao tratamento com TRC ou até mesmo a alguma falha na replicata biológica utilizada.

### 6.2.4-3. Atividade da Catalase (CAT)

As atividades enzimáticas da CAT dos animais expostos a diferentes concentrações do Masoten® pelo período de 7 e 14 dias, encontram-se dispostas no gráfico (4).

Observou-se que ao término do sétimo dia de experimento apenas o tratamento 0.638 mg L<sup>-1</sup> apresentou diferença (p<0.05) quando comparado aos tratamentos. Ao final do dia 14 não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto quando comparamos os dias 7 e 14 foi possível notar diferenças (p<0.05) nos tratamentos controle e 0.238 mg L<sup>-1</sup>, onde um aumento acentuado ao final do período experimental foi notado.

Gráfico 4 – Atividade específica da CAT na exposição crônica em *G. carapo* exposto a diferentes concentrações de Masoten® em um período de 7 e 14 dias.



A CAT exerce um grande papel na defesa antioxidante primária, onde exerce dupla função tais como: decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio (H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>), assim como a oxidação de compostos hidrogenados (Aebi, 1984; Cogo *et al.*, 2009).

Devido sua importância, a CAT se torna uma das principais enzimas para o monitoramento, por apresentar elevada quantidade quando um determinado organismo se encontra em estresse oxidativo (Lam *et al.*, 1995; Cogo *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Narra *et al.* (2017) utilizando uma espécie de catfish (*Clarias batrachus*) em ambiente contaminado pelos OFs clorpirifós e monocrotophos em concentrações de 1.65 e 2.14 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, observaram um aumento significativo da atividade da CAT após um período de 15 dias de exposição, entretanto após 30 dias de recuperação seus níveis já haviam se reestabelecido.

Dados semelhantes a este também foram encontrado por Monteiro; Rantin; Kalinin (2009), onde foi possível notar um aumento da atividade da CAT no *Brycon cephalus* quando exposto ao MP.

O estudo realizado com espermatozoides de *Salmo coruhensis* por Kutluyer *et al.* (2017) retrata que a intoxicação pelo OF clorpirifós também apresentou um aumento significativo das atividades da CAT quando comparados ao grupo controle.

Estes resultados corroboram aos encontrados no presente estudo, onde a dosagem de 0.638 mg L<sup>-1</sup> de TRC apresentou um aumento da atividade da CAT ao grupo exposto. Tal fato pode estar associado a uma resposta do animal ao aumento da geração de EROS acometido a intoxicação por TRC.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados evidenciados neste estudo, conclui-se que a espécie *Gymnotus carapo* conhecido popularmente como tuvira, apresenta potencial como bioindicador de ambiente contaminado por Masoten®. Quando comparada a tilápia, a tuvira apresentou um  $CL_{50}$  menor, com valor de  $6.38 \text{ mg L}^{-1}$ . O perfil hematológico de tuviras se apresentou muito semelhante aos demais peixes tratados com doses subletais de TRC, entretanto mostrou-se mais eficiente nos primeiros 7 dias de exposição. O tratamento com TRC mostrou inibição da atividade da AChE em tuvira (*G. carapo*), entretanto diferentemente dos demais estudos, os animais apresentaram uma recuperação da atividade enzimática ao final do período experimental. Pode ser visto que o TRC ocasiona estresse oxidativo nos animais expostos. É recomendada a utilização da espécie *Gymnotus carapo* como bioindicador de qualidade em ambientes contaminados por TRC, entretanto o maior entrave vem sendo o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a reprodução de tuviras em cativeiro, pois sem isso torna inviável sua utilização. Os dados obtidos neste trabalho demonstram a importância para futuras pesquisas utilizando outros xenobióticos, assim como reforça os estudos da reprodução de tuviras, uma espécie nativa com grande potencial como bioindicadora.

## 8. ANEXOS




---

**Meio Ambiente**

M.CEUA.CNPMA Nº 1

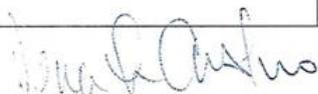
Jaguariúna, 21 de setembro de 2017

Márcia Mayumi Ishikawa  
Embrapa Meio Ambiente

**AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA**

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade da acetilcolinesterase em *Gymnotus* sp. na presença do Triclorfon (Masoten®)”, registrada com o nº 006/2017, sob a responsabilidade de Márcia Mayumi Ishikawa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 18/09/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/2017 a 01/04/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Gymnotus</i> sp.
Nº de animais	200
Peso/Idade	60 a 200 g/ Juvenil
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Cultivo/Isqueiro (estabelecimentos comerciais que comprem tuviras de pescadores que possuem autorização legal para pesca e comercialização de iscas-vivas)

  
-----  
Coordenadora da CEUA

  
-----  
Secretário da CEUA

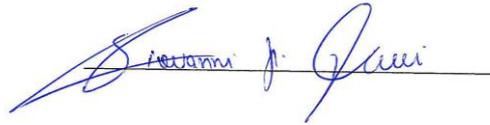
## 9. APÊNCICES

### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada Avaliação do potencial de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) como bioindicador no monitoramento do Masoten®, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 2019

Assinatura:



Nome do autor: Giovanni Henrique Ferri

RG n.º 48.236.945-0

Assinatura:



Nome da Orientador: Márcia Mayumi Ishikawa

RG n.º 134. 796. 308.12

## 10.REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v.105, p.121-126. 1984.
- ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. *Americas Fishers Society*, v. 3, p. 104-112, 2002.
- ADHIKARI, N. P.; PEHG, X.; ALIZADEH, A.; GANTI, S.; NAYAK, S. K.; KUMAR, S. K. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. *Physical Review Letters*, 93:18301- 18304. 2004.
- AGUIAR, L. H.; CORREA, C. F.; MORAES C. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (folidol 600) sobre o metabolismo e atividade de colinesterase do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (matrinxã). In: Espíndola ELG, Botta-Paschoal CMR, Rocha O, Boher MBC, Oliveira-Neto AL(ed) *Ecotoxicologia: perspectivas para o Século XXI*, RiMa, São Carlos, p.575. 2000.
- ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (Bullock, T. E., Hopkins, C. D., Popper, A. N. & Fay, F. R., eds.), pp. 306-403. Ithaca: Cornell University Press. 2005.
- ALBERT, J. S; CRAMPTON, W. G. R. Five new species of *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) from an Upper Amazonian floodplain, with descriptions of electric organ discharges and ecology. *Ichthyological Exploration Freshwaters*, 12(3): 241-226. 2001.
- ALBERT, J.S.; CAMPOS-DA-PAZ, R. Phylogenetic systematics of America knifefishes: a review of the available data. In: Malabarba, L.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S. (ed) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 419-446. 1998.
- ANDRADE. F. A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. *Toxicologia na Prática Clínica*. Belo Horizonte: Folium, 2001.
- ANDRADE, R. L. B.; ANDRADE, L.S.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C. M. Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebetes, *Poecillia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. *Acta Scientiarum Animal Science*, 27(4): 523-528. 2005.

AKAISHI, F. M.; DE ASSIS, H. S.; JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; RIBEIRO, C. O. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 46(2), 244-253. 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. 20 Out. 2013. Acessado: 13 Fev. 2017.

ANWAR, W. A. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives*. v. 105, p. 801-806, 1997.

ARAÚJO, S. M. M.; LEMOS, R. N. S.; QUEIROZ, M. E. R.; NUNES, G. S. Uso de inseticidas organofosforados nos pólos de produção na Ilha de São Luis (MA): condições de trabalho e contaminação de hortaliças. *Pesticidas*. 11:159-79. 2001.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1), 61-72. 2007.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; DE CARVALHO JR, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*, 441, 141-150. 2012.

ASSIS, C. R. D. D. *Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcadores in vitro da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos*. (Tese de Doutorado apresentada a Universidade Federal de Pernambuco). 2011.

BARTH, V. G.; BIAZON, A. C. B. Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 5(2). 2010.

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

BARONI, S. Estudos moleculares em *Gymnotus pantherinus* (Gymnotiformes, Gymnotidae): uma abordagem Sistemática e Filogeográfica (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2010..

BETANCUR, R. R.; BROUGHTON, E. O.; WILEY, K. CARPENTER, J. A.; LÓPEZ, C.; LI, N. I.; HOLCROFT, D. ARCILA, M.; SANCIANGO, J. C.; CURRETON, II, F.; ZHANG, T.; BUSER, M. A.; CAMPBELL, J. A.; BALLESTROS, A.; ROA-VARON, S.; WILLIS, W. C.; BORDEN, T.; ROWLEY, P. C.; RENEAU, D. J.; HOUGH, G.; LU, T.; GRANDE.; G. ARRATIA, G. ORTÍ. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes, PLoS Currents 5. doi. 10.1371. 2013.

BOTELHO, R. G.; DE TOLEDO ALVES, P. A.; MARANHO, L. A.; MONTEIRO, S. H.; DE SOUSA, B. I. A.; DA SILVA AVELAR, D.; TORNISIELO, V. L. Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. *Aquicultura*, 45. 2012.

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

BRAGANÇA, M. A. L.; MENIN, E.; COSTA, I. R. S. Estudo Histológico do Tubo Digestivo de *Gymnotus carapo* Linnaeus, 1758 (Siluriformes, Gymnotoidei, Gymnotidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.52, n.1, p.15-25, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. 1976.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. de S.; LOPEZ, B. S. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP. 184p. 1999.

BULLOCK, T. H.; FERNANDES-SOUZA, N.; GRAF, W.; HELLIGENBERG, W.; LANGNER, G.; MEYER, D. L.; PIMENTEL- SOUZA, F.; SCHEICH, H.; VIANCOUR, T. A. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. 2006.

CAJARAVILLE, M. P.; BENIANNI, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environments*, 247:295-311. 2000.

CAMPOS-DA-PAZ, R. Family Gymnotidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central*. EDIPURCS, Porto Alegre, 483-486 pp. 2003.

CAMPOS-DA-PAZ, R.; BUCKUP, P.A. Família Gymnotidae. In: Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. (eds). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil* ed. Museu Nacional do Rio de Janeiro, p. 120-122. 2007.

CANELLO SCHALCH, S. H.; DE ANDRADE BELO, M. A.; SOARES, V. E.; RODINI ENGRÁCIA DE MORAES, J.; RUAS DE MORAES, F. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 27(2). 2005.

CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. *Toxicology: The basic science of poisons*. 5<sup>o</sup> ed. New York: Mcgraw-Hill, 1996. 768 p.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, 17, 983- 998, 2004.

CAZENAVE, J.; WUNDERLIN, D.A.; HUED, A.C. Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydora paleatus* (Jenyns, 1842), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, n.537, p. 25-33, 2005.

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture research*, 36(2), 144-149. 2005.

CHANG, C. C.; LEE, P. P.; LIU, C. H.; CHENG, W. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & shellfish immunology*, 20(4), 574-585. 2006.

CHEN, X J.; REN, Y. J.; MENG, Z. Y; LU, C. L.; GU, H. T.; ZHUANG, Y. Q. Dissipation kinetics, safety evaluation, and preharvest interval assessment of trichlorfon application on rice. *Environmental monitoring and assessment*, 188 (5), 266. 2016.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, v. 260, p. 625-634, 1989.

CHOUDHORY, A.; PROCHAN, S.; SOHO, M.; SANJAL, N. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, v.48, p.114-127, 2008.

CLARO, F. L. *Gymnotus carapo e Gymnotus sylvius (Teleostei: Gymnotidae): uma abordagem citogenético-molecular*. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2008.

COELHO, S.; OLIVEIRA, R.; PEREIRA, S.; MUSSO, C.; DOMINGUES, I.; BHUJEL, R. C.; NOGUEIRA, A. J. Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. *Aquatic toxicology*, 103(3-4), 191-198. 2011.

COGO, A. J.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line*, 7(1), 37-42. 2009.

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

DA CONCEIÇÃO PETRONILHOA, E.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. ACETILCOLINESTERASE: ALZHEIMER E GUERRA QUÍMICA. *Ciência e Tecnologia*, 3. 2011.

CONSTANZO, L. S. *Fisiologia*. 4° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010. 496p.

COPPAGE, D. L.; MATTEWS, E. Short term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11:483-488. 1974.

CORRAL, A. C. T. *Uso do óleo essencial de Piper aduncum na ração para o controle de nematóides de pirarucu Arapaima gigas, Schinz 1822*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Nilton Lins/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas). 69pp. 2014.

COYLE, J. T.; PRICE, D. L.; DELONG, M. R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589), 1184-1190. 1983.

DARBOUX, I.; BARTHALAY, Y.; PIOVANT, M.; HIPEAU-JACQUOTTE, R. The structure-function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. *The EMBO journal*, 15(18), 4835. 1996.

DAS, S. A review of dichlorvos toxicity in fish. *Curr World Environ*, 8(1), 143-149. 2013.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18(12), 1296-1301. 2014.

DHEER, J. M. S.; DHEER, T. R.; MAHAJAN, C. L. Haematological and haematopoietic responses to acid stress in an air-breathing freshwater fish. *Channa punctatus* Bloch. *Journal Fish Biology*. v. 30, p 577-588, 1987.

DORES, E. F. G. C.; De-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cellfunction. *Physiol. Rev* V. 82: pag 47-95. 2002.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D., editores. *Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons*. 4. ed. Nova York: Mc Graw Hill; p. 565-622. 1993.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95. 1961.

FLORES-NAVA, A.; VIZCARRA-QUIROZ, J. J. Acute toxicity of trichlorfon (Dipterex) to fry of *Cichlasoma urophthalmus* Günther. *Aquaculture Research*, 19(4), 341-345. 1988.

FROSE, R.; PAULY, D. *FishBase World Wide Web electronic publication*. 2014. Fishbase.org. Acessado 12. Set. 2017.

FRAGA, A. S. *Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados* (Doctoral dissertation, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes). 2010.

FÁVARO, L. F.; OLIVEIRA, E. C. Ecologia reprodutiva em peixes. In: RIBEIRO, C. A. O.; GRÖTZNER, S. R.; REIS FILHO, H. S. *Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia*. Santos: Santos Editora, 2012. 422 p.

T. H. B. FERNANDES-SOUZA; N., GRAF; W. HEILIGENBERG; W. LANGNER; G. D. L. M; TA. V. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. *Acta Amazonica*, 9 (3), 549-572. 1979.

FERREIRA, J. B. *ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOPATOLOGIAS BRANQUIAIS EM TAMBAQUI (Colossoma macropomum, Cuvier, 1818) SOB A INFLUÊNCIA DO TRICLORFON*. 2016.

GARÁDI, P.; DOMARCO, R.C.; PINHEIRO, C.W.L. Avaliação do uso de inseticida (orgânicos fosforados) no combate às Odonatas e na seleção zooplancônica em piscicultura de alevinagem. *Estudos de piscicultura*. Brasília, 1988, 71p.

GIOVANOLI-JAKUBZAK, T.; FITAK, B.; CHODKOWSKI, J. Photolysis of Dipterex and DDVP under the influence of UV irradiation. *Rocz. Chem.*, v.45, p. 689-694, 1971.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.*, v.56, p. 35-39, 1971.

L. GUILHERMINO, M.C.; LOPES, A. P.; CARVALHO, A. M. V. M. SOARES. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*, *Chemosphere* 32 (4) (1996) 727– 738.

GUILOSKI, I. C. *Estudos in vivo e in vitro dos efeitos de pesticidas em peixes nativos* (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Paraná). 2009.

GUIMARAES, A. T. B.; ASSIS, C.; BOEGER, W. A. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68(1):57-62 DOI: 10.1016. 2006.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol*, v.77, p.218-31. 1981.

HANSEN, L. G.; KAPOOR, I. P.; METCALF, R. L. Biochemistry of selective toxicity and biodegradability: comparative O-dealkylation by aquatic organisms. *Comparative and general pharmacology*, 3(11), 339-344. 1972.

HAZARIKA, S. N.; SARKAR, S.; HAJARE, M.; KATARIA, J. K.; MALIK, A.. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study, *Toxicology*. 185 (2003) 1–8.

HE, F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. *International Archives of Occupational & Environmental Health*. v. 65, p. 569-576. 1993.

HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. 2 nd ed. *Boca Raton: Lewis Publishers*. 1995.

HIRATA, R.; SKORTZARU, B.; NARCISO, E. S. Avaliação da degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 70(3), 359-365. 2003.

HOSKINS, B.; FERNANDO, J. C. R.; DULANEY, M. D.; LIM, D. K.; LIU, D. D.; WATANABE, H. K.; HO, I. K. Relationship between the neurotoxicities of soman, sarin and tabun, and acetylcholinesterase inhibition. *Toxicology letters*, 30(2), 121-129. 1986.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. *Evaluations of some pesticide residues in food. The monographs*. 1971.

ISAAC, A., GUIDELLI, G. M.; DE FRANÇA, J. G.; PAVANELLI, G. C. Composição e estrutura das infracomunidades endoparasitárias de *Gymnotus* spp. (Pisces: Gymnotidae) do rio Baía, Mato Grosso do Sul, Brasil-DOI: 10.4025/actascibiolsci. v26i4. 1527. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 26(4), 453-462.2008.

ISIK, I.; CELIK, I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92(1), 38-42. 2008.

IVANINA, A. V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 148:72-79. 2008.

- DE JESUS, T. B.; DE CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia brasiliensis*, 12(4), 7. 2008.
- JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26(10), 853-856. 1991.
- JUAREZ, L. M.; ROUSE, D. B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. *Progressive Fish-Culturist*. v.45, n.4, p.214-216, 1983.
- KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, Teleostei). *Rev. Acad., Curitiba*, 3(4), 51-58. 2005.
- KLEIN, S.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; REIDEL, A.; SIGNOR, A.; SIGNOR, A. A. Chemical products for *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) control in surubim do Iguaçu *Steindachneridion* sp., Garavello (1991) Fingerlings. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(1), 51-58. 2004.
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Berne & Levy: Fisiologia*. 6° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. 859p.
- KUBITZA, F.; KUBITZA L. M. M. *Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados*, 3. ed. Piracicaba: Degaspari, 1998, 54p.
- KREBS, C.; WEINBERG, J.; AKESSON, E. *Neurociências ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2012. 446p.
- LAM, W. G.; WONG, M. K.; CHEN, N.; SIN, Y. M. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Aquaculture* 131:219-230. 1995.
- LANG, G.; KUFCSAK, O.; SZEGLETES, T.; NEMCSOK, J. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by metidathion and paraquat in alimentary canal of common carp. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(1), 55-59. 1997.

- LAYER, P. G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays*, 12(9), 415-420. 1990.
- LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; HORNREICH, G.; EHRLICH, G.; MESHORER, A.; ECKSTEIN, F.; ZAKUT, H. Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression causes transient hematopoietic alterations in vivo. *Gene therapy*, 1(2), 127-135. 1994.
- LINHARES, A. G. *Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional.* (Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Pernambuco) 2013.
- LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; DA SILVA QUEIROZ, V.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 8(4). 2017.
- LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C.; CECCARELLI, P. S.; TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere*, 64(1), 56-62. 2006.
- LOURENÇATO, L. F. *Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre, Colombo, PR.* Curitiba: (Dissertação de Mestrado). UFPR, 48p. 2010.
- LOVEJOY, N.; LESTER, K.; CRAMPTON, W.G.R.; MARQUES, F.P.L.; ALBERT, J. Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical Knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, 54: 278-290. 2010.
- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish physiology and biochemistry*, 42(2), 711-747. 2016.
- MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações.* Univ Pontifica Comillas. 2001.
- MAGO-LECCIA, F. *Electric Fishes of the Continental Waters of America.* Venezuela: FUDECI. 1994.

- MARQUES, D. K. S.; CALHEIROS, D. F. Diversidade de tuviras comercializadas como iscas vivas pelas comunidades do Porto da Manga e Codrasa, Corumbá, MS. *Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* (INFOTECA-E). 2013.
- MARASCHIN, L. Avaliação do Grau de Contaminação por Pesticidas nas Água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense. (Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Mato Grosso). 2003.
- MASSOULIE, J.; BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual review of neuroscience*, 5(1), 57-106. 1982.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*. 41(1), 31-91. 1993.
- MATAQUEIRO, M. I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida *methyl parathion* no pacu (*Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887*). 2002.
- MATOS, K. S. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano. (Dissertação de Mestrado apresentada Universidade Federal de Lavras). 2012.
- DE ARAÚJO MAXIMIANO, A.; DE FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; DE ASSIS, M. P.; DE MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Use of veterinary drugs and pesticides in the aquatic environment: demands, regulation and concerns on risks to human and enviromental health. *Ciência & Saúde Coletiva*, 10(2), 483. 2005.
- MAXIME, E. L.; ALBERT, J. S. A new species of Gymnotus (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Fitzcarrald Arch of Southeastern Peru. *Neotropical Ichthyology*, 7(4): 579-585. 2009.
- MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; McKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Boca Raton: Lewis Publishers*, cap. 4, p. 155 –196.1992.
- MCCORMICK, S. D.; NAIMAN, R. J. Hypoosmoregulation in an anadromus teleost: influence of sex and maturation. *J. Exp. Zool.*, v.234, p.193-198, 1985.

MONSERRAT, J. M.; GERACITANO, L. A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comment Toxicol* 2003. 9: 255–69.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR®(methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(1), 40-49. 2009.

MORAES, G.; AVILEZ, I.; ALTRAN, A. Respostas bioquímicas e hematológicas de tuvira *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposta à hipóxia ambiental. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 633-640. 2002.

NARRA, M. R.; RAJENDER, K.; REDDY, R. R.; MURTY, U. S.; BEGUM, G. Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. *Chemosphere*, 168, 350-357.2017.

MINAS GERAIS. Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, FUNDAÇÃO Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC. *Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 144 p., 2000.*

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017. Acessado: 18 Ago. 2017. Disponível: [mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxico](http://mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxico).

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, M. M.; SILVA FILHO, M. V.; BASTOS, V. L. C.; FERNANDES, F. C.; BASTOS, J. C. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. *Marine environmental research*, 63(4), 303-312. 2007.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3. ed. Maringá, PR: Eduem, 2008. p. 17-307. PERES, Frederico et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 10, 10 (suppl), p. 27-37, set./dez. 2005.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1998. 288p.

PAVANELLI, G. C. J.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá. EDUEM, 2002, 305p.*

PEIXOTO, S. C. *Estudo da estabilidade a Campo dos Pesticidas Carbofurano e Quincloraque em Água de Lavoura de Arroz Irrigado empregando SPE e HPLC-DAD.* (Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Santa Maria). 2007.

PEREIRA, R. A. C.; RESENDE, E. K. Estudos comparativos da alimentação de *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotidae) com a fauna associada as raízes das macrófitas aquáticas na planície de inundação do baixo Rio Negro, Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Socio-Economicos do Pantanal, 3., 2000, Corumbá. Os desafios do novo milênio. *Resumo Corumbá: Embrapa Pantanal*, p.269-270.2000.

PEREIRA, R. A. C.; DE RESENDE, E. K. Alimentação de *Gymnotus cf. carapo* (Pisces: Gymnotidae) e suas relações com a fauna associada às macrófitas aquáticas no Pantanal, Brasil. *Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa*. 2006.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. *É veneno ou é remédio*, 21-41. 2003.

PIMENTEL-SOUZA, F.; PEREIRA, J. B.; ALVARENGA, N. P. Comportamento, termorregulação e aclimação em temperaturas elevadas do peixe elétrico *Gymnotus*. *Ciência e Cultura*, v.28, n.8, p.940-944, ago. 1976.

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

QUEIROZ, M. N. *Efeito do extrato aquoso da Piper aduncum L no controle de parasitas monogenéticos (Plathyhelminthes: Monogenoidea) e parâmetros fisiológicos do pirarucu Arapaima gigas Schinz, 1822.* (Dissertação de Mestrado, Universidade Nilton Lins/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas). 2012.

RAND, G. M. Fish Toxicity Studies. In: DI GIULIO, R.T.; DAVID, E. H. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Drogas que Inibem a Cholinesterase*. 4a edição, Guanabara Koogan.110-115. 2001.

- RANZANI-PAIVA M. J; ISHIKAWA C. M; PORTELLA M. C; CELIBERTO R. J. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). *Boletim do Instituto Pesca*, 14: 83-92. 1987.
- DA ROCHA, A. S. *Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1836)*. (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Tocantins). 2009.
- RODRIGUES, E. L.; EIRAS, A. C.; VEIGA, M. L.; PACHECO, F. J. Alterações Hematológicas em Curimatã, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997.
- ROSA, R. M. *Aspectos histológicos de testículos da tuvira (Gymnotus spp.) submetida à reprodução por diferentes indutores hormonais*. 2015.
- ROTTA, M. A. Aspectos Biológicos e Reprodutivos para a Criação da Tuvira (*Gymnotus* sp.) em Cativeiro – I. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 73/ Embrapa Pantanal*, Corumbá, p. 1-16, 2004.
- SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; WALKER, C. H. In vitro and in vivo cholinesterase inhibition in lacertides by phosphonate-and phosphorothioate-type organophosphates. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 67(1), 1-12. 2000.
- SAMPATH, K.; VELAMMAL, S.; KENNEDY, I.J.; JAMES, R. Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. *Acta Hydrob.* v. 35, p. 73- 83. 1993.
- SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim Nova*. 30(1):159-70. 2007.
- SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. *Science*, 273(5276), 749-751. 1996.
- SAVOY, V. L. T. *Classificação dos Agrotóxicos*. Instituto Biológico, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 91-92. 2011.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*. Berlin, v.215, n.2, p.213-219. 1993.

- SILVA, A.; QUINTANA, L.; GALEANO, M.; ERRANDONEA, P. Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguai. *Environmental Biology of Fishes*, v.66, p.329-338, 2003.
- SILVA, H. C.; MEDINA, H .S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl Parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces,Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 197–201. 1993.
- SILVA, R. R. D. *Uso orientado de organofosforado em aquicultura*. 2013.
- SILVIA, M. J.; SANTOS, J. R.. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Oecol. Bras.*, v.11, n.4, p.565-573. 2007.
- SILVA, A. S. E.; LIMA, J. T.; BLANCO, Q. S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). *Revista Centauro*, 3(1), p24-32. 2012
- SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. REVIEWS Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30(1), 2. 2009.
- SOARES, L. F. *Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos*. Rio de Janeiro. Monografia (Especialização em Pediatria) - Universidade Federal Fluminense. 1998.
- SANTOS, P. I. M. D. *Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase do peixe Danio rerio* (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte). 2009.
- SUSSMAN, J. L.; HAREL, M. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872. 1991.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; SILVA, E. D.; MORAES, F. R. E PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Acta Scientiarum* v.21, p.337-342. 1999b.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. *Ed.Eletrônica e Arte Final*. Ribeirão Preto-SP. 144 paginas, 2004.

- TAYLOR, P.; BROWN, J. H. *Acetylcholine*. In: SIEGEL, G. J., AGRANOF, B. W., ALBERS, R. W., MOLINOFF, P. B. *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A. p. 214-242. 1999.
- THOMAZ, J. M.; MARTINS, N. D.; MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5), 1413-1424. 2009.
- THEODORO, E. Caracterização Sócio-Econômica da Atividade de Coleta e Comercialização de Isca Viva na BAP-MT. In: Projeto implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o pantanal e bacia do alto paraguai. *Resumo Executivo do Relatório Final*. Cuiabá: ANA/GEF/PNUMA/OEA – FEMA/MT. 27p. 2003.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, v. 64, p. 135-142. 2002.
- UNER, N.; SEVGILER, Y.; DURMAZ, H.; PINER, P. In vivo alterations in glutathione related processes, lipid peroxidation, and cholinesterase enzyme activities in the liver of diazinon exposed *Oreochromis niloticus*. *Toxicol. Mech. Methods* 17, 317e324. 2007.
- URBINATI, E. C.; ABREU, J.; CAMARGO, A.; PARRA, M. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, 229(1-4), 389-400. 2004.
- VEIGA, M. L. D.; RODRIGUES, E. D. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(2), 171-175. 2002.
- VENTURA, A. S.; ISHIKAWA, M. M.; GABRIEL, A. M. D. A.; SILBIGER, H. L. N.; CAVICHIOLO, F.; TAKEMOTO, R. M. Histopathology from liver of tuvira (*Gymnotus* spp.) parasitized by larvae of nematodes. *Ciência Rural*, 46(7), 1233-1239. 2016.
- VENTURA, A. S.; JERÔNIMO, G. T.; FERRI, G. H.; PÁDUA, S.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Erythrocyte parameters and condition factor of *Gymnotus* sp.(Gymnotiformes: Gymnotidae) under growing conditions. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 40, e20318, p 1-6. 2018.

VENTURINI, F. P. *Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (Piaractus mesopotamicus, HOLMBERG, 1887) exposto à concentração sub-letal de triclorfon e recuperação*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, [s.d.], p. 1-77, 2010.

VILARINHO, F. *Pesticidas*. 2011. [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas\\_2011.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas_2011.pdf). Acessado: 11 Mai. 2017.

YOSHIMURA, H.; ENDOH, Y. S. Acute toxicity to freshwater organisms of antiparasitic drugs for veterinary use. *Environmental toxicology*, 20(1), 60-66. 2005.

ZANIBONI FILHO, E. O desenvolvimento da piscicultura brasileira sem a deterioração da qualidade da água. *Rev. Bras. Biol.* v. 57, n. 1, p. 2-9, 1997.

ZHANG, D.; MCCAMMON, J. A. The association of tetrameric acetylcholinesterase with ColQ tail: a block normal mode analysis. *PloS Computacional Biology*, v. 1, p. 484-491. 2005.

WINTROBE, M. M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Foglia Haematologica*, v.51, p.32-49, 1934.