



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAQUEL APRATTO MACIEL

**EFEITOS DA DELTAMETRINA NA EXCITAÇÃO E CONDUÇÃO
CARDÍACA E NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS WISTAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADO À FACULDADE
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS-UNICAMP PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS**

PROF. DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES

ORIENTADOR

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação ou tese defendida por Raquel Apratto Maciel, aprovada pela comissão julgadora em __/__/____ e orientada pelo Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M187e Maciel, Raquel Apratto, 1975-
Efeitos da deltametrina na excitação e condução
cardíaca e na resposta ao estresse oxidativo em ratos
Wistar / Raquel Apratto Maciel. -- Campinas, SP: [s.n],
2011.

Orientador: Felix Guilherme Reyes Reyes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Deltametrina. 2. Eletrocardiografia. 3.
Catalase. 4. Superóxido Dismutase. 5. Estresse
Oxidativo. I. Reyes Reyes, Felix Guilherme. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of deltamethrin in the stimulation and cardiac
conduction and in the response to oxidative stress in Wistar rats

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Deltamethrin

Electrocardiography

Catalase

Superóxido Dismutase

Oxidative stress

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guilherme Reyes Reyes [Orientador]

Miguel Arcanjo Areas

Silvia de Oliveira Santos Cazenave

Data da defesa: 27/07/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Presidente)

.....
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
(Membro)

.....
Prof.(a) Dr.(a) Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
(Membro)

.....
Prof.(a) Dr.(a) Silvia de Oliveira Santos Cazenave
(Suplente)

.....
Prof Dr. Angelo Zanaga Trape
(Suplente)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Aline,
pessoa maravilhosa, minha filha
querida, que amo de todo meu
coração e de toda minha alma.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda, que sempre me deram muita proteção e muita saúde.

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que sempre está com as portas abertas a quem deseja progredir.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Felix, pela amizade, respeito e pelos ensinamentos científicos.

Agradeço ao Instituto Assistencial Ajinomoto, que financiou essa pesquisa e custeou minha bolsa de estudos, permitindo que eu me dedicasse aos estudos integralmente, contribuindo, assim, na evolução da pesquisa nesse país.

Agradeço à minha mãe querida, Leda, que me ensinou o otimismo, a honestidade e a alegria de viver.

Agradeço ao meu pai, Wilson, que me ensinou a ter persistência e a ter garra diante de qualquer obstáculo.

Agradeço ao meu irmão Roberto, que em muitos momentos, foi meu anjo da guarda em situações adversas, trazendo paz, proteção e esperança ao meu coração.

Agradeço a minha irmã Roberta, pelo carinho e amizade, através de suas preces e pensamento positivo.

Agradeço ao meu melhor amigo amor, Jayme, pai da minha filha, que apesar da distância e dos desencontros que tivemos, sempre acreditou e continua acreditando na minha capacidade e na minha integridade.

Agradeço à família Vianna, meus amigos tão queridos - Ana Cláudia, Gaspar, Antônio, afilhada Maria Clara, Bruno, Maria Cecília, Maria Carolina, Piti e Poli- que me conquistaram com uma amizade sincera. Sempre acreditaram em mim, mesmo nas horas de derrota, vibraram comigo nas vitórias e continuam acreditando e me incentivando a ser melhor a cada dia. Uma família exemplar, que Deus colocou no meu caminho em Campinas.

Agradeço à Bioterista Suzana do LEB- Departamento de Nutrição, pelos ensinamentos, amizade e força.

Agradeço aos amigos que me apoiaram durante essa jornada: Rita, Laura, Lúcia, Agueda, Angélica, Marcílio, Paula, Pablo, Michelle, Luciana, Renata, Fernanda e Cristiane. Amigos estes, que de um jeito ou de outro, estiveram ao meu lado em muitos momentos.

Agradeço às Técnicas de laboratório de Toxicologia e amigas Marcela, Silvia e a querida Maria José, pela amizade e cooperação.

“Viver, é acalantar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa maior inspiração. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz” Mário Quintana.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xi
SUMMARY	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO I. Piretróides: aspectos toxicológicos-Revisão	
Resumo.....	08
Summary.....	09
Introdução.....	10
Aspectos gerais dos agrotóxicos.....	13
Piretrinas e Piretróides	14
Características físico-químicas dos piretróides	15
Principais características físico-químicas da deltametrina	17
Utilização dos piretróides	18
Aspectos toxicológicos dos piretróides.....	18
Limite Máximo de Resíduos e Ingestão Diária Aceitável	18
Vias de Exposição e Toxicocinética dos piretróides	22
Aspectos de Resíduos.....	25
Toxicodinâmica dos Piretróides.....	26
Considerações finais	30
Referências Bibliográficas.....	30
CAPÍTULO II. Efeitos da deltametrina na excitação e condução cardíaca e na resposta ao estresse oxidativo em ratos wistar.	
Resumo.....	39
Summary.....	41
Introdução.....	43
Metodologia.....	51
Protocolo do Experimento	52
Ensaio Piloto para tempo de registro do eletrocardiograma.....	53
Avaliação do grau de pureza da deltametrina	53
Eletrocardiograma	54
Análises Bioquímicas	54
Análise Estatística	56
Resultados.....	56
Eletrocardiograma	56
Análises Bioquímicas	61
Discussão.....	66
Conclusões.....	71
Referências Bibliográficas	73
CONCLUSÕES GERAIS.....	82
ANEXO-Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP	84

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Piretróides: aspectos toxicológicos-Revisão

Figura 1.	Flor de crisantemo.....	15
Figura 2.	Fórmula química da piretrina.....	15
Figura 3.	Fórmula da estrutura química de piretróides sintéticos.....	17
Figura 4.	Fórmula estrutural da deltametrina.....	17
Figura 5.	Principais vias de biotransformação da deltametrina em mamíferos ..	17

CAPÍTULO II. Efeitos da deltametrina na excitação e condução cardíaca e na resposta ao estresse oxidativo em ratos wistar

Figura 1.	Eletrocardiograma padrão.....	46
Figura 2.	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio.....	47
Figura 3.	Sistema antioxidante.....	50
Figura 4.	Frequência Cardíaca.....	57
Figura 5.	Intervalo RR.....	57
Figura 6.	Amplitude P.....	58
Figura 7.	Duração do intervalo QRS.....	58
Figura 8.	Amplitude R.....	59
Figura 9.	Amplitude ST.....	59
Figura 10.	Amplitude T.....	60
Figura 11.	Intervalo QT.....	60
Figura 12.	Intervalo QTc.....	61
Figura 13.	Malondialdeído no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	62
Figura 14.	Atividade da Glutathione S-transferase no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	62
Figura 15.	Atividade da Glutathione reduzida no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	63
Figura 16.	Atividade da enzima Superóxido dismutase no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	64
Figura 17.	Atividade da enzima Fosfatase Alcalina no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	64
Figura 18.	Atividade da enzima Catalase no tecido cardíaco(A) e no tecido hepático (B).....	65
Figura 19.	Relação Malondialdeído (MDA) e Glutathione S-transferase no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B).....	65

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I. Piretróides: aspectos toxicológicos-Revisão

Tabela 1.	Características químicas e físicas da deltametrina.....	18
Tabela 2	Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMR) e intervalos de segurança de deltametrina para vários cultivares	21
Tabela 3.	Valores de ingestão diária aceitável (IDA) para piretróides de uso permitido no Brasil.....	22

RESUMO GERAL

As doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar em causas de morte no mundo e, segundo pesquisas, estas podem estar associadas ao estresse oxidativo - desequilíbrio entre produção de radicais livres e defesas antioxidantes. O tratamento e prevenção não farmacológico, dessas doenças, preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considerando os hábitos alimentares, consiste em aumentar o consumo de frutas, hortaliças, cereais integrais e grãos, devido as suas propriedades antioxidantes, assim como aos efeitos fisiológicos das fibras alimentares também presentes nessas fontes alimentares. Por outro lado, estudos mostram que algumas substâncias xenobióticas podem estar presentes nos alimentos, como por exemplo, os inseticidas piretróides, aumentando o risco do desenvolvimento ou agravamento de alterações cardiovasculares e, ao mesmo tempo, desestruturando as defesas antioxidantes e produzindo radicais livres nocivos às células, colocando em risco a saúde humana.

É inquestionável a necessidade do uso de agrotóxicos na produção agrícola, em programas de saúde pública, na saúde animal, bem como na silvicultura. O não cumprimento da legislação em vigor tem sido uma realidade preocupante, pois coloca em risco a saúde dos trabalhadores que manipulam essas substâncias, as pessoas que consomem os alimentos e o ecossistema. Assim, pesquisas que dimensionem os efeitos adversos que os agrotóxicos podem causar na saúde humana, contribuem com o cumprimento da legislação específica e, até mesmo, na atualização da mesma.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a exposição aguda, por via oral, de deltametrina, agrotóxico da classe dos piretróides, na excitação e condução cardíaca e no estresse oxidativo em ratos Wistar machos adultos, através de parâmetros eletrocardiográficos e da atividade de enzimas antioxidantes nos tecidos cardíacos e hepáticos.

O plano de trabalho consistiu na administração aguda, por gavagem, de deltametrina (DMT), com os animais distribuídos em 4 grupos, com 10 animais, pesando em média 200 ± 10 g cada, assim constituídos:

1) Grupo controle (5 mL de óleo de milho);

- 2) Grupo DMT10 [10% do valor da DL₅₀ da deltametrina (3,2 mg/5mL de óleo de milho)];
- 3) Grupo DMT25 [25% do valor da DL₅₀ da deltametrina (8 mg/5mL de óleo de milho)];
- 4) Grupo DMT100 [100% do valor da DL₅₀ de deltametrina (32mg/mL de óleo de milho)].

No início do ensaio, foi introduzida uma sonda de gavagem nos ratos. Logo após, os animais foram submetidos à anestesia para realização do eletrocardiograma (ECG). Após 5 min de início dos registros do ECG, a DMT foi administrada através de gavagem, conforme o planejamento experimental de cada grupo, registrando-se o ECG por mais 30 min. Após, fez-se o sacrifício dos animais por aprofundamento da anestesia. Foram retirados o fígado e o coração para mensurar a atividade das enzimas: catalase, superóxido dismutase, fosfatase alcalina, glutathione S-transferase e quantificação da glutathione reduzida e do produto da peroxidação lipídica malondialdeído.

A deltametrina alterou a condutividade elétrica do coração. O eletrocardiograma mostrou redução significativa da frequência cardíaca e aumento do intervalo RR, indicando bradicardia. Também foi constatado aumento da duração do complexo QRS e redução da amplitude da onda R, o que sugere alterações na excitação ventricular. A amplitude P não foi significativamente diferente, mostrando que a excitação e a condução elétrica atrial não foram prejudicadas. Da mesma forma, os intervalos QT e QTc não foram alterados significativamente, embora o grupo DMT100 para o intervalo QT tenha se mostrado elevado, descartando-se assim, o risco de morte súbita. O segmento ST apresentou infradesnivelamento progressivo, embora não significativo. A onda T mostrou-se positiva e sem alterações significativas, não podendo assim sugerir possibilidade de isquemia miocárdica induzida por deltametrina. As análises bioquímicas mostraram que a deltametrina provocou estresse oxidativo tanto no fígado como no coração. A lipoperoxidação ocorreu nos hepatócitos e não parece ter ocorrido nos miócitos. No fígado, o estresse oxidativo foi confirmado pelo aumento significativo da atividade das enzimas glutathione S-transferase e fosfatase alcalina, aumento da concentração da glutathione reduzida, e significativa

redução da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Já no coração, o estresse oxidativo foi evidenciado pelo significativo aumento da atividade da catalase e redução significativa da superóxido dismutase e glutathione S-transferase, assim como, pelo aumento da concentração da enzima glutathione reduzida.

Em conclusão, este trabalho constatou que a deltametrina, administrada por via oral, diferentes dosagens, em ratos Wistar, causou aumento do estresse oxidativo e este pode ter ocasionado alterações na condução e excitação cardíaca verificadas no presente estudo.

SUMMARY

Cardiovascular diseases are in the first rank among causes of death in the world and, according to researches, they can be associated with oxidative stress-imbalance between free radicals productions and antioxidant defenses. The treatment and non-pharmacological prevention of these diseases, advocated by the World Health Organization (WHO), consist in to increase consumption of fruits, vegetables, whole grains and beans, because of their antioxidant properties and the physiological effects of dietary fiber also present on those foods. On the other hand, studies have shown that some xenobiotic substances may be present in food, such as pyrethroid insecticides, increasing the risk of development or aggravation of cardiovascular alterations and, at the same time, destabilizing the antioxidant defenses and producing free radicals which are harmful to cells, endangering human health.

There is no doubt about the necessity of the use of pesticides in agricultural production, in public health programs, animal health, as well as in forestry. The non-compliance with the legislation in force has been a troubling reality because it puts in risk the health of workers who handle those substances, the people who consume foods and the ecosystem. Researches that evaluate the harmful effects that pesticides can cause to the human health, contribute to the fulfilling of the specific legislation and, even, in the update of it.

This work aims to evaluate the acute oral exposure of deltamethrin, a pyrethroid pesticide, on the excitation system of the heart and on the oxidative stress in adult male Wistar rats, by means of electrocardiographic parameters, and antioxidant enzymes in liver and heart tissues, respectively.

The work consisted on the acute administration, by gavage, of deltamethrin (DMT), to animals distributed in 4 groups, containing 10 animals each, as follows:

- 1) Control Group (5 mL of corn oil);
- 2) DMT10 Group [10% of the LD₅₀ value of deltamethrin (3,2mg/5mL corn oil)];
- 3) DMT25 Group [25% of the LD₅₀ value of deltamethrin (8 mg/5mL corn oil)];
- 4) DMT100 Group [100% of the LD₅₀ value of deltamethrin (32mg/mL corn oil)].

At the beginning of the assay, it was introduced in the rats a probe of gavage. Soon after, the animals were subjected to anesthesia for conduction of

the electrocardiogram (ECG). After 5 minutes of the beginning of the ECG record, the deltamethrin was administered via gavage, accordingly to the experimental planning of each group, and the ECG recorded for additional 30 minutes. Upon completion of the ECG recording, the rats were killed by deepening of anesthesia. The liver and heart were withdrawn to measure the activity of the enzymes: catalase, superoxide dismutase, glutathione transferase, alkaline phosphatase, as well as of the quantification of the malondialdehyde biomarker and reduced glutathione.

Deltamethrin was capable of changing the electrical conductivity of heart. The electrocardiogram showed significant reduction of the heart rate and increase of the RR interval, indicating bradycardia. It was also found to increase of the duration QRS complex and reduction of the R wave amplitude, **which means** that there were alterations in ventricular excitation. The P amplitude was not significantly different, showing that arousal and atrial electrical conduction was not impaired. Similarly, the QT and QTc intervals were not altered significantly, although has been shown high of the group DMT100, discarding the risk of sudden death. The ST segment depression showed a progressive, though not significant. The T wave was positive and no significant changes and therefore can not suggest the possibility of myocardial ischemia induced by deltamethrin. Biochemical analysis showed that deltamethrin causes oxidative stress in both liver and heart. Lipid peroxidation occurred in hepatocytes and not observed in myocytes and this is confirmed by checking the increased activity of the alkaline phosphatase, glutathione s-transferase and reduced activity of the superoxide dismutase and catalase and increased of concentration of the reduced glutathione in the liver. In the heart, oxidative stress has been shown by increased activity of the catalase , increased concentration of the glutathione reduced and reduced activity of the superoxide dismutase and glutathione s-transferase.

In conclusion, this study found that deltamethrin administered orally at different doses in rats, caused increased oxidative stress and this may have caused changes in cardiac excitation conduction and verified.

Introdução Geral

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte por doenças não transmissíveis no mundo. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2005, representando 30% do total de mortes. Cerca de 80% destas mortes ocorreram em países em desenvolvimento (1). No início do século XX, as doenças cardiovasculares eram responsáveis por menos de 10% das mortes em todo o mundo, enquanto no início do século XXI já são responsáveis por quase 50% das mortes nos países desenvolvidos e 25% nos países em desenvolvimento. No Brasil, ocorrem 300 mil óbitos anuais, representando 820 óbitos por dia. Em Campinas-SP, entre seis e sete pessoas morrem diariamente em decorrência de doenças cardiovasculares, sendo essa a principal causa de óbito na população adulta (2).

Pesquisas mostram que o desenvolvimento das doenças cardiovasculares no organismo pode estar associado à formação de espécies reativas do oxigênio (radicais livres). Dentre os fatores comportamentais de risco destacam-se o tabagismo, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, a obesidade, as dislipidemias, a ingestão insuficiente de frutas e hortaliças e o sedentarismo (2). A principal prescrição não farmacológica para doenças cardiovasculares, tanto preventivamente, quanto terapêuticamente, é a de manter uma dieta alimentar pobre em gorduras saturadas, pobre em gorduras trans, hipoglicídica (pobre em carboidratos simples) e rica em fibras alimentares, principalmente do tipo solúvel, sendo que as fontes de fibras alimentares são, principalmente, hortaliças, frutas e grãos. Esses alimentos também são as principais fontes naturais de antioxidantes (3, 4, 5, 6).

Estudos confirmam que algumas substâncias, naturalmente presentes ou adicionadas aos alimentos, podem aumentar o risco do desenvolvimento de alterações cardiovasculares quando ingeridas de forma contínua e por um longo período de tempo (7). Agentes tóxicos, chamados xenobióticos, são fatores exógenos que podem aumentar a produção de radicais livres nos organismos vivos ou desestruturar os sistemas de defesa antioxidante do organismo, podendo levar ao estresse oxidativo, responsável por várias patologias, entre elas, as cardiopatias (8,9). Estudos com ratos indicam que a ingestão de uma dose

equivalente a 10% do valor da dose letal 50 (DL₅₀) de inseticidas piretróides causam alteração na despolarização e repolarização ventricular, sugerindo cardiotoxicidade e que 1/5 da DL50 das mesmas substâncias causou prolongamento significativo do intervalo QT nos eletrocardiogramas (ECGs) dos animais experimentais, ressaltando que esse tipo de prolongamento está associado à morte súbita (10). Kanbur (11) verificou a ocorrência de estresse oxidativo em camundongos machos após exposição oral à cipermetrina, por 60 dias.

Desde a década de 40, vem sendo utilizados agrotóxicos na agricultura. Hoje, já são conhecidos 3.500 tipos de ingredientes ativos. Segundo Schierow (12), a agricultura é responsável por, aproximadamente, 75% do uso de agrotóxicos. O uso comercial, industrial e governamental, representa 18%, sendo 7% destinados ao uso doméstico. A categoria dos agrotóxicos mais usados na agricultura compreende os herbicidas com (59%) e os inseticidas (21%).

Atualmente, os piretróides são os inseticidas mais utilizados, pois são efetivos contra um largo espectro de insetos, apresentam alta estabilidade química e são necessárias baixas quantidades para alcançar sua eficácia, conferindo ao produto maior rendimento e, conseqüentemente, reduzindo custos agrícolas. Mesmo sendo necessárias baixas doses em relação a outros inseticidas, o aumento de seu uso eleva a exposição sobre organismos não-alvo, seja direta ou indiretamente. Na lavoura, a exposição tópica e por inalação, ocorre devido ao não uso de equipamentos de proteção individual ou uso inadequado dos mesmos. A ingestão ou inalação de pó contaminado pode ser observada após o uso de inseticidas no interior de domicílios (13).

A despeito da necessidade de promoção do aumento do consumo de hortaliças, frutas, verduras e grãos, há um preocupante quadro de contaminação desses alimentos por agrotóxicos, considerando que a principal via de exposição a inseticidas piretróides é alimentar (oral)(14). Os piretróides têm sido encontrados nos alimentos que chegam à mesa dos consumidores diariamente em valores acima dos estabelecidos pela legislação vigente. Isso mostra que as boas práticas agrícolas não estão sendo cumpridas, podendo ser um risco à saúde da população. Em 2008, verificou-se que 36% das amostras analisadas de morango,

32% das de uva e 18% das de alface apresentavam resíduos do piretróide deltametrina, sendo que este agrotóxico não é autorizado para uso nas culturas citadas, e 64% das amostras analisadas de pimentão estavam acima do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido (2). Outros piretróides de uso não autorizado também foram encontrados nas culturas de tomate, abacaxi, laranja e pimentão. Segundo algumas pesquisas, a utilização de piretróides tem aumentado os riscos à saúde de pássaros e mamíferos (15). Ainda, ensaios laboratoriais demonstraram que os piretróides são muito tóxicos para peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, tais como lagostas e camarões (16). Dessa forma, podem agir nessas espécies por exposição acidental durante a aplicação do produto, ou através da ingestão de ração contaminada acidentalmente ou por contaminação ambiental.

Diante do exposto, verifica-se a necessidade da realização de estudos em relação às possíveis alterações cardiovasculares e das defesas antioxidantes que os piretróides podem causar aos mamíferos expostos. É inquestionável a importância do cumprimento das boas práticas agrícolas previstas na lei. Além disso, é atual a preocupação com a possibilidade de que a exposição indevida aos agrotóxicos influencie no agravamento e/ou desencadeamento de doenças cardiovasculares e de outras patologias associadas ao estresse oxidativo.

Assim, o objetivo geral desta pesquisa foi o de avaliar a resposta ao estresse oxidativo e excitação e condução cardíaca em ratos Wistar adultos, após exposição aguda, oral, à deltametrina.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar parâmetros eletrocardiográficos, tais como: frequência cardíaca (BMP); intervalo QT; intervalo QTc; intervalo RR; duração do complexo QRS; amplitude da onda P; amplitude da onda R; amplitude da onda T; amplitude ST em ratos *wistar* adultos após administração oral aguda de deltametrina, nas doses correspondentes a: 10%, 25% e 100% do valor da DL₅₀;
2. Com a finalidade de avaliar o efeito da deltametrina em relação à resposta antioxidante do organismo de ratos Wistar adultos machos foi

determinada nos tecidos hepático e cardíaco atividade das seguintes enzimas antioxidantes:

- a. Superóxido dismutase e catalase que participam nas reações bioquímicas de destoxificação do peróxido de hidrogênio;
 - b. Glutathione transferase e quantificação da glutathione reduzida que participam da destoxificação de xenobióticos, sendo que a última também atua no mecanismo de proteção à ocorrência de placas de ateroma;
 - c. Fosfatase alcalina que hidrolisa compostos fosfomonoésteres e atua em reações de transfosforilação;
3. Quantificar malondialdeído, que é produto das reações de lipoperoxidação das membranas celulares.

Referências Bibliográficas

1. WHO- World Health Organization - Department of Food Safety World Health Organization (WHO). **Preventing chronic disease: a vital investment: WHO global report. Geneva.** Disponível em: <http://www.who.int/fsf/>. Acessado em dezembro, 2010.
2. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Relatório do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**, 2008.
3. REIS, N. T. **Perspectivas dos cuidados nutricionais nas doenças crônico-degenerativas.** Nutrição em Pauta, v.9, n. 48, p.32-36, 2001.
4. PELKMAN, C.; POHLE, R. M. S. **Effects of Dietary Fiber on Satiety and Energy Intake.** Nutrition & the M.D., v.33, n.4, 2000.
5. MCKEE, L. H; LATNER, T. A. **Underutilized sources of dietary fiber: A review.** Department of Family and Consumer Sciences, New Mexico State University, 2000.
6. SALVADO, J. S. **Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases.** British J. of Nutrition, v.96, p.45-51, 2006.
7. MELLO DA SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. **Riscos químicos ambientais à saúde da criança.** J Pediatría, v.81, n.5, p.S205-S211, 2005.
8. ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA D. P.; AUGUSTO, L. G. S. **Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate.** R Saúde Pública, v.34, n.3, p.309-13, 2000.
9. ÁÑEZ, E. T. **Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries.** Environmental Health Perspectives, v.110, n. 6, p.901–909, 2002.
10. SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Pyrethroids: a review.** Alim Nutr Araraquara, v.18, n.3, p. 339-349, 2007;
11. KANBUR, M.; LIMAN, B. C.; ERASLAN, G.; ALTINORDULU, S. **Effects of Cypermethrin, Propetamphos, and Combination Involving Cypermethrin and Propetamphos on Lipid Peroxidation in Mice.** Inc. Environ Toxicol, v.23, p.473–479, 2008.

12. SCHIEROW, L. J. Congressional Research Service Report for Congress. **Pesticide Policy issues.** Disponível em <http://www.cnie.org/nle/pest-2.html>. Acessado em dezembro de 2008.
13. HEUDORF, U.; ANGERER, J. **Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany.** Environ Health Perspect., v.109, n.3, p.213-217, 2001.
14. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Ministério da Saúde.** Disponível em: <http://www.cardiol.br/funcor/epide/epidemiio.htm>. Acessado em Outubro de 2010.
15. NARAHASHI, T. **Neuronal ion channel as the target sites of insecticides.** Pharmacol Toxicol, v.79, n.1, p.1-14. 1996.
16. GARRIDO, F. A. **Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS.** Anal Bioanal Chem, v.383, p.1106-1118, 2005.

CAPÍTULO I

PIRETRÓIDES: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS - REVISÃO

Este trabalho será submetido para publicação na:
Revista Brasileira de Toxicologia

PIRETRÓIDES: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS - REVISÃO

Resumo

Desde os primórdios, substâncias naturais já eram usadas no combate a pragas na lavoura com o objetivo principal de reduzir perdas. Com a revolução industrial e o constante e rápido crescimento populacional, a demanda por produtos agrícolas aumentou drasticamente. Sendo assim, as técnicas agrícolas necessitaram acompanhar esse crescimento, o que veio a alavancar a indústria química que passou a investir no desenvolvimento e aprimoramento de agrotóxicos. Os agrotóxicos vêm sendo utilizados de maneira intensiva há aproximadamente meio século, e o Brasil, segundo estudo da consultoria alemã Kleffmann Group, é, atualmente, o maior mercado de agrotóxicos do mundo com a previsão, de que, em consumo, seja o primeiro colocado. Os piretróides pertencem à classe de inseticida mais utilizada no mundo e surgiram como alternativa àqueles de maior potencial tóxico aos mamíferos e ao meio ambiente. Hoje em dia, além de serem utilizados na lavoura, são usados como domissanitários e no combate de insetos vetores de doenças, proporcionando, assim, um maior risco à população aos efeitos adversos que essas substâncias podem causar. O presente capítulo visa referenciar sobre suas principais características físico-químicas, toxicocinética, toxicodinâmica, vantagens de uso e possíveis riscos à saúde que envolve a exposição dessas substâncias por indivíduos não alvos.

Palavras-chave: Inseticidas piretróides, deltametrina, LMR, IDA, toxicodinâmica, toxicocinética, “knock-down”.

PYRETHROIDS: TOXICOLOGICAL ASPECTS - REVIEW

Summary

Since old times, natural substances were already used in combating pests in crops with the primary goal of reducing losses. With the industrial revolution and the constant and rapid population growth, demand for agricultural products has increased dramatically. Therefore, the agricultural techniques needed to track this growth, which came to leverage the chemical industry, which started to invest in the development and improvement of agrochemicals. The pesticides are being used for half a century and Brazil, according to a study of German Kleffmann Consulting Group, is currently the largest market of agrochemicals in the world and it is estimated that in consumption, is the first place. Pyrethroids belong to class of insecticide used in the world and have emerged as an alternative to those with the greatest potential toxic to mammals and the environment. Nowadays, in addition to being used in farming, are used as sanitizing and in fighting insect vectors of diseases, thus a greater risk to the population to the adverse effects that these substances may cause. This chapter aims at referencing on its main physico-chemical properties, toxicokinetics, toxicodinâmica, usage advantages and possible health hazards which involves exposure of these substances by individuals not targets.

Keywords: Insecticides pyrethroids, deltamethrin, MRLS, IDA, toxicodinâmica, toxicokinetics, “knock-down”

Introdução

O uso dos agrotóxicos é tão antigo quanto a agricultura. Historiadores atribuem no tempo de Homero (1.000 a.C), porém foi no tempo de Plínio (23 -79 anos depois de Cristo) que foi registrada a primeira utilização. Até meio século atrás, a maior parte dos produtos utilizados para o controle de pragas era constituída de compostos inorgânicos e de extratos vegetais, com destaque para a nicotina e a rotenona. A indústria de agrotóxicos surgiu após a Primeira Guerra Mundial, quando as grandes corporações químicas internacionais criaram subsidiárias produtoras de agrotóxicos, visando aproveitar as moléculas químicas desenvolvidas para fins bélicos. Além disso, durante os combates que ocorriam em regiões tropicais e subtropicais, muitas doenças estavam em evidência, tais como a malária, a doença do sono e a dengue. Além do desenvolvimento de armas químicas, também foram realizadas muitas pesquisas para de encontrar novos inseticidas (1,2).

As primeiras unidades produtivas de agrotóxicos no Brasil datam de meados da década de 40. Contudo, a efetiva constituição do parque industrial brasileiro de agrotóxicos ocorreu na segunda metade dos anos 1970 (3). A instalação da indústria de agrotóxicos no Brasil relacionou-se à modernização da agricultura nacional, que difundiu a mecanização e a adoção intensiva de insumos químicos e biológicos – agrotóxicos, fertilizantes, sementes – na agricultura. Aliado a esses acontecimentos, o aumento da população mundial e a redução do contingente rural obrigou a mudanças nas técnicas agrícolas na tentativa de se produzir alimentos em quantidades suficientes para suprir as necessidades básicas da população humana. Atualmente, o Brasil é o primeiro em consumo de agrotóxicos no mundo (4).

Segundo a USEPA (*US Environmental Protection Agency*), 1999, os agrotóxicos podem ser classificados, segundo seus organismos alvos, em inseticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides), fungicidas, herbicidas, acaricidas, nematicidas, molusquicidas e fumigantes. Os agrotóxicos são definidos como substâncias, ou mistura de substâncias, capazes de prevenir, destruir, repelir ou atenuar pragas. Dos inseticidas mais utilizados atualmente no mundo temos os piretróides sintéticos derivados das piretrinas (5,6)

As piretrinas são ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. Por muito tempo, as piretrinas foram utilizadas como agrotóxicos. Sua ação atinge uma variedade grande de insetos e apresentam baixa toxicidade em mamíferos quando respeitadas as boas práticas agrícolas. Entretanto, as piretrinas apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia de uso. Na década de setenta, a estrutura química das piretrinas foi modificada com o intuito de se obter substâncias com maior estabilidade química, de forma que o potencial inseticida se mantivesse alto. Átomos de nitrogênio, enxofre e elementos halogênios foram introduzidos às piretrinas, o que conferiu maior estabilidade às moléculas. Tais modificações mantiveram baixa a toxicidade aguda em mamíferos sob as condições de uso adequado (7,8). Os agrotóxicos piretróides foram introduzidos no mercado em 1980 e em 1982 já representavam 30% dos inseticidas utilizados no mundo (3). Sendo assim, as piretrinas tiveram seu uso aumentado na forma de piretróides e, conseqüentemente, aumentou a contaminação do meio ambiente e a exposição de organismos não alvos (8,9).

A deltametrina, um tipo de piretróide do grupo II, considerado o grupo mais tóxico dos piretróides, é amplamente utilizada na agricultura e silvicultura devido a sua alta atividade contra um amplo espectro de insetos. A exposição de pessoas aos agrotóxicos pode ser atribuída ao contato direto, como no caso dos aplicadores rurais e manipuladores nas fases da produção, transporte ou armazenamento dos produtos. O contato indireto envolve populações sujeitas à exposição pelo consumo de alimentos oriundos da produção agropecuária, devido à aplicação de agrotóxicos para controle de vetores de pragas agrícolas e (ou) pecuárias (10).

Estudos realizados com trabalhadores e animais demonstraram relação entre a exposição aguda e crônica de agrotóxicos e seus efeitos adversos à saúde, com alterações metabólicas, neurológicas, cardíacas, reprodutivas, imunológicas e no sistema de defesa antioxidante (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorrem, a cada ano, de 30 mil a 40 mil mortes devido a intoxicações por agrotóxicos. Agrotóxicos ocupam o

quarto lugar no ranking de intoxicações no Brasil, atrás de medicamentos, acidentes com animais peçonhentos e produtos de limpeza (saneantes).

O Censo Agropecuário de 2006 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostra que houve, em 2006, pelo menos 25.008 casos de intoxicação de agricultores. A pesquisa mostra que mais de 1,5 milhão, das 5,2 milhões de propriedades rurais do país, utilizam agrotóxico, e que 56% destas não recebem orientação técnica. A aplicação manual dos venenos, por meio do pulverizador costal – que é o equipamento que apresenta maior potencial de exposição aos agrotóxicos – é a mais utilizada, presente em 70,7% dos estabelecimentos agrícolas que fazem uso de algum tipo de defensivo. O Censo aponta também que 20% (296 mil) destas propriedades não utilizam proteção individual. O Rio Grande do Sul, com 273 mil propriedades, é o Estado que aplica mais agrotóxico (18).

Foram notificados no Brasil, no ano de 2003, 8.464 casos de intoxicação por agrotóxicos, sendo 5.945 causados por produtos usados na agropecuária, e 2.519 casos causados por produtos de uso doméstico, respondendo por aproximadamente 10% de todos os casos de intoxicação registrados no país (19).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde (FIOCRUZ) e a Secretaria de Saúde do Paraná iniciaram em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (P.A.R.A.). Este programa visa o rastreamento de substâncias utilizadas fora do padrão legislativo proposto pela própria ANVISA (19). Os relatórios publicados advindos do P.A.R.A. são alarmantes e retratam o não cumprimento das Boas Práticas Agrícolas, tendo sido encontrados piretróides em diversas culturas agrícolas com valores acima do limite máximo de resíduo (LMR) previsto, bem como o uso desses agrotóxicos em culturas nas quais não é permitido. Além dessas irregularidades constatadas, têm sido verificadas irregularidades nas principais produtoras de agrotóxicos do Brasil. O resultado faz parte de um estudo realizado desde 2009 pela ANVISA com o apoio da Polícia Federal, que fazia operações nas companhias vistoriadas sem aviso prévio. De acordo com a diretoria da ANVISA foram constatados problemas desde as

formulações dos agrotóxicos, que estavam fora do padrão autorizado pelo governo, até o uso de produtos com prazo de fabricação vencido. Ao todo, nove milhões de litros de agrotóxicos foram interditados. Diante disso, em 2009, as empresas fiscalizadas foram autuadas administrativamente pela ANVISA. Em outra fiscalização realizada pela ANVISA, foram encontrados 2,5 milhões de litros de agrotóxicos adulterados nas fábricas de empresas em Londrina, PR e Taquari, RS (19,20).

Diante dos dados atuais, a exposição de organismos não-alvo (incluindo o ser humano) aos piretróides é evidente e se faz necessário intensificar as pesquisas a respeito dos aspectos toxicológicos desses agrotóxicos. Esses estudos alertam e reforçam a importância do cumprimento da legislação em vigor e das boas práticas agrícolas (BPA) no uso de agrotóxicos que é definida como sendo o emprego correto e eficaz dos mesmos, considerando-se os riscos à saúde envolvidos em sua aplicação, de modo que os resíduos sejam os menores possíveis e toxicologicamente aceitáveis.

Aspectos gerais dos agrotóxicos

Os agrotóxicos, segundo classifica a Lei dos Agrotóxicos, n 7.802 de 1989, em seu artigo 2º, são:

[...] os produtos e os 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 [...] substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (21).

A classificação dos agrotóxicos sob o aspecto funcional consiste em: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, reguladores e inibidores de crescimento. Dentre essas

classes, as três principais classes, por representarem, em média, 94,8% do consumo mundial de agrotóxicos entre 1960/2003, são os inseticidas, fungicidas e herbicidas (5, 6, 22).

Outra classificação dos agrotóxicos, chamada de classificação toxicológica, decorre da toxicidade dos produtos. Esta se relaciona ao poder letal do ingrediente ativo dos agrotóxicos sobre o ser humano. Assim sendo os produtos são separados em classes toxicológicas (23). O poder letal é representado pela Dose Letal 50 (DL₅₀), que refere à dose que provoca a morte de metade (50%) dos animais de experimentação em laboratório e é expressa em mg do princípio ativo por kg de peso corpóreo do animal submetido ao teste. Pode ser aplicada por via oral em uma única dose (oral aguda), ou por via dérmica, quando aplicada sobre a pele depilada de animais de laboratório, através de uma única exposição (dérmica aguda). As concentrações de DL₅₀ pela via oral e dérmica são utilizadas como critério para o estabelecimento da Classe Toxicológica do Princípio Ativo: Classe I – extremamente tóxico; Classe II – altamente tóxico; Classe III – moderadamente tóxico; Classe IV – pouco tóxico. A quantidade de classes, assim como os critérios para a classificação dos agrotóxicos, em cada classe são, normalmente determinados por regulamentação do poder público (24).

Piretrinas e Piretróides

As piretrinas são ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, os crisântemos. Existem seis compostos naturais que compõem as piretrinas, ou seja, piretrinas I e II, cinerins I e II, e jasmolins I e II e a partir deles, os piretróides são sintetizados. Por muito tempo, as piretrinas foram utilizadas como defensivos agrícolas, e na Pérsia foi muito usada para o controle de piolhos desde 400 a.C. Sua ação atinge uma variedade grande de insetos e apresentam baixa toxicidade em mamíferos quando respeitadas as boas práticas agrícolas. Entretanto, as piretrinas apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia de uso (25, 26, 27). Na figura 1 é mostrada a flor de onde são extraídas as piretrinas.



Figura 1. Flor de crisântemo

Na década de 70, a estrutura química das piretrinas foi modificada com o intuito de se obter substâncias de maior estabilidade de uma forma que o potencial inseticida se mantivesse alto.

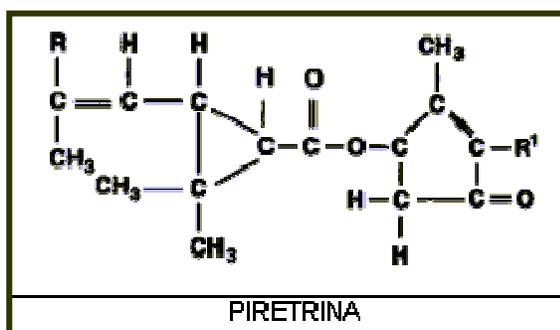


Figura 2. Fórmula química da piretrina

Átomos de nitrogênio, enxofre e elementos halogênios foram introduzidos às piretrinas, o que conferiu maior estabilidade às moléculas. Tais modificações mantiveram baixa a toxicidade aguda em mamíferos, sob as condições de uso adequado (8,28). Sendo assim, as piretrinas tiveram seu uso aumentado na forma de piretróides e, conseqüentemente, a exposição do meio ambiente e de organismos não alvos aumentou (7).

Características Físico-Químicas dos Piretróides

Atualmente, a classe dos piretróides inclui 42 ingredientes ativos, diferindo na estrutura química ou em relação à composição de estereoisômeros. Normalmente, os piretróides são usados como misturas de dois ou mais isômeros (29). A estrutura química e configuração estérica dos piretróides interferem

diretamente na sua atividade biológica. Os isômeros cis apresentam toxicidade mais elevada em relação aos trans e a porção não polar da molécula aumenta a toxicidade de ambos os isômeros (30, 31, 32).

A sensibilidade à luz varia muito. A lambda-cialotrina, esfenvalerato, deltametrina, permetrina e cipermetrina apresentam vida média entre 17 e 110 dias. Por outro lado, a bifentrina e a fenpropatrina mostraram menor sensibilidade à luz, com vida média de 400 e 600 dias, respectivamente. Os piretróides tendem a serem estáveis em pH ácido e neutro quando em solução aquosa, mas tornam-se altamente hidrolisáveis em valores de pH acima do neutro. A permetrina é estável a pH alto, apresentando vida média de 240 dias (33). Os piretróides são compostos de vários grupos estruturais, incluindo uma porção de ácido, uma ligação éster central e uma molécula de álcool. Além disso, alguns compostos quirais também contêm um carbono da molécula de álcool, o que permite três carbonos quirais e um total de oito estereoisômeros diferentes. De todos os piretróides existem, pelo menos, quatro formas estereoisoméricas, cada uma com diferentes atividades biológicas. Eles podem ser formulados como misturas racêmicas ou como isômeros individuais (por exemplo, deltametrina) e isômeros individuais diferentes podem ter nomes comuns que incluem (34):

- Isômeros da resmetrina: bioresmetrina, cisresmethrin;
- Isômeros da aletrina: d-aletrina, bioaletrina, esbiothrin, s- bioaletrina;
- Isômero do fenvalerato: esfenvalerato;
- Isômero da cialotrina: λ - cialotrina;
- Isômero da fenotrina: d-fenotrina.
- Isômero da cipermetrina: cipermetrina- α

A figura 3 mostra os diferentes átomos adicionados nos radicais R^1 , R^2 e R^3 caracterizando algumas das diferentes moléculas de piretróides.

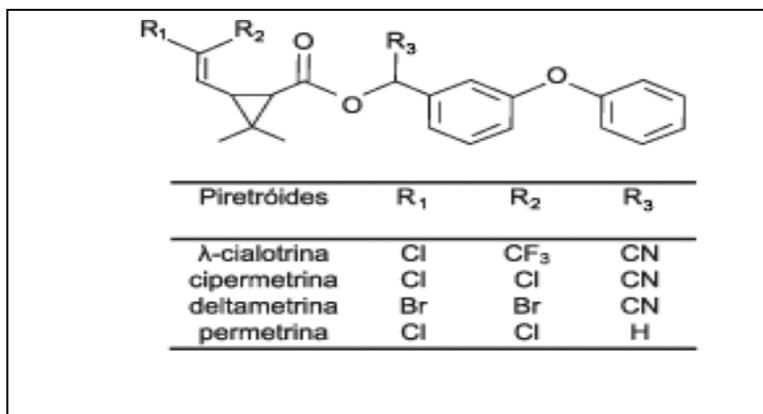


Figura 3. Estrutura química de piretróides sintéticos (35)

A deltametrina foi obtida do isolamento de apenas um isômero (o mais ativo, D-cis). Seu nome químico (IUPAC) é (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate e sua fórmula estrutural está representada na Figura 4. Seus isônimos são: RU-22974, NRDC-161, OMS-1998, Roussel DECIS (R), Roussel K-Othrin (R), Decametrina (36).

Principais características físico-químicas da deltametrina

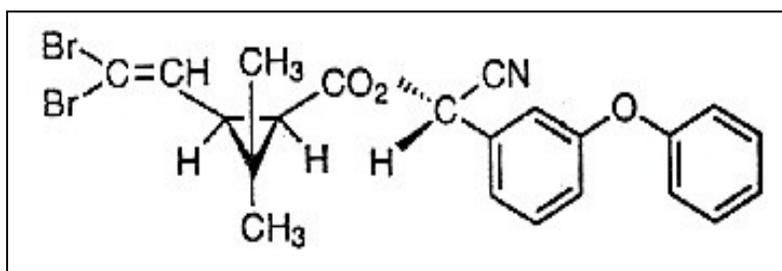


Figura 4. Fórmula estrutural da Deltametrina (36).

As principais características físicas e químicas da deltametrina estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físicas e químicas da deltametrina (37).

Características físico-químicas	Deltametrina
Massa molecular	505,24
Densidade	(20 °C) 0,5 g/cm ³
Pureza recomendada	98%
Apresentação	Pó branco sem odor
Ponto de fusão	98-101°C
Ponto de ebulição	300°C
Solubilidade	< 0,002mg/Kg em água a 20°C Em acetona: 500g/L
Estável em	Sol. ácida e neutra

As formulações disponíveis são: emulsionável; concentrado (10g/l-25g/l), ultra baixo volume (1g/l-10g/l), wettable powders (2.5%-5%), (1g/l-10g/l), pó (2,5%-5%) (38).

Utilização dos piretróides

Os inseticidas piretróides são uma classe de compostos sintéticos amplamente utilizados no mundo, tanto em áreas agrícolas quanto no controle de insetos domésticos. Eles são utilizados em saúde pública, tendo garantido sua eficácia e segurança pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para diferentes aplicações no controle de vetores, como em aeronaves, por exemplo. Isso se deve à sua relativa segurança para os seres humanos. Trata-se de inseticidas de alta potência sob baixas dosagens, sendo a deltametrina, por exemplo, o mais eficaz inseticida utilizado no combate a leishmaniose (39).

Piretróides são amplamente utilizados contra uma ampla gama de ectoparasitas em pequenos e grandes animais, com vários deles utilizados em diferentes formulações, incluindo “spot-on”, “spray”, xampus e aerossóis. Os principais piretróides utilizados em medicina veterinária em cães, gatos e animais de corte são piretrinas, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, flumetrina e permetrina (40; 41; 42).

Na agricultura, os piretróides mais utilizados são a deltametrina, permetrina e cipermetrina (27). A deltametrina foi recomendada para aplicações foliares em vários vegetais e culturas (43). No entanto, ela pode se acumular em níveis 10 vezes acima da concentração inicial, se aplicado repetidamente sobre a folha de plantas em uma única temporada, em taxas mais elevadas do que a taxa a que é degradada (44). É também amplamente utilizada na silvicultura devido a sua alta atividade contra um amplo espectro de insetos e pragas (10).

Aspectos toxicológicos dos piretróides

Limite Máximo de Resíduos e Ingestão diária aceitável

Entende-se como resíduo de agrotóxico, a substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimentos decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, considerados tóxicos e ambientalmente importantes. O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é um conceito de caráter toxicológico estabelecido na legislação, definido como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico, legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes do agrotóxico por um milhão de partes de alimento (em peso) – ppm ou mg/kg.

São estabelecidos LMRs para cada cultura alimentar, cujo registro é requerido junto aos órgãos oficiais: Ministérios da Agricultura, Saúde e Meio Ambiente. Os valores de LMR são publicados nas monografias da ANVISA (24). Assim, princípios ativos para os quais não foram requeridos registros para culturas específicas não possuem LMR definidos no país.

O LMR estabelecido para os cultivares é determinado a partir de cálculos provenientes da ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima que ingerida diariamente durante toda vida, e que parece não oferecer risco apreciável à saúde, baseado em pesquisas atuais. É expressa em mg do agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg/kg p.c.). A IDA permite avaliar o risco da ingestão de resíduos de agrotóxicos em alimentos. é determinada para cada ingrediente ativo

de agrotóxico e estabelecida com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos agrotóxicos, advindas dos estudos conduzidos em animais de laboratórios e realizados com procedimentos reconhecidos em nível internacional (24; 45).

Nas Tabelas 2 e 3, respectivamente, são apresentados valores de LMR e intervalos de segurança para a deltametrina em vários cultivares, e de IDA para piretróides de uso permitido no Brasil.

Tabela 2: Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMR) e intervalos de segurança da deltametrina para vários cultivares (24).

Culturas	Deltametrina Modalidade de emprego	LMR (mg/Kg)	Intervalo de segurança (dias)	Culturas	Deltametrina Modalidade de emprego	LMR (mg/Kg)	Intervalo de segurança (dias)
Abacaxi	Foliar	0,01	14	Feijão	Foliar	0,2	16
Alho	Foliar	0,03	5	Feijão-vagem	Foliar	0,01	1
Ameixa	Foliar	0,02	2	Figo	Foliar	0,01	14
Arroz	Foliar	1,0	37	Maça	Foliar	0,02	11
Arroz	Produtos armazenados	1,0	15	Melancia	Foliar	0,01	2
Batata	Foliar	0,01	1	Melão	Foliar	0,01	1
Berinjela	Foliar	0,03	3	Milho	Foliar	1,0	1
Brócolis	Foliar	0,05	3	Tomate	Foliar	0,3	3
Cacau	Produtos armazenados	0,2	15	Trigo	Produtos armazenados	1,0	30
Café	Foliar	1,0	15	Pepino	Foliar	0,03	2
Café	Produtos armazenados	1,0	7	Pêssego	Foliar	0,04	5
Caju	Foliar	0,01	2	Pimentão	Foliar	0,01	2
Cebola	Foliar	0,03	15	Repolho	Foliar	0,01	2
Citros	Foliar	0,1	2	Soja	Foliar	0,5	14
Couve	Foliar	0,1	2	Soja	Produtos armazenados	0,5	30
Couve-flor	Foliar	0,03	3	Sorgo	Foliar	0,05	6

Tabela 3: Valores de ingestão diária aceitável (IDA) para piretróides de uso permitido no Brasil (24, 56).

Piretróide	Valores de IDA (mg kg⁻¹ pc)
Deltametrina	0-0,01
Permetrina	0-0,05
Cipermetrina	0-0,05
Lambda-cialotrina	0-0,05
Fenpropatrina	0-0,03
Bifentrina	0-0,02
Betacipermetrina	0-0,01

Vias de Exposição e Toxicocinética dos Piretróides

A deltametrina é considerada o piretróide mais tóxico para vertebrados e seu efeito no organismo depende da dosagem, da rota e do veículo de administração (46). Pela classificação toxicológica, definida pela ANVISA (24), a deltametrina é classificada como extremamente tóxica da classe I, e pela classificação ambiental definida pelo IBAMA (47), é considerada como de médio risco, classe II.

A absorção dos piretróides pelo trato respiratório, através da inalação de pó ou spray, é bastante rápida. Os piretróides são fracamente absorvidos pela pele intacta e apresentam absorção mais rápida em solvente polar. A absorção de piretróides pela via dérmica, em seres humanos pode-se dizer que é fraca, atingindo um máximo de 2% (48). Estudos em animais demonstram que o metabolismo intradérmico de piretróides também limita a absorção sistêmica após exposição cutânea (49). Todavia, alterações bioquímicas e histopatológicas foram verificadas em várias regiões do cérebro de ratas, após a exposição dérmica a uma mistura de clorpirifós (organofosforado) e cipermetrina, o que indica a absorção desses inseticidas pela pele (50).

A principal via de exposição a inseticidas piretróides é através dos alimentos (51). Os piretróides são rapidamente e extensivamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral. Cerca de 10 a 70% de uma dose de permetrina, deltametrina e λ -cialotrina, ingerida por via oral, é absorvida com base na estimativa da substância ativa e seus metabolitos no plasma (52, 53). Segundo estudo realizado por Ray et al (54), a absorção gástrica de piretróides é de 36%, enquanto a absorção dérmica é de 1%.

Quando administrada através de um veículo não aquoso, a toxicidade oral aguda da deltametrina varia de alta a moderada com valores de DL50 de 19-34 mg.kg⁻¹.p.c. em camundongos e 31-139 mg.kg⁻¹.p.c. em ratos. Entretanto, em água a deltametrina é muito menos tóxica, apresentando valores de DL50 que excedem 5000 mg.kg⁻¹.p.c. em ratos. Uma vez absorvidos, os piretróides são rapidamente distribuídos devido à sua alta lipofilicidade (31). Isso foi comprovado pelo estudo do balanço e retenção de cipermetrina nos tecidos de ratos, através da utilização de marcadores. O trabalho foi desenvolvido após a administração oral de cipermetrina, em doses que variaram de 1 a 5 mg.kg⁻¹ pc. Um dia após a administração das doses, foi verificada radioatividade residual, em ordem decrescente, no tecido adiposo, fígado, rim, sangue, músculo e cérebro, variando de 1-2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no tecido adiposo a 0,005-0,024 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no cérebro. Os níveis de resíduos diminuíram rapidamente em todos os tecidos, com exceção do tecido adiposo (8). Na ingestão da dose única, a maioria dos piretróides é rapidamente excretada pela urina e fezes. Nos mamíferos, geralmente, mais de 90% da dose é excretada no período de uma semana após exposição (31). Estudo realizado em ratos demonstrou que a cipermetrina é rápida e principalmente eliminada pela urina, com exceção de uma pequena porção do isômero cis que, após atingir o tecido adiposo, foi eliminado com uma meia vida de 12 dias (8). Segundo os autores, a rápida eliminação do inseticida pelos ratos é devida, primeiramente, à clivagem eficiente da ligação éster, proporcionando aumento dos metabólitos polares, os quais serão oxidados e conjugados antes da excreção. Na administração oral de doses diárias, os piretróides atingem níveis estáveis nos tecidos internos em poucos dias. Esses níveis persistem durante todo o período de dosagem e decrescem quando a exposição cessa (31). Em ratos, após

administração de uma dose única oral a deltametrina foi rapidamente distribuída no tecido nervoso em menos de 2 h (52, 53).

Estudo realizado em homens estabeleceu uma comparação entre a recuperação de metabólitos urinários e a via de administração da cipermetrina. Os resultados mostraram que a via oral de administração proporcionou uma absorção maior que a dérmica, com valores médios de 36% e 1,2% respectivamente. Foi possível verificar que, aproximadamente, 72% dos metabólitos eliminados pela urina foram excretados em 72 horas após a administração oral da cipermetrina, enquanto que o pico de excreção foi atingido entre 12 e 36 horas após a exposição dérmica (54).

Os compostos trans apresentam baixa toxicidade em mamíferos devido à rápida hidrólise por esterases hepáticas. O estudo da retenção tecidual de cipermetrina realizado por Crawford et al (8), demonstrou que os resíduos derivados dos isômeros cis foram encontrados no tecido adiposo em níveis mais elevados do que aqueles derivados dos isômeros trans. Segundo os autores, é possível que a hidrólise da ligação éster ocorra no tecido adiposo, catalisada por uma lipase, e esta hidrólise pode ter ocorrido mais rapidamente com o isômero trans.

Em resumo, os piretróides são rapidamente biotransformados rapidamente no fígado de mamíferos adultos, principalmente os compostos trans. A reação inicial de detoxificação é a hidrólise da ligação éster, seguida por reações de hidroxilação através do sistema enzimático Citocromo P450 e reações de conjugação. A biotransformação resulta na formação de compostos mais polares, o que facilita sua excreção pela urina (8, 31) (Figura 5).

A exposição aos piretróides ocorre simultaneamente com outros agentes químicos ambientais ou farmacêuticos. Assim, é necessário considerar a possibilidade dos piretróides compartilharem efeitos tóxicos e mecanismos com outras substâncias quimicamente e funcionalmente não relacionadas.

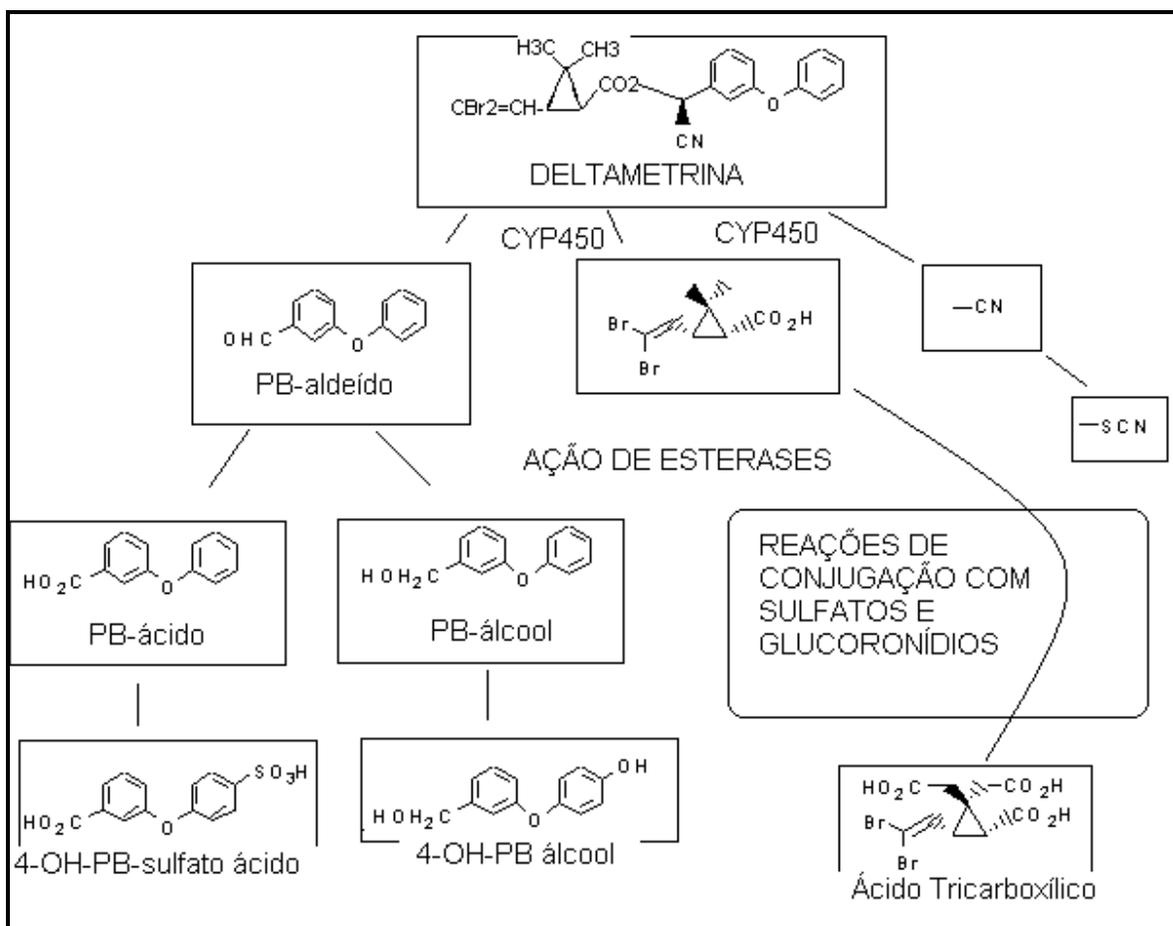


Figura 5. Principais vias de biotransformação da deltametrina em mamíferos (48).

Aspectos de Resíduos

A avaliação da exposição aguda a resíduos de agrotóxicos já faz parte do processo de registro de vários governos e, no âmbito internacional, foi iniciada em 1999 pela FAO/OMS. O estudo de avaliação do risco agudo avalia os riscos da ingestão do agrotóxico através do consumo de uma única porção do alimento. Recentemente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) restringiu o uso de paration metílico, baseada no estudo de avaliação de risco agudo, apesar de o estudo de risco crônico não identificar problemas de exposição (57).

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (P.A.R.A) (20) instalado em 2001 “[...] tem por objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos in natura que chegam à mesa do consumidor, com vistas a verificar se os limites máximos

estabelecidos pela legislação estão sendo observados”. Em 2008, o Programa monitorou 17 culturas: abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate e uva. A escolha destas culturas baseou-se nos dados de consumo obtidos pelo IBGE e na disponibilidade destes alimentos no comércio das diferentes Unidades da Federação. Foram encontrados piretróides em culturas onde seu uso não é autorizado, tais como as culturas de abacaxi, alface, morango, pimentão, tomate e uva, e resíduos acima do limite permitido nas culturas de pimentão, tomate e uva (19, 20).

Segundo dados da Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas (ANDEF), do total de vendas de agrotóxicos no Brasil em 2007, aproximadamente 28%, foram de inseticidas, o dobro de 2003. As vendas são em maior abrangência de uso, para as culturas de soja e milho. A garantia de alimento livre de contaminantes é essencial para a prevenção de doenças e manutenção da saúde, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde parte da população enfrenta problemas de carência nutricional e de acesso ao sistema público de saúde (58).

Os estudos a respeito da principal via de exposição do ser humano aos inseticidas piretróides, aliados aos dados que mostram que as boas práticas agrícolas podem não estar sendo respeitadas, coloca o poder público em alerta para tentar garantir a segurança alimentar da população.

Toxicodinâmica dos Piretróides

A partir de estudos em ratos, Verschoyle e Aldridge (34) classificaram os piretróides em dois tipos: Tipo I e Tipo II, designando respectivamente os sinais e sintomas da intoxicação produzidos pelos mesmos, de síndrome T e CS. Essa divisão refere-se a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil. Os piretróides do tipo I parecem agir principalmente nos nervos periféricos causando a Síndrome do Envenenamento tipo I ou “Síndrome T”. Esta se caracteriza por induzir, em ratos, tremores generalizados por todo corpo, comportamento agressivo, aumento da sensibilidade aos estímulos externos, hiperexcitabilidade, ataxia e convulsões. Em mamíferos não roedores

causa paralisia progressiva. Os piretróides tipo II agem preferencialmente no sistema nervoso central induzindo a Síndrome da Coreoatetose tipo II ou “Síndrome CS” cujos sintomas de intoxicação são hipersensibilidade, salivação abundante, agitação das mãos ou patas anteriores, movimentos de escavar e tremores periódicos, podendo evoluir para coreoatetose e, em alguns casos, a movimentos clônicos repetitivos. Algumas fórmulas contêm piretróides do tipo I e II e assim, os efeitos tóxicos parecem ser uma combinação conhecida como síndrome TS, que consiste em tremores e salivação (54).

Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na⁺ para o interior da célula, efeito semelhante ao observado nas intoxicações por DDT. Os mamíferos possuem vários canais de sódio de formato semelhante que variam em suas propriedades biofísicas e farmacológicas, incluindo a sensibilidade aos diferentes piretróides (28, 59, 60).

Em concentrações relativamente altas, os piretróides do tipo II agem sobre o complexo receptor inotrópico do ácido g-aminobutírico (GABA), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA bloqueando os canais de cloro e sua ativação. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados e a ausência de inibição sináptica causa uma hiperexcitabilidade do SNC (13,61). Em condições normais, o neurotransmissor GABA se liga ao receptor GABA estimulando a abertura dos canais de Cl⁻, permitindo o influxo de cargas negativas (íons Cl⁻) para o interior do citoplasma, tornando o potencial de membrana neural mais negativo. Em seguida, verifica-se um efeito repressor dos disparos dos impulsos nervosos e do influxo contínuo de Cl⁻ para o interior da célula (28).

Além dos efeitos neurológicos, frequentemente são detectadas manifestações cardiovasculares após a exposição dos indivíduos a estes compostos (62). Algumas das mais frequentes manifestações cardiovasculares ocorridas por intoxicações de inseticidas piretróides, organoclorados e organofosforados, são as variações eletrocardiográficas, tais como o prolongamento do intervalo Q-T e arritmias cardíacas do tipo Torsade de Pointes

(TdP). Estes efeitos podem ser explicados pelo aumento da duração do potencial de ação induzido pelos inseticidas (28).

Os canais de sódio cardíaco são proteínas responsáveis pelo rápido curso ascendente do potencial de ação e rápida propagação do impulso nervoso através do tecido cardíaco. Assim, sua função é central na origem de arritmias cardíacas (63). Entretanto, apesar da importância dos canais de sódio cardíaco, pesquisas que relacionem interações dos canais de sódio com piretróides ainda são escassas (28,60). Um estudo realizado com miócitos ventriculares de gatos concluiu que a deltametrina aumentou a duração do potencial de ação e produziu mudanças cinéticas no canal de sódio cardíaco, semelhantes às induzidas por piretróides no canal de sódio da membrana nervosa (28).

Alterações histopatológicas também têm sido atribuídas às intoxicações por piretróides. Latuszynska et al (50), verificaram alterações histopatológicas no cérebro de ratas após três semanas da aplicação dérmica de cipermetrina e clorpirifós. Observou-se um aumento da densidade do citoplasma das células do córtex cerebral, das células de Purkinje do cerebelo. Os autores verificaram que as alterações histológicas persistiram por mais de três semanas após o final do período experimental.

A deltametrina foi sintetizada por Elliot et al (25, 26), como o primeiro piretróide contendo a porção alfa-ciano-3-fenoxibenzil. Foram descritos (34) os sinais de intoxicação por deltametrina que são observados após ingestão ou administração intravenosa. Entre estes se destacam a salivação excessiva, seguida de movimentos abruptos das patas e movimentos convulsivos progressivos, chamados de coreoatetose.

Para a avaliação mutagênica da deltametrina em ratos, Shukla & Taneja (64) utilizaram o teste de dominância letal, importante medida de genotoxicidade. Os resultados sugeriram que a deltametrina apresentou baixo ou nenhum potencial genotóxico em células germinativas dos animais experimentais. Em outros estudos, a deltametrina também apresentou resultados negativos em *Salmonella typhimurium*, células V (fibroblastos utilizados em estudos de toxicidade) de hamster chinês, células de medula óssea de camundongos e no ensaio letal dominante ligado ao sexo em camundongos. No entanto, em outro

experimento realizado em ratos, a deltametrina induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos. O potencial mutagênico de cada piretróide depende de sua estrutura molecular, de intensidade de exposição e de velocidade de degradação. Como possuem meia-vida curta no ambiente, não bioacumulam e tem pouca mobilidade, esses inseticidas apresentam baixo potencial genotóxico (66). Alguns agrotóxicos podem causar câncer e a literatura científica também apresenta trabalhos sobre a mutagenicidade dessas substâncias. Os riscos da ocorrência desses efeitos adversos dependem da estrutura molecular do composto, da dose e da intensidade de exposição. Poucos relatos são encontrados na literatura para que se possa chegar a alguma conclusão sobre a ação carcinogênica dos piretróides. Shukla et al (65) verificaram que a deltametrina não demonstrou ser um promotor, mas um iniciador de neoplasmas em camundongos. Entretanto os autores advertem a ausência de estudos sobre a promoção carcinogênica. O fenvalerato, por exemplo, apresentou carcinogenicidade em ratos (67).

Efeitos no sistema reprodutivo (teratogenicidade) foram verificados em ratas prenhes tratadas com diferentes doses (1; 2,5 e 5 mg kg⁻¹p.c.) de deltametrina. Foi observada uma maior incidência de mortes embrionárias precoces nos animais tratados com o inseticida, em relação ao grupo controle. A deltametrina causou nos fetos retardamento no crescimento, hipoplasia dos pulmões, dilatação da pelve renal, além de aumento no peso da placenta. Alguns autores têm indicado que os produtos da hidrólise de permetrina são mais citotóxicos do que o composto original, e que apresentam potencial como agentes de desregulação endócrina (68, 69, 70).

A suscetibilidade de um organismo a agentes químicos pode variar segundo a idade. As crianças são particularmente vulneráveis à exposição aos agentes químicos presentes no ambiente, devido a suas características fisiológicas – demandam mais água e alimentos do que os adultos. Estudos demonstraram que ratos recém-nascidos são sensíveis aos piretróides, e esta sensibilidade é maior quanto menor for à idade do animal (7,71). Os casos mais severos de envenenamento por piretróides foram relatados em crianças, sugerindo a ocorrência de uma ineficiente hidrólise dos ésteres piretrum nesses indivíduos

(72). O fígado e os rins, principais órgãos de biotransformação e excreção de substâncias tóxicas, são os alvos mais frequentemente afetados pelos inseticidas piretróides (73).

Considerações Finais

Os agrotóxicos piretróides sintéticos são muito utilizados na agricultura mundial e em saúde animal, também sendo importante sua utilização em saúde pública e na saúde humana. Atualmente existe um evidente risco aumentado à saúde humana, em função da exposição a estes compostos, seja direta, ou indiretamente devido ao não cumprimento da legislação regulatória. Dentre as diversas formas de exposição, a principal é a exposição pela via oral.

Tendo em vista os fatos científicos a respeito dos piretróides, faz-se necessário realizar mais pesquisas sobre esse grupo de agrotóxicos para garantir sua segurança de uso, bem como intensificar a fiscalização, visando o cumprimento da legislação em vigor.

Referências Bibliográficas

1. LARA, W. H.; BATISTA, G. C., **Pesticidas**. Química Nova, v.15, p.161-166, 1992.
2. LARINI, L. **Toxicologia dos agrotóxicos**. São Paulo: Manole, 1999.
3. AGROANALYSIS. **O defensivo agrícola**. Agronalysis, v.4, n.10, p.7-30, 1980.
4. SINDAGE- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola, disponível no site <http://www.sindag.com.br/index.php>. Acessado em março de 2011.
5. USEPA, United States Environmental Protection Agency. Agricultural Chemical Industry. Disponível no site <http://www.epa.gov/compliance/resources/publications/assistance/sectors/notebooks/agchempt1.pdf>. Acessado em abril de 2009.
6. SUCEN- Superintendência no Controle de Endemias, disponível no site <http://www.sucen.sp.gov.br/busca.html>. Acessado em dezembro de 2010.

7. CANTALAMESSA, F. **Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats.** Arch Toxicol, v.67, p.510-513, 1993.
8. CRAWFORD, M. J.; CROUCHER, A; HUTSON, D. H. **Metabolism of cis- and trans- cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study.** J Agric Food Chem, v.29, n.1, p.130-135, 1981.
9. ANGIONI, A.; DEDOLA, F.; MINELLI, E. V.; BARRA, A.; CABRAS, P.; CABONI, P. **Residues and half-life times of pyrethrins on peaches after field treatments.** J Agric Food Chem, v.53, n.10, p.4059-4063, 2005.
10. VILLARINI, M; MORETTI, G; SCASSELLATI-SFORZOLINI, S; MONARCA, R; PASQUINI, M. G; LEONARDIS, C. C. **Studies on hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes in rats treated with insecticide deltamethrin.** J of Env Pathology Toxic and Oncol, p. 45–52, 1995.
11. SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. **Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus*.** Bloch Ecotoxicology and Env Safety, v.56, p.295-301, 2003.
12. TUZMEN, N.; CANDAN, N.; KAYA, E.; DEMIRYAS, N. **Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver.** Cell Biochem Funct, v.26, p.119–124, 2008.
13. MANNA, S; BHATTACHARYYA, D; MANDAL, T. K.; DAS, S. **Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats.** Indian J Pharmacol, v.37, p.161–164, 2005.
14. REHMAN, H; ALI, M; ATIF, F; KAUR, M; BHATIA, K; RAISUDDIN, S. **The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice.** Clin Chim Acta, v. 369, p.61–65, 2006.
15. DALSENTER, P. R.; DE ARAÚJO, S. L; DE ASSIS, H. C; DA SILVA, A.; ANDERSON, J. M.; DALLEGRAVE, E. **Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation.** Hum Exp Toxicol, v.16, n. 3, p.146-153, 1997.

16. SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. **An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonist.** J Steroid Biochem Mol Biol, v.65, n.1, p.143-150, 1998.
17. KOIFMAN, S; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. **Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil.** Cad Saúde Pública, v.18, p. 435-445, 2002.
18. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível no site <http://www.ibge.gov.br/lojavirtual/categoria.php?tit=3>. Acessado em abril de 2011.
19. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e toxicologia: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível no site <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em junho de 2008.
20. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e toxicologia: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível no site <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em maio de 2009.
21. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA- CASA CIVIL. Disponível no site <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=316>. Acessado em outubro de 2008.
22. VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. **O setor de agroquímicos.** BNDES Setorial. Rio de Janeiro, n.24, p.69-96, 2006.
23. ZAMBRONE, F. A. D.; NOLA, D.; SCHWEIG, R. **Perigosa família. Coletânea para educação ecológica** – II Congresso Estadual de Educação Ecológica, Ibirubá, 1986.
24. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e toxicologia: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível no site <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em setembro de 2008.
25. ELLIOTT, M.; JANES, N. F. **Synthetic pyrethroids -a new class of insecticides.** Chem Soc Revs, v.7, p.473, 1978.
26. ELLIOTT, M., JANES, N. F., AND POTTER, C. **The future of pyrethroids in insect control.** Ann Rev Entomol, v.23, p.443, 1978.

27. CHEN, Z.; WANG, Y. **Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples.** J Chromatogr A, v.754, p.367-395, 1996.
28. DE LA CERDA, E.; NAVARRO-POLANCO, R. A; SÁNCHEZ-CHAPULA, J. A. **Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin.** Arch Med Res, v.33, p.448-454, 2002.
29. DEJONCKHEERE, W.; STEURBAUT, W.; DRIEGHE, S.; VERSTRAETEN, R.; BRAECKMAN, H. **Permethrin and deltamethrin residues on lettuce.** Pestic Sci, v.13, p.351-356, 1982.
30. KANEKO, H.; OHAKAWA, H.; MIYAMOTO, J. **Absorption and metabolism of dermally applied phenothrin in rats.** J Pestic Sci, v.00, p.169-182, 1981.
31. SODERLUND, D. M., CLARK, J. M., SHEETS, L. P., MULLIN, L. S., PICCIRILLO, V. J., SARGENT, D., STEVENS, J. T., AND WEINER, M. L. **Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment.** Toxicology, v.171, p.3-59, 2002.
32. VALENTINE, W. M. **Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides.** Vet Clin North Am Small Anim Pract., v.20, n.2, p.375-382, 1990.
33. EUSES-European Union System for the Evaluation of substances. Disponível no site <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/Euses/>. Acessado em novembro de 2010, artigo publicado em 2004.
34. VERSCHOYLE, R. D; ALDRIDGE, W. N. **Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats.** Arch Toxicol, v.45, p.325-329, 1980.
35. CASIDA, J. E. **Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins.** In: **Pyrethrum: The natural insecticide.** Academic Press New York, p.329, 1973.
36. TOMLIN, C. **World compendium the pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook.** Royal Society of chemistry, p.1341, 1995.
37. WHO- World Health Organization - Department of Food Safety World Health Organization (WHO). Preventing chronic disease: a vital investment: WHO

- global report. Geneva: World Health Organization, 2005. Disponível no site <http://www.who.int/fsf/>. Acessado em outubro de 2009.
38. LASKOWSKI, D. A. **Physical and chemical properties of pyrethroids**. Rev Environ Contam Toxicol, v.174, p.49-170, 2002.
39. MINISTÉRIO DA SAÚDE- Secretaria de Vigilância em Saúde-Núcleo de Comunicação. Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Disponível no site http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/03_1193_M.df. Acessado em novembro de 2008.
40. GUZMÁN, G.; ALONSO, A.; POULIQUEN Y. & SEVILLA, E. **Las metodologías participativas de investigación: un aporte al desarrollo local endógeno**. Agricultura Ecología y Desarrollo Rural. II Congreso de la sociedad española de agricultura ecológica. Pamplona, 1996.
41. POULIQUEN, H. **Toxicologie du chien et du chat Intoxicação par les pyrétrinoïds**. Vétérinaire Le Point, v.235, p.38-41, 2003.
42. EMEA, Comité dos Medicamentos Veterinários. Deltametrina. Relatório Síntese. Disponível no site http://www.emea.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000136/WC500064060.pdf. Acessado em setembro de 2008.
43. OMS- Organização Mundial da Saúde. Disponível no site www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/.../deltamet.pdf. Acessado em setembro de 2008.
44. MUELLER-BEILSCHMIDT, D. **Toxicology and environmental fate of synthetic pyrethroids**. J Pesticide Reform, v.10, p.32-37, 1990.
45. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Nota considerações sobre o tema LMRs de agrotóxicos no MERCOSUL. Disponível no site http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/atas/coord_nacionais/AnexoX. Acessado em agosto de 2009.

46. PHAM, H. C.; NAVARRO-DELMASURE, C.; PHAM, H. C.; CLAVEL, P.; VAN HAVERBEKE, G.; CHEAV, S. L. **Toxicological studies of deltamethrin.** Int J Tissue React, v.6, p.127-33, 1984.
47. IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Disponível no site <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/190200.htm>. Acessado em setembro de 2009.
48. WOLLEN, B. H.; MARSH, J. R.; LAIRD, W. J. D.; LESSER, J. E. **The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration.** Xenobiotica, v.22, n.88, p.983-991, 1992.
49. BAST, G. E.; TAESCHNER, D.; KAMPFMEYER, H. G. **Permethrin absorption not detected in single-pass perfused rabbit ear, and absorption with oxidation of alcohol 3-phenoxybenzyl.** Arch Toxicol, p.179-186, 1997.
50. LATUSZYNSKA, J. et al. **Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes.** Ann Agric Environ Med, v.10, p.197-201, 2003.
51. HEUDORF, U., ANGERER, J. **Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany.** Environ Health Perspect., v.109, n.3, p.213-217, 2001.
52. ANADON, A. **Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats.** Toxicol Lett., v.165, n.1, p.47-56, 2006.
53. ANADÓN, M. R; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. A; MARTÍNEZ, M. **Perspectivas sobre a toxicidade de piretróides.** J Farm e Terap Veterin, v.29, p.315-317, 2006.
54. RAY, D. E. **ECG investigation of decamethrin-induced choreoathetosis in the rat.** Exptl Brain Res, v.38, p.221-7,1980.
55. WOOLLEN, B. H. et al. **The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration.** Xenobiotica, v.22, n.88, p.983-991, 1992.

56. CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide residues in food: maximum residue limits**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization, v.2B, 2000.
57. EPA- United States Environmental Protection Agency. FQPA safety factor recommendations for the organophosphates. Disponível em URL: <http://www.epa.gov>. Acessado em outubro de 2009.
58. CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. **Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira**. R Saúde Pública, v.34, n.5, p. 529-537, 2000.
59. NARAHASHI, T. **Neuronal ion channel as the target sites of insecticides**. Pharmacol Toxicol, v.79, n.1, p.1-14, 1996.
60. SPENCER, C. L. et al. **Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts**. J Pharmacol Exp Ther, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.
61. BLOOMQUIST, J. R. **Insecticides: Chemistries and Characteristics**. Disponível no site <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acessado em novembro de 2009.
62. LUDOMIRSKY, A. et al. **Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning**. Am J Cardiol, v.49, p.1654-1658, 1982.
63. BALSER, J. R. **Structure and function of the cardiac sodium channels**. Cardiovasc Res, v.42, p.327-338, 1999.
64. SHUKLA, Y.; TANEJA, P. **Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay**. Mutat Res, v.467, n.2, p.119-127, 2000.
65. SHUKLA, Y.; ARORA, A; SINGH, A. **Tumorigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice**. Toxicology, v.163, n.1, p.1-9. 2001;
66. GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos – Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora Universidade de Brasília, p.392, 2005.
67. PARKER, C. M.; WIMBERLY, H. C.; LAM, A. S.; GARDINER, T. H.; VAN GELDER, G. A. **Subchronic feeding study of decarboxy fernvalerate in rats**. J Toxicol Environ Health, v.18, p.77-90, 1986.

68. STRATTON, G. W.; CORKE, C. T. **Comparative fungitoxicity of the insecticide permethrine and ten degradation products.** Pestic Sci, v.13, p.679-685, 1982.
69. TYLER, C. R; BERESFORD, N. ; VAN DER WONING, M.; SUMPTER, J. P.; THORPE, K. **Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities.** Environ Toxicol Chem, v.19, p.801-809, 2000.
70. MCCARTHY, A. R.; THOMSON, B. M.; SHAW, I. C.; ABELL, A. D. **Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites.** J Environ Monit, v.8, p.197–202, 2006.
71. SHEETS, L. P.et al. **Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin.** Toxicol Appl Pharmacol, v.126, p.186-190, 1994.
72. HAYES, W. J. **Pesticides derived from plants and other organisms. Pesticides studied in man,** p.75-111, 1982.
73. LU, F. C. **A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO.** Regul Toxicol Pharmacol, v.21, n.3, p.352-364, 1995.

CAPÍTULO II

EFEITOS DA DELTAMETRINA NA EXCITAÇÃO E CONDUÇÃO CARDÍACA E NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR

EFEITOS DA DELTAMETRINA NA EXCITAÇÃO E CONDUÇÃO CARDÍACA E NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR

Resumo

A deltametrina, um inseticida piretróide sintético, é muito utilizada na agricultura mundial e na saúde animal, sendo também importante sua utilização em saúde pública e na saúde humana. Diante da vasta exposição a que os seres humanos e organismos não-alvo podem estar submetidos, estudos sobre toxicidade deste inseticida em mamíferos se faz necessário. Assim, os objetivos do presente trabalho foram os de avaliar a excitação e condução cardíaca e a ocorrência de estresse oxidativo em ratos Wistar adultos machos, submetidos à administração oral aguda do inseticida deltametrina. Para tal, foram utilizados 50 ratos Wistar machos com 60 dias de vida, pesando em média $200 \pm 10\text{g}$, os quais foram distribuídos em 4 grupos experimentais, sendo um grupo controle e os outros 3 com diferentes dosagens (10%DL50, 25%DL50 e 100% DL50) de deltametrina. Foi utilizado o exame de ECG, que é uma forma de diagnóstico rápido, simples, e que apresenta resultados que podem expressar com fidelidade as alterações elétricas do coração. Verificou-se uma redução significativa da frequência cardíaca, sugerindo ação tóxica da deltametrina no nodo sinusal. A associação da redução da FC ao prolongamento do intervalo RR e a maior duração do complexo QRS sugere provável prejuízo da condução elétrica ventricular induzida pelo piretróide. Ainda, a redução significativa da amplitude R ratifica a alteração no processo de despolarização ventricular, como sugerido anteriormente. A amplitude P não se mostrou alterada sugerindo que não ocorreram alterações na excitação e condução elétrica atrial. Ocorreu um aumento progressivo do infradesnívelamento do segmento ST, entretanto, como a onda T mostrou-se positiva e sem alterações significativas na sua amplitude, em todos os grupos estudados, não podemos sugerir a possibilidade de a deltametrina ter induzido isquemia miocárdica. Já, os intervalos QT e QTc não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, entretanto, o grupo DMT100 apresentou valores mais elevados em

relação aos demais grupos, ainda assim não há indicativo de risco de morte súbita. Contudo, são necessários mais estudos para esclarecimento desta possibilidade. Avaliou-se, ainda, a resposta dos tecidos cardíaco, tecido alvo do estudo, e do hepático ao estresse oxidativo, já que o fígado é órgão onde ocorre a biotransformação dos piretróides. Sabendo-se que as trocas iônicas celulares influenciam diretamente a excitação e condução cardíaca e que essas trocas dependem da permeabilidade das membranas celulares (prejudicadas em um organismo exposto ao estresse oxidativo), essa avaliação torna-se importante na avaliação do efeito da deltametrina sobre o coração. O estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento e (ou) agravamento de doenças cardiovasculares. Sendo assim, mediu-se nos tecidos do coração e fígado, a atividade das principais enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, fosfatase alcalina e glutathione S-transferase) e quantificou-se a enzima glutathione reduzida e o principal produto da lipoperoxidação, o malondialdeído. Os resultados mostraram que a exposição aguda por via oral a deltametrina, causa estresse oxidativo tanto no fígado como no coração de ratos Wistar machos adultos. Concluiu-se que a deltametrina causou aumento do estresse oxidativo e este pode ter ocasionado as alterações na condução e excitação cardíaca verificadas.

Palavras-chave: deltametrina, eletrocardiograma, catalase, superóxido dismutase, fosfatase alcalina, glutathione transferase, glutathione reduzida, malondialdeído, isquemia, estresse oxidativo.

STUDY OF THE EFFECTS OF DELTAMETHRIN IN THE STIMULATION AND CARDIAC CONDUCTION AND IN THE RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS IN WISTAR RATS

Summary

Deltamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide is widely used in world agriculture and animal health, also its use being important in public and human health. The wide exposure to which humans and non-target organisms may be subjected to studies on mammalian toxicity of this insecticide is necessary.

Thus, the purpose of this study was to evaluate the stimulation and cardiac conduction and the occurrence of oxidative stress cardiac and liver in adult male Wistar rats exposed to acute oral administration of deltamethrin. We used 50 male Wistar rats with 60 days old, weighing on average 250g, which were divided into four experimental groups, with a control group and the other with three different dosages (10% LD50, 25% and 100% LD50 LD50) deltamethrin.

It was used the electrocardiogram examination, since it is a form of simple and rapid diagnosis and presents results that can express with fidelity the cardiac function by being very sensitive regarding the electric alterations of the heart. There was a significant reduction in heart rate, suggesting the toxic effect of deltamethrin in the sinus node. The association of the HR decrease and increase of the prolongation RR interval and QRS duration suggests probable loss of ventricular electrical conduction induced by pyrethroid. Still, the significant reduction of the amplitude R ratified the amendment in the process of ventricular depolarization, as suggested above. The amplitude P was not changed concluding that no changes in atrial electrical conduction and excitation. There was a progressive increase in ST-segment depression, however, as the T wave was positive and no significant change in its amplitude in all groups, we can not suggest the possibility of deltamethrin have induced myocardial ischemia. Already, the QT and QTc intervals were not significantly different between groups, however, the group DMT100 showed higher values compared to other groups, yet there is no indication of risk of sudden death. Still more studies are needed to clarify this

possibility. We evaluated also the response of cardiac tissue, target tissue of the study, and hepatic oxidative stress, since the liver is where is the biotransformation of pyrethroids. Knowing that the ion exchange cell directly influence cardiac conduction and excitation and that these changes depend on the permeability of cell membranes, being damaged in an organism exposed to oxidative stress, such assessment becomes important in evaluating the effect of the deltamethrin on the heart. Oxidative stress may lead to the development and (or) aggravation of cardiovascular diseases. So, was measured in the tissues of the heart and liver, the activity of the antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, alkaline phosphatase, glutathione transferase, glutathione reduced) and the main product of lipid peroxidation, the malondialdehyde. The results showed that acute exposure to deltamethrin orally, causes oxidative stress in both the liver and the heart of adult male Wistar rats. It was concluded that deltamethrin caused increased oxidative stress and this may have caused changes in cardiac excitation conduction and verified.

Keywords: deltamethrin, electrocardiogram, catalase, superoxide dismutase, alkaline phosphatase, glutathione transferase, reduced glutathione, malondialdehyde, ischemia, oxidative stress.

Introdução

A demanda por alimentos acompanha o crescimento da população mundial, e este tem sido desenfreado, exigindo um sistema complexo de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas. Em decorrência deste aumento, o amplo uso de agrotóxicos, sem os cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental, a incidência aumentada de intoxicações ocupacionais, incluindo casos de envenenamento humano agudo e crônico e ingestão de alimentos com teores de resíduos além do permitido pela legislação em vigor. Dos inseticidas mais utilizados atualmente no mundo destacam-se os piretróides sintéticos derivados das piretrinas (Oliveira-Silva et al., 2005; ANVISA, 2008).

Nos insetos, os piretróides exercem o efeito “knock-down”, que causa a paralisação do mesmo devido a um aumento da duração da abertura dos canais de sódio. Esses agrotóxicos também exercem esse efeito sobre os canais de sódio nos vertebrados, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons sódio (Na^+) para o interior da célula neural, efeito semelhante ao observado nas intoxicações por DDT (De la Cerda, 2002). Outro canal iônico afetado no sistema nervoso central é o do cloro (Cl^-). Em concentrações relativamente altas, sofrem ação dos piretróides do tipo II sobre o complexo receptor ionotrópico do ácido σ -aminobutírico (GABA), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA, bloqueando os canais de cloro e sua ativação. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados e a ausência de inibição sináptica causa sua hiperexcitabilidade (Bloomquist, 2007; Manna, 2004; De la Cerda et al., 2002).

Assim como o tecido nervoso, as células cardíacas possuem canais de sódio (Spencer et al., 2001; Ludomirsky et al, 1982), proteínas responsáveis pelo rápido curso ascendente do potencial de ação e rápida propagação do impulso nervoso através do tecido cardíaco (Shukla, 2000). Portanto, além dos efeitos neurológicos, frequentemente são detectadas manifestações cardiovasculares após a exposição dos indivíduos aos piretróides. A condução e excitação cardíaca

iniciam-se a partir de um potencial de ação gerado espontaneamente no nódulo sino-atrial sofrendo interferência do sistema nervoso autônomo.

O coração é formado por dois sincícios: atrial e ventricular. Os sincícios possibilitam às células cardíacas uma maior interconexão entre suas membranas celulares, o que repercute em alta permeabilidade entre as mesmas. Os sincícios facilitam a difusão iônica e a propagação de potenciais de ação entre uma célula a outra com uma velocidade muito rápida. A divisão do coração em dois sincícios permite que os átrios se contraíam um pouco antes da contração ventricular, o que é fundamental para o enchimento ventricular.

Normalmente, o impulso que irá despolarizar o coração é gerado no nódulo sino-atrial, estrutura que cobre uma área de poucos milímetros quadrados, situada no átrio direito, próximo à desembocadura da veia cava superior. No seu interior, as células apresentam uma morfologia irregular, com diâmetro inferior a 10 micra, contendo miofilamentos esparsos, juntando-se em pequenos grupos, separados por tecido conjuntivo frouxo. Uma das principais características do nódulo sino-atrial é a abundante inervação por fibras autonômicas (Gyuton, 2002).

O eletrocardiograma (ECG) é um registro de voltagens, decorrentes de eventos elétricos cardíacos. Assim, o ECG registra as ondas de despolarização e repolarização atrial e ventricular. O primeiro ECG foi obtido em 1902 por Willen Einthoven, citado por Rosen (2002). Esta técnica avança no tempo e continua a ter grande utilidade para identificar área de necrose no coração do homem e de animais (Mill et al., 1990; Rosen, 2002). Dessa forma, alterações das propriedades elétricas do coração, em geral, associam-se a ocorrência de doença cardiovascular e o ECG é utilizado como instrumento para auxiliar no diagnóstico das cardiomiopatias (Dhingra et al., 2005). O ECG, além de ser muito utilizado no diagnóstico de doenças cardiovasculares no homem (Sosnowski et al., 2005), é também muito eficiente nos estudos em animais de experimentação (Lombard, 1959; Normann et al., 1960; Bonilha et al., 2005). Portanto, a eletrocardiografia é uma técnica simples e não invasiva, com ampla aplicabilidade experimental no diagnóstico de arritmias, hipertrofia (Sosnowski et al., 2005), isquemia e infarto do miocárdio (Zeymer et al., 2005).

A interpretação do ECG permanece muito empírica e é importante estabelecer o mecanismo relacionado entre o processo celular e o ECG. Em condições fisiológicas normais, a heterogeneidade do potencial de ação no miocárdio e sua correspondente corrente iônica determinam as ondas ou deflexões do ECG na ativação (despolarização) e na recuperação (repolarização) (Gima & Rudy, 2002). Os valores dos componentes do ECG em ratos normais diferem principalmente na voltagem e na duração dos seus eventos. O ECG normal no rato assemelha-se ao do homem, com exceção das variáveis temporais. Entretanto, certas diferenças importantes necessitam ser apontadas. As deflexões P, Q, R, S e T são semelhantes no homem e no rato. No rato é característica a ausência ou o encurtamento do segmento ST e a onda T positiva. A onda R está presente em todas as derivações (Sambhi et al., 1959). A onda P representa a despolarização atrial, ou seja, ela registra o momento em que acontece a contração atrial. Em seguida este estímulo vai passar pelo nodo A-V, não podendo ser detectado no eletrocardiograma, produzindo uma linha isoelétrica, que fica entre a onda P e o complexo QRS. O complexo QRS representa a despolarização do ventrículo, enquanto a onda T representa a repolarização ventricular, que acontece ao final do período de ejeção. O tamanho da onda é determinado pelo conjunto dos potenciais de ação que acontecem numa determinada área. Caso a amplitude da onda seja muito grande, significa dizer que pode haver uma hipertrofia cardíaca, como ocorre num indivíduo com hipertensão ou em um atleta que apresenta uma hipertrofia fisiológica. Na Figura 1 está representado o eletrocardiograma padrão de seres humanos.

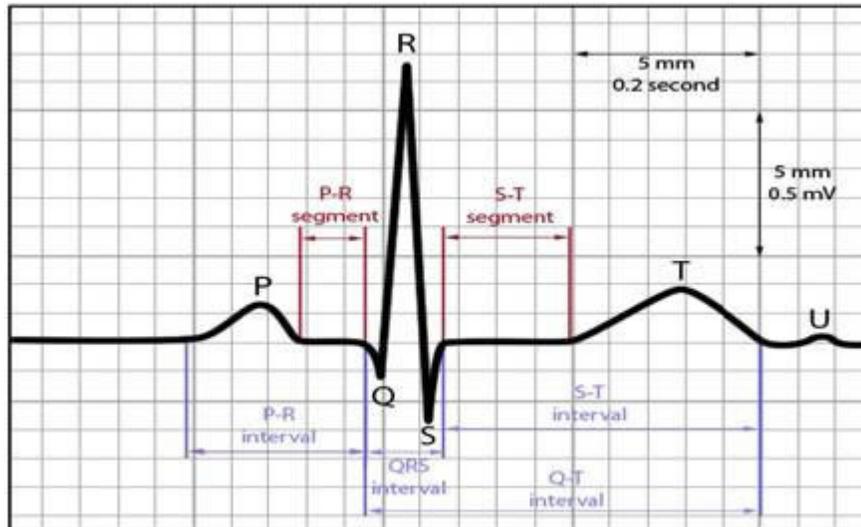


Figura 1: Eletrocardiograma padrão (Guyton, 2002)

Atualmente, mamíferos, incluindo o ser humano, peixes e o ecossistema de modo geral estão continuamente sendo expostos direta ou indiretamente a diversos contaminantes químicos e efeitos adversos podem se manifestar como resposta à toxicidade dessas substâncias (Barata et al., 2005).

O metabolismo normal dos organismos aeróbicos ocasiona reações de oxidação essenciais, principalmente porque o elemento oxigênio atua como aceptor de elétrons no sistema de fluxo de elétrons, sendo responsável pela geração de energia via fosforilação oxidativa (Lushchak, 2006). Durante a função celular normal de células aeróbicas, são produzidas espécies reativas do oxigênio (EROs) (Figura 2) e, além disso, elas também podem ser produzidas pelo metabolismo intracelular de compostos exógenos, o que leva à peroxidação lipídica, à oxidação de algumas enzimas e a oxidação e degradação de proteínas (Matés, 2000). Podemos citar como EROs o radical anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), sendo que estas espécies possuem alta reatividade química (Barata et al., 2005). Na Figura 2 está representada a redução do oxigênio a espécies reativas.

Redução do oxigênio a espécies reativas	
$O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot-} + OH$	Radical hidroperoxil
$HO_2^{\cdot-} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \rightarrow \cdot OH + OH^-$	Radical Hidroxila

Figura 2: Espécies reativas do oxigênio

O estresse oxidativo tem se tornado um assunto importante para a toxicologia. A exposição a alguns xenobióticos, especialmente poluentes químicos tóxicos, pode produzir um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, onde a quantidade gerada do primeiro é maior, induzindo possíveis danos oxidativos (Uner et al., 2005; Almroth et al., 2008). Os metais de transição (quinonas, corantes, herbicidas e compostos nitro aromáticos) são conhecidos por suas propriedades redox de ciclismo e seu potencial de causar estresse oxidativo (Kappus e Sies, 1981; Ames et al., 1993 ; Imlay e linn, 1988; S; Livingstone, 2001). Essa situação inicia o estresse oxidativo em sistemas biológicos: danos aos tecidos, inflamação, doenças degenerativas e envelhecimento (Sohal et al., 2002; Finkel e Holbrook, 2000). O envolvimento do Citocromo P450 na produção de EROs é de interesse adicional em toxicologia, porque ele está envolvido no metabolismo de xenobióticos (Fridovich, 1978).

A exposição, aguda ou crônica, a espécies pró-oxidantes pode provocar um aumento na produção de radicais livres em diversos organismos vivos e, se os sistemas de defesas antioxidantes forem ineficientes para alcançar a homeostasia redox, ocorre uma situação de estresse oxidativo (Ahmad et al., 2000; Uner et al., 2005). Diversos autores já evidenciaram estresse oxidativo em mamíferos e peixes expostos a diferentes agrotóxicos (Sayeed et al., 2003; Bagnyukova et al., 2005; Zhang et al., 2005; Peixoto et al., 2006; Moraes et al., 2007).

A maior fonte de radicais livres orgânicos e EROs são endógenas, particularmente via metabolismo e bioativação de xenobióticos. O ânion superóxido e os radicais hidroxila, que são conhecidos por causar danos oxidativos a

importantes biomoléculas (Sies, 1997), são os mais estudados das EROs. Está bem estabelecido que a inversão do spin do superóxido mitocondrial, durante a transferência de elétrons para o oxigênio, é uma importante fonte de EROs. O $O_2^{\bullet-}$ oxida vitaminas antioxidantes (tocoferóis e ácido ascórbico), catecolaminas e tióis, inativa várias enzimas, tais como catalase (CAT) e peroxidases (Kono e Fridovich, 1982, Blum e Fridovich, 1985). O radical hidroxila (HO^{\bullet}), com uma duração de alguns nanossegundos, é o radical livre de maior importância biológica e toxicológica. Devido ao seu potencial oxidativo e à reatividade indiscriminada, é potente com componentes celulares, como lipídios das membranas biológicas, proteínas de enzimas e DNA (Stadtman, 2000; Richter, 1987; Jackson e Loeb, 2001). A natureza polianiônica das membranas celulares e do DNA proporciona uma base para a adesão de cátions de metais, através de reações do tipo fenton, que ocorrem adjacentes a esses alvos críticos, gerando radicais hidroxilas com o dano oxidativo subsequente (Ercal et al., 2001). As reações de oxidação de proteínas envolvem a propagação de diversos radicais e EROs e os resultados são modificações oxidativas das cadeias laterais do ácido aminado. Espécies reativas do oxigênio mediam clivagem de peptídeos. Essas reações de peptídeos com os produtos da oxidação de lipídios e carboidratos, bem como a formação de derivados carbonílicos das proteínas, acumulam-se durante o processo de envelhecimento e ocasionam patologias como a aterosclerose (Dean et al., 1997; Berlett e Stadtman, 1997). Existem evidências de que a oxidação das proteínas pode contribuir para o envelhecimento e ocasiona doenças nos sistemas biológicos (Goto e Nakamura, 1997; Davies et al., 1999).

Estudos experimentais mostraram que o dano oxidativo às proteínas leva ao acúmulo de formas modificadas das enzimas que estão envolvidas no envelhecimento (Wolff e Dean, 1986). Esta acumulação durante o envelhecimento reflete uma perda da capacidade dos organismos para degradar as proteínas oxidadas, com efeitos subsequentes sobre a fidelidade nos mecanismos de transcrição (Duikan et al., 2000; Lushchak & Bagnyukova, 2006).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade destas

membranas. Conseqüentemente há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação (LPO) também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Assim como na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação da resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser prejudicial ao organismo.

O processo de LPO é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas. Esse processo resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o MDA, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar a ocorrência de estresse oxidativo. O processo de LPO influencia a fluidez da membrana e a integridade das biomoléculas associadas com a membrana (Almroth et al., 2005). A intensidade da LPO deve ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou, ainda, com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o MDA.

As conseqüências do aumento das concentrações de radicais livres tanto podem ser a lesão celular como a perda da função fisiológica. Muitos compostos já foram relacionados como indutores da produção de radicais livres e têm o potencial de promover estes tipos de lesão. A interação de vários xenobióticos com a cadeia de transporte de elétrons leva a um aumento nas taxas de superóxido através de dois diferentes mecanismos: alguns desses compostos estimulariam o estresse oxidativo ao bloquearem o transporte de elétrons, diminuindo a disponibilidade de carreadores em níveis acima do local da inibição. Outros, porém, estimulariam a produção de superóxido, ao aceitarem um elétron de um carreador da cadeia respiratória e depois fazendo a transferência deste elétron para o O_2 , estimulando a formação de superóxido sem, no entanto, inibir a cadeia respiratória. Ao longo dos últimos 40 anos, tem sido identificada uma variedade de fontes mitocondriais de superóxido, incluindo complexos da cadeia respiratória e enzimas (Turrens, 2003). A formação de grande parte de superóxido

no cérebro, em condições normais, pode ser atribuída, primariamente, ao Complexo I da cadeia respiratória. Além do mais, o Complexo I é a fonte primária de EROS em uma variedade de processos patológicos que abrangem desde o processo de envelhecimento até a Doença de Parkinson.

Foi demonstrado, que inseticidas piretróides inibem a cadeia respiratória em mitocôndrias de ratos na altura do Complexo I. Essa inibição favorece a formação de superóxido na mitocôndria aumentando a ocorrência de apoptose celular sendo que esses eventos estão associados a doenças neurológicas degenerativas e ao envelhecimento. Em estudos feitos com ratos expostos oralmente a piretróides, foram constatadas mudanças nas propriedades físico-químicas da bicamada dos eritrócitos e modificações na atividade das enzimas antioxidantes (Barja e Herrero 1998; Barja 1999; Gassner et al. 1997).

Os organismos aeróbicos possuem uma diversidade de defesas antioxidantes para proteger a célula contra os danos ocasionados pela produção de EROs. O sistema antioxidante pode ser enzimático e não-enzimático. O não-enzimático é composto por substâncias como a glutathiona, o ácido ascórbico, o tocoferol, entre outros. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a fosfatase alcalina, a glutathiona transferase (GST) e a glutathiona reduzida (GSH) (Zhang et al., 2005, Trenzado et al., 2006). A GST representa uma importante ferramenta para a detoxificação de xenobióticos. As enzimas CAT e SOD têm papéis complementares na detoxificação do peróxido de hidrogênio (Barata et al., 2005) (Figura 3)

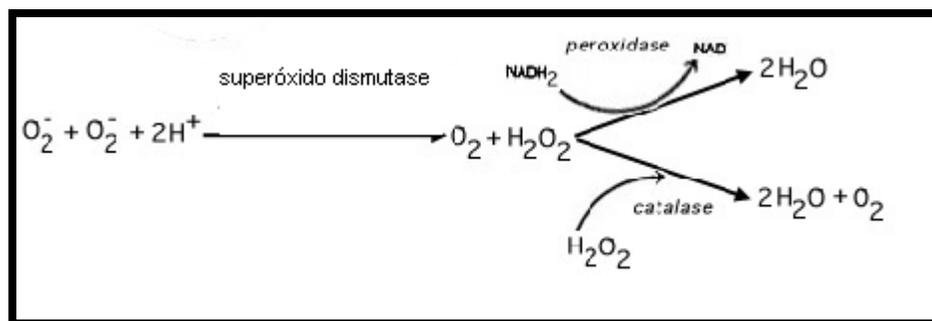


Figura 3. Sistema antioxidante. Disponível em:

<http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/oxygen.jpg>, acessado em Dez/2010.

A CAT é uma das mais importantes enzimas do sistema antioxidante. Essa enzima se localiza nos peroxissomos e é responsável pela detoxificação do H₂O₂ (Zhang et al., 2005). A fosfatase alcalina hidrolisa compostos fosfomonoésteres e atua em reações de transfosforilação. A glutatona reduzida (GSH) está implicada na prevenção de inúmeras doenças promovidas pelo estresse oxidativo, tais como, aterosclerose, angina pectoris, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, artropatias, diabetes, envelhecimento, incluindo ainda muitas outras doenças, inclusive o câncer (Halliwell, 1999 & 2000; Andrade et al.2002; Dröge, 2003; Ames et al., 1993 ; Davies, 1995).

Os piretróides estão entre os inseticidas de maior sucesso devido a sua seletividade de alvo, baixa toxicidade aguda para organismos não-alvo (mamíferos e outros animais) e ausência de resíduos na biosfera. No entanto, a indução do estresse oxidativo e a alteração do sistema antioxidante por piretróides têm sido evidente em pesquisas (Maiti et al, 1995; Gupta et al, 1999; Kale et al, 1999a). Ainda, alterações das membranas por ação dos piretróides sobre a velocidade de abertura dos canais de sódio e de cálcio podem interferir tanto na atividade do sistema nervoso central quanto na excitação e condução cardíaca, podendo alterar a eletrofisiologia do coração. Porém, ainda existem poucos estudos sobre o efeito tóxico agudo dos piretróides, tanto na função cardiovascular quanto no efeito redox homeostático negativo (Bloomquist, 2007; Manna, 2004). Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a excitação e condução cardíaca e a ocorrência de estresse oxidativo em ratos Wistar adultos machos, submetidos à administração oral aguda do inseticida deltametrina.

Metodologia

Protocolo do Experimento

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos, com 60 dias de vida e média aproximada de peso de 200 ± 10g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP (LEB-FEA).

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas, dois animais por gaiola, sob temperatura de 22 ± 2 °C com ciclos de 12 horas claro/escuro, tendo sido submetidos a uma semana de aclimação antes do início do experimento. Os animais receberam ração Labina da marca Purina e água à vontade. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob protocolo n°. 2119-1.

O protocolo de trabalho consistiu em dose única, por gavagem, de um percentual (%) da dose letal 50 (DL₅₀) da deltametrina (DMT). O valor considerado de DL₅₀ da deltametrina foi de 128 mg Kg⁻¹p.c. (Glomot & Chevalier,1976). Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. Cada grupo continha 10 animais, conforme o seguinte procedimento experimental:

- **Grupo Controle (CO):** recebeu 5 mL de óleo de milho;
- **DMT10:** recebeu 10% do valor da DL₅₀ da deltametrina (3,2 mg/5mL de óleo de milho);
- **DMT25:** recebeu 25% do valor da DL₅₀ da deltametrina (8 mg/5mL de óleo de milho);
- **DMT100:** recebeu 100% do valor da DL₅₀ de deltametrina (32mg/mL de óleo de milho).

Procedimento experimental

- 1) Sob jejum de 12 horas, os ratos foram anestesiados com cetamina + xilazina (90 e 10 mg kg⁻¹ p.c., respectivamente) através de injeção intramuscular. Antes dos anestésicos fazerem o efeito, foi introduzida uma sonda flexível para a gavagem com espera externa para conectar a seringa. Para tanto, foi introduzido um tubo flexível de poliuretano esterilizado através do esôfago do roedor, tubo este que tinha diâmetro aproximado de 3 mm devidamente esterilizado. Para a introdução do tubo, o animal foi elevado da bancada após o pinçamento na base do pescoço com a mão esquerda, deixando o peso do corpo se alinhar ao tronco com a força da gravidade. O tubo flexível foi conduzido a partir do lado esquerdo da boca do animal com ele ainda acordado. Os ratos foram então posicionados em supina sobre uma prancha de poliuretano com as patas dianteiras e

traseiras fixadas com fita cirúrgica. Os eletrodos de agulha foram introduzidos subcutaneamente. A prancha ficou levemente inclinada a aproximadamente 35°. A respiração se manteve espontânea para registro do ECG.

- 2) Após 5 min. de registro do ECG, administrou-se a deltametrina conectando-se ao tubo flexível uma seringa descartável contendo a deltametrina, conforme dosagem prevista para cada grupo, e marcou-se nos registros o instante exato em que a dose foi administrada. Foi adicionado 1 mL de óleo de milho para limpeza de resíduos de deltametrina na sonda, dando-se continuidade ao registro eletrocardiográfico por mais 30 min.;
- 3) Após término do ECG, prolongou-se o efeito anestésico nos animais induzindo a morte dos mesmos;
- 4) Imediatamente, após a morte dos animais, foram retirados o fígado e o coração para análises bioquímicas de estresse oxidativo. Os tecidos foram acondicionados e armazenados a -80 °C.

Ensaio Piloto para tempo de registro do eletrocardiograma

O tempo de duração de registro do ECG (30 min.) após a ingestão da deltametrina foi determinado através de ensaio piloto no qual foi avaliada a alteração eletrocardiográfica máxima induzida pela deltametrina. Para tanto, foram utilizados 10 ratos com 60 dias de idade, com peso aproximado de 200 ± 10 g, os quais foram anestesiados e preparados para leitura do ECG conforme descrito anteriormente. A leitura do ECG foi realizada durante 60 min., tendo sido verificado pelos registros eletrocardiográficos que a alteração máxima se deu, em média, aos 30 min. do início dos mesmos, sendo este o momento estabelecido para induzir a morte dos animais.

Avaliação do grau de pureza da deltametrina

O grau de pureza da deltametrina utilizada nos ensaios biológicos foi avaliado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor UV (HPLC-UV). Para tanto, foi utilizado padrão de deltametrina da marca Flukla (pureza 99,7 %). A fase móvel utilizada consistiu de água:metanol, 50:50 v/v, modo isocrático.

Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18). A eluição da deltametrina aconteceu após 13 min do início da corrida cromatográfica.

Eletrocardiograma

Os ratos foram anestesiados com cetamina + xilazina ($190 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c} + 10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c, i.m.}$), tendo como veículo de diluição a solução de cloreto de sódio 0,9% (salina). Os animais foram fixados na posição supina para registros eletrocardiográficos sob respiração espontânea. Os registros foram feitos com eletrodos em forma de agulha, implantados subcutaneamente, utilizando eletrocardiógrafo computadorizado PowerLab ADInstruments de quatro canais MLS360/7 e ECG Analysis Module LabChart (HENKENS, I.R; 2007). Os parâmetros eletrocardiográficos analisados foram: frequência cardíaca, intervalo RR, amplitude da onda P, Intervalo QRS, amplitude da onda R, segmento ST, amplitude da onda T, intervalo QT e intervalo QTc (intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca, segundo a fórmula de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$), sendo $RR = 60/\text{frequência cardíaca}$).

Análises Bioquímicas

O fígado e coração foram retirados dos animais, pesados e armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Ambos os tecidos foram descongelados a $5 \text{ }^\circ\text{C}$, aproximadamente durante 12h, e homogeneizados em Ultra-turax T25 (Ika-Labortechnik) na presença de tampão Tris-HCl-KI 50 mM, pH 7,2, na proporção de 1 para 3 partes de tecido. Em seguida foram realizadas duas centrifugações por 20 min. a $10.000 \times g$, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, cada uma e as amostras armazenadas em biofreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, até a realização das análises.

Homogeneizados de amostras do coração e do fígado foram utilizados para determinar a formação de malondialdeído e glutathiona reduzida e mensurar a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona transferase, e fosfatase alcalina.

1. Malondialdeído (MDA)

A concentração de MDA foi determinada conforme descrito por Uchiyama & Mihara, 1978. Para tanto, homogeneizados do coração e fígado foram adicionados ao substrato de N-methyl-2-phenylindole (MPO) e ácido clorídrico (HCl), realizando a leitura em 590 nm. Os resultados são expressos em nM/ μ g de proteína.

2. Glutathione Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada utilizando-se o método de HABIG et al. (1974), usando como substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade foi mensurada durante 10 min., com leitura a cada minuto e expressa em nmol/min/ μ g de proteína.

3. Glutathione Reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi determinada pelo método de Bleuter (1957), expressa em μ mol/ μ g.

4. Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi realizada conforme relatado por Winterbourn et al., 1975, avaliando-se a redução do NTB (nitro blue tetrazolium) pelo ânion superóxido, gerado pela hipoxantina/xantina oxidase à 37 °C. A reação pela SOD foi inibida em banho de gelo, seguida a leitura espectrofotométrica, monitorando a formação de formazan à 560nm. Os dados foram expressos em unidades de densidade óptica por μ g de proteína.

5. Fosfatase Alcalina (FA)

A atividade da FA foi determinada conforme descrito por Martins et al., 2001, utilizado o reagente 4-nitrophenyl phosphato disodium (p-NPP, 37mM) como substrato. A atividade da enzima foi determinada nos tempos zero, 30, 60 e 90 min. por espectrofotometria e expressa em nmol/min/ μ g proteína.

6. *Catalase (CAT)*

A atividade da CAT foi determinada conforme descrita por Cohen et al. (1970) utilizando-se triton X-100 para solubilizar a CAT e aumentar seu nível observável. Peróxido de hidrogênio foi adicionado a cada amostra para iniciar a reação e, após 3 min., ácido sulfúrico (H₂SO₄) foi adicionado para parar a reação. Em seguida foi utilizado permanganato de potássio (KMnO₄) que, ao reagir com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), forma o complexo que foi lido em 480 nm, os resultados foram expressos em unidades por mg de proteína utilizada, dados expressos em unidades de densidade óptica por min por µg proteína tecidual.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média dos grupos com o respectivo desvio padrão (\pm SD). A análise estatística foi realizada utilizando-se do teste Anova one-way, seguido pelo teste de Bonferroni (análises bioquímicas) e pelo teste de Tukey (análise eletrocardiográfica) para comparação entre os grupos experimentais (GAD & WEIL, 1994). Os cálculos foram realizados pelo software Graph-Pad Prism, v 3.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Foi considerado $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

Eletrocardiograma

➤ ***Frequência Cardíaca (BPM)***

Os dados obtidos indicam que houve redução significativa da frequência cardíaca dos animais que receberam deltametrina (doses equivalentes a 10%, 25% e 100% da DL₅₀) em relação ao grupo controle (Figura 4).

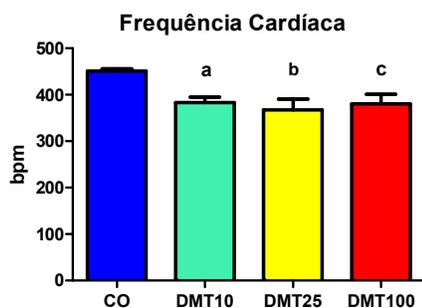


Figura 4. Frequência Cardíaca. Valores de batimentos por minuto (bpm) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ Intervalo RR

A análise estatística mostrou que houve aumento da duração do intervalo RR nos grupos DMT25 e DMT100, em relação ao controle (Figura 5).

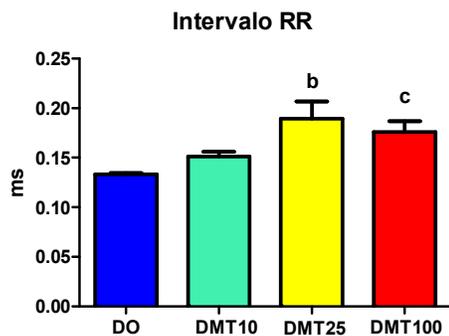


Figura 5. Intervalo RR. Valores em milissegundos (ms) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ **Amplitude P**

Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (figura 6)

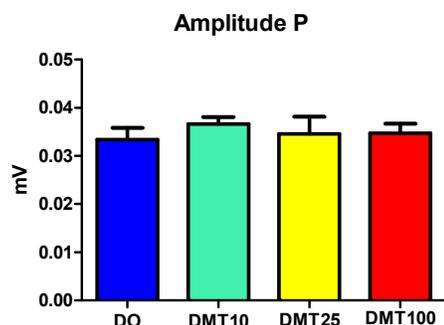


Figura 6. Amplitude da onda P. Valores em milivolts (mV) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ **Complexo QRS**

Os resultados demonstraram que houve aumento significativo na duração do complexo QRS nos grupos DMT25 e DMT100, em relação ao controle (figura 7).

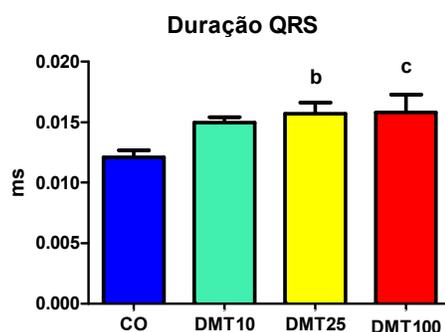


Figura 7. Duração do complexo QRS. Valores, milissegundos (ms) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ **Amplitude R**

A análise estatística mostrou que houve redução significativa da amplitude da onda R (figura 8) nos grupos que receberam deltametrina, em relação ao grupo controle.

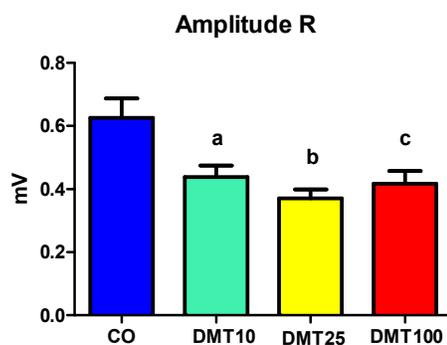


Figura 8. Amplitude da onda R. Valores, milivolts (mV) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ **Amplitude ST**

Observou-se um infradesnivelamento, aparentemente dose-dependente, do segmento ST dos grupos que receberam deltametrina, em relação ao controle, embora não tenha sido significativo.

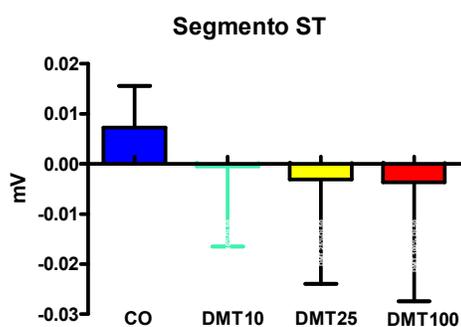


Figura 9. Segmento ST. Valores em milivolts (mV) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ *Amplitude T*

Os dados apresentados na figura 10 indicam que não houve diferença significativa entre os grupos expostos a deltametrina e o grupo controle.

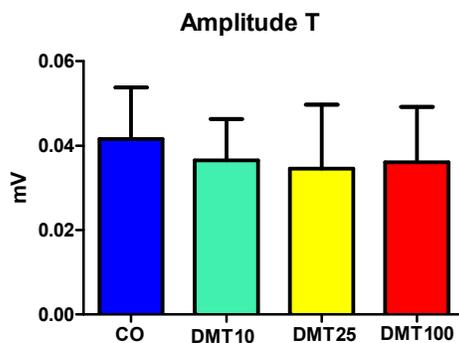


Figura 10. Amplitude da onda T. Valores em milivolts (mV) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ *Intervalo QT*

Os dados obtidos (figura 11) indicaram que não houve diferença significativa entre os animais expostos a deltametrina e os do grupo controle.

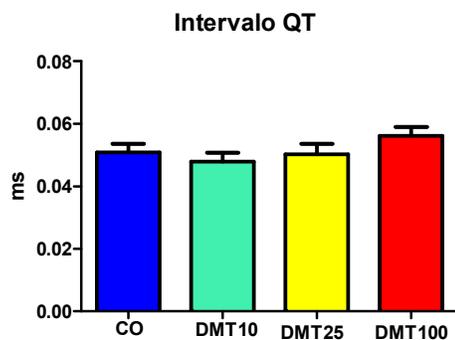


Figura 11. Intervalo QT. Valores em milissegundos (ms) expressos como média \pm SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

➤ **Intervalo QTc**

Os dados obtidos do intervalo QTc não revelaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 12) .

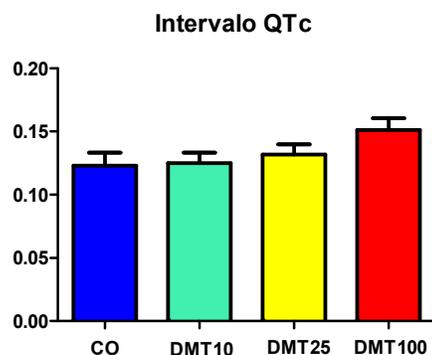


Figura 12. Intervalo QTc. Valores em milissegundos (ms) expressos como média ± SD. CO: Grupo controle; DMT10: 10% da DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% da DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% da DL₅₀ da deltametrina; p < 0,05 para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT25, (c) CO x DMT100; n=10.

Análises Bioquímicas

1. Malondialdeído (MDA)

No tecido do coração houve redução significativa, dose dependente, da concentração de malondialdeído dos grupos expostos a deltametrina em relação ao grupo controle (Figura 13 A). Já no fígado, houve aumento significativo, também dose dependente, dos grupos expostos à deltametrina em relação ao grupo controle (Figura 13 B)

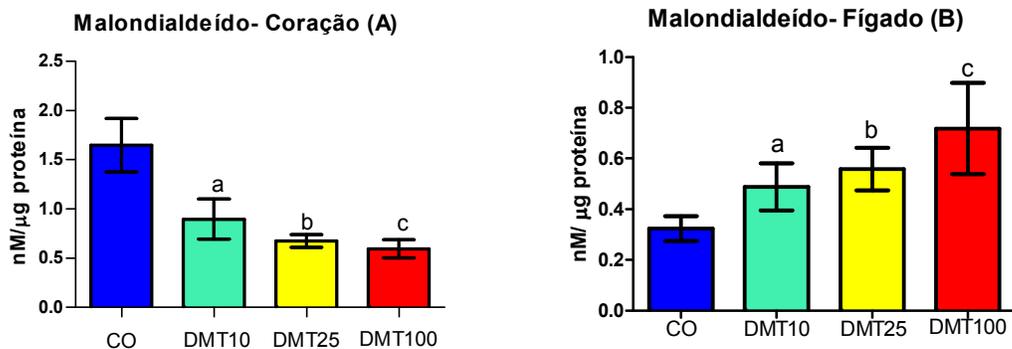


Figura 13. Malondialdeído no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B) (nM/μg proteína). Valores expressos como média ± DP, de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10% DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% DL₅₀ da deltametrina; p < 0,05 para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

2. *Glutathione Transferase (GST)*

Os dados apresentados na Figura 14 indicam que no coração houve redução significativa da atividade da GST dos grupos expostos a deltametrina em relação ao grupo controle independente da dose a que foram expostos (Figura 14 A). Efeito oposto foi verificado no fígado onde os grupos expostos apresentaram aumento da atividade da GST em relação ao grupo controle, sendo que somente o grupo DMT 100 apresentou diferença significativa em relação ao CO (Figura 14 B).

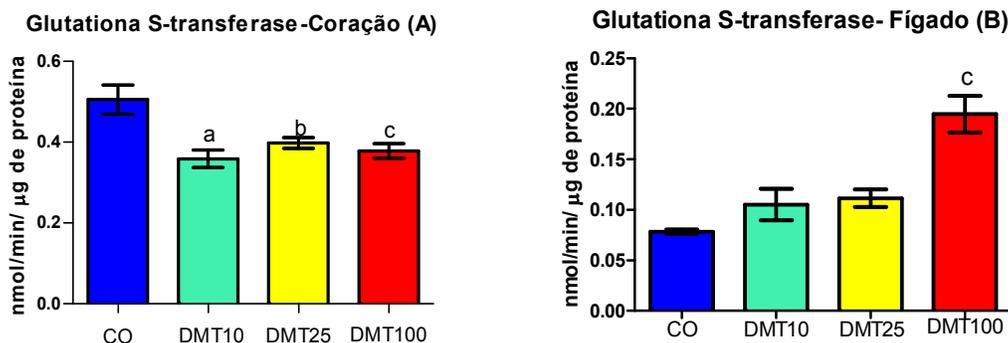


Figura 14. Atividade da enzima Glutathione S-Transferase (nmol/min/μg de proteína) no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média ± DP, p<0,05 de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10%DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25%DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100%DL₅₀ da deltametrina; p < 0,05 para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

3. *Glutathiona Reduzida (GSH)*

No tecido cardíaco, houve aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração da GSH dos grupos expostos à deltametrina em relação ao grupo controle (Figura 15 A). No tecido hepático também houve aumento significativo da concentração da GSH, porém unicamente do grupo DMT 100 (100% DL_{50} de deltametrina) em relação ao grupo controle (Figura 15 B).

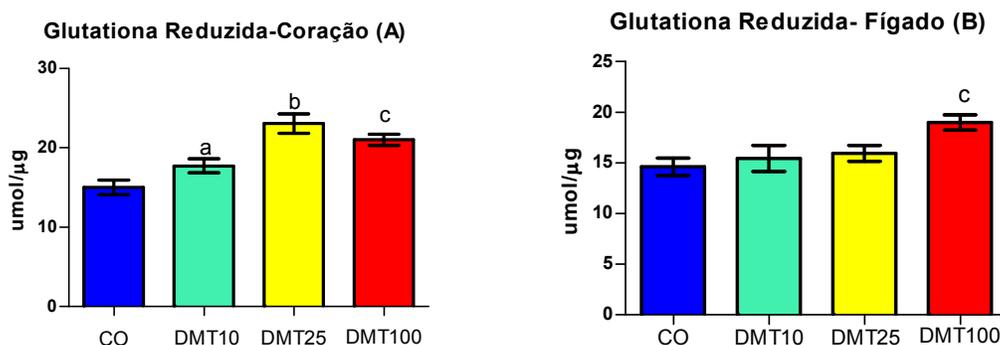


Figura 15. Atividade da enzima Glutathiona reduzida ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$) no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média \pm DP, $p < 0,05$ de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10% DL_{50} da deltametrina; DMT25: 25% DL_{50} da deltametrina; DMT100: 100% DL_{50} da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; $n=10$.

4. *Superóxido Dismutase (SOD)*

No coração, houve redução significativa da atividade enzimática desta enzima nos grupos expostos à deltametrina, em relação ao grupo controle (Figura 16 A). Também houve redução significativa da atividade da GSH no fígado do grupo de 100% DL_{50} em relação ao grupo controle, não tendo sido verificada diferença entre os grupos DMT10 e DMT25 em relação ao grupo CO (Figura 16 B).

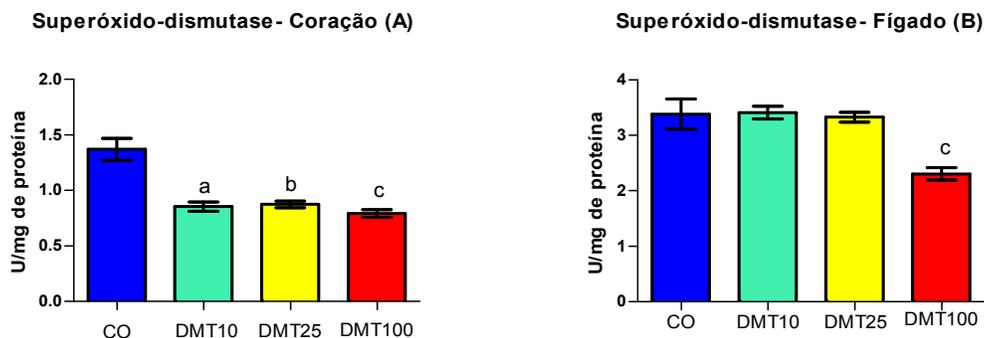


Figura 16. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (U/mg de proteína) no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média \pm DP, $p < 0,05$ de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10% DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

5. Fosfatase Alcalina (FA)

No coração, não foi verificada alteração significativa da atividade da FA entre os grupos expostos à deltametrina e o grupo controle. Já, no fígado, houve aumento significativo da atividade dessa enzima nos grupos expostos em relação ao controle (CO).

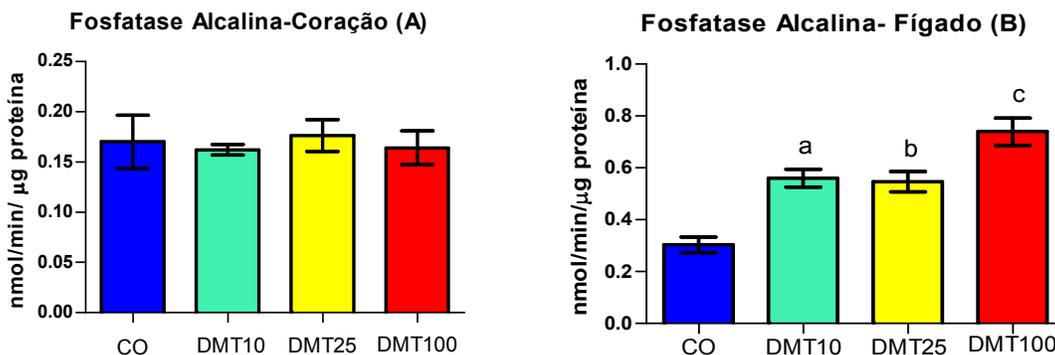


Figura 17. Atividade da enzima Fosfatase alcalina (nmol/min/ μ g de proteína) no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média \pm DP, $p < 0,05$ de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10% DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

6. Catalase (CAT)

No coração houve aumento significativo, dose dependente, da atividade da CAT dos grupos que receberam deltametrina em relação ao grupo controle (Figura 18 A). Já no fígado houve redução significativa da atividade da CAT dos grupos que receberam 25% e 100% da DL₅₀ de deltametrina em relação ao grupo controle (Figura 18 B).

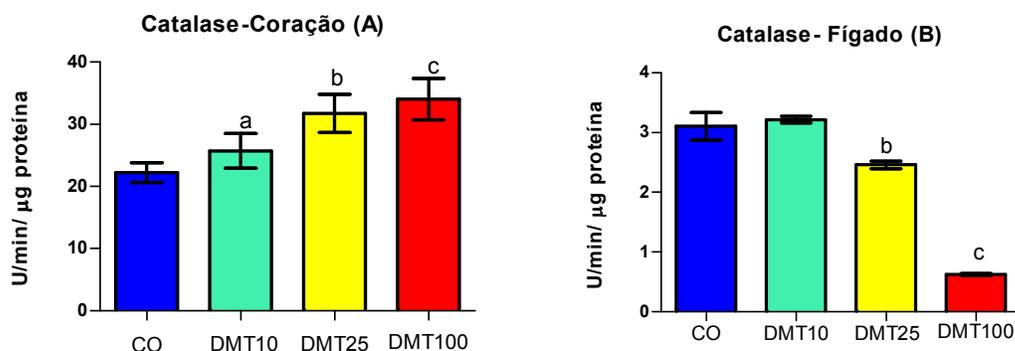


Figura 18. Atividade da enzima Catalase (U/min/µg de proteína) no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média ± DP, $p < 0,05$ de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10% DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25% DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100% DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

7. Relação MDA/GST

No coração, houve redução significativa, dose dependente, da relação MDA/GST entre os grupos expostos à deltametrina e o grupo controle (Figura 19 A). No fígado não houve diferenças significativas entre todos os grupos (Figura 19 B).

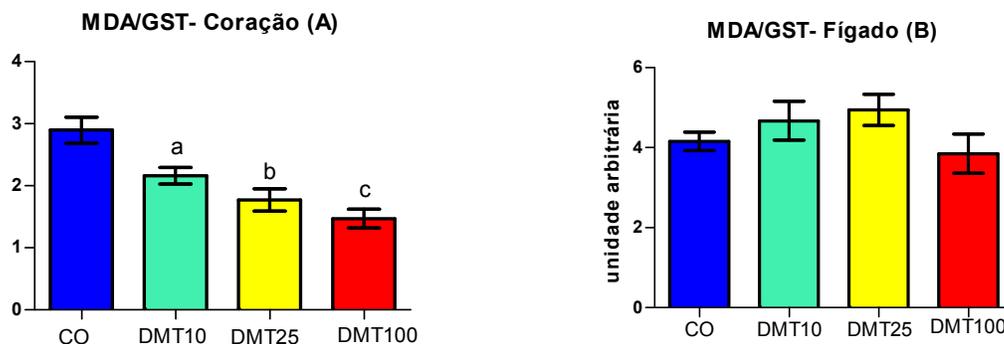


Figura 19. Relação Malondialdeído (MDA) e Glutaciona S-transferase no tecido cardíaco (A) e no tecido hepático (B). Valores expressos como média ± DP, $p < 0,05$ de significância, sendo CO: Grupo controle; DMT10: 10%DL₅₀ da deltametrina; DMT25: 25%DL₅₀ da deltametrina; DMT100: 100%DL₅₀ da deltametrina; $p < 0,05$ para (a) CO x DMT10, (b) CO x DMT 25, (c) CO x DMT100; n=10.

Discussão

Inseticidas piretróides podem causar intoxicação por exposição dérmica, inalatória e oral (WHO, 2008). Intoxicação intencional por piretróides, muitas vezes ocorre por via oral em tentativas de suicídio podendo também ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados com esses agrotóxicos devido ao não cumprimento das boas práticas agrícolas. A intoxicação por piretróides por via oral é mais grave do que por exposição dérmica, pois a biodisponibilidade dos piretróides por absorção gástrica é de 36%, enquanto a biodisponibilidade por absorção dérmica é de apenas 1% (Ray, 2000).

A intoxicação por piretróides provoca dois tipos de síndromes: (1) síndrome T (por piretróides tipo I), caracterizada por tremores finos, hiperexcitabilidade reflexa, ativação simpática e parestesia (Matsunaga, 1987; Bradberry, 2005) e (2) CS síndrome (por piretróides tipo II), caracterizada por coreoatetose, salivação, tremores grosseiros, moderada hiperexcitabilidade de reflexo, ativação simpático, parestesia e convulsões. As manifestações sistêmicas da intoxicação por piretróide podem começar a partir de 4 h após a exposição e durarem até 48 h do início da mesma (Ray, 2000).

Os resultados da análise eletrocardiográfica revelaram que a deltametrina, nas três doses utilizadas, promoveu diminuição da frequência cardíaca (bradicardia) e aumento do intervalo RR, em relação ao grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com Santos (2008), a qual verificou, no mesmo laboratório deste estudo, que ratos Wistar recém-desmamados, que receberam por via oral, durante 30 dias, deltametrina e permetrina (nas doses de 1/10 do valor da DL_{50} do piretróide) apresentaram redução significativa da frequência cardíaca (Santos, 2008).

Magdalan et al (2009) relataram bradicardia seguida de assistolia em paciente com intoxicação aguda por piretróide. Os autores atribuíram tal fato às alterações na sensibilidade às catecolaminas induzida por inseticidas piretróides, as quais poderiam prejudicar a condução elétrica cardíaca. Outra possibilidade poderia ser a interferência da deltametrina sobre a atividade nervosa autonômica (simpático e parassimpático) no nódulo sino atrial. Assim, num futuro próximo, pretendemos determinar a variabilidade da frequência cardíaca uma vez que tal

procedimento permite avaliar a integridade funcional do sistema nervoso autônomo sobre o coração.

Não observamos alterações na amplitude da onda P e, conseqüentemente, no processo de excitação atrial e condução elétrica atrial. Entretanto, os animais que receberam deltametrina apresentaram maior duração do complexo QRS, bem como menor amplitude da onda R, em relação ao grupo controle, sugerindo alterações na excitação elétrica ventricular. Nossos resultados concordam com os obtidos por Santos (2008), o qual observou prejuízo na condução elétrica ventricular em ratos submetidos à exposição oral sub-crônica de deltametrina e permetrina.

Segundo Bhaskar et al (2010), inseticidas piretróides podem causar distúrbios na condução elétrica cardíaca, os quais podem gerar arritmias devido à ação dos piretróides sobre canais de sódio presentes no coração. De fato, Vais et al (2001) demonstraram que a deltametrina modificou a cinética de canais de sódio presentes em neurônios, induzindo persistente corrente de sódio despolarizante ao potencial de membrana. Células cardíacas também são ricas em canais de sódio, estando sujeitas à ação tóxica de piretróides. Segundo Spencer et al (2001), piretróides prejudicam a inativação do influxo de sódio aumentando a proporção da corrente de inativação lenta à custa da corrente de inativação rápida, sendo que tal efeito é dose dependente. Tal fato pode repercutir na variação dos intervalos entre os batimentos cardíacos e, conseqüentemente, na intensidade da contração cardíaca, produzindo alterações potencialmente arritmogênicas. Assim, a exposição aguda, acidental ou ocupacional, aos inseticidas piretróides poderá aumentar a concentração plasmática dos mesmos a um nível suficientemente capaz de alterar o fluxo iônico de sódio através de canais neuronais e cardíacos, sendo que o tecido cardíaco não possui nenhuma resistência específica à ação tóxica dos piretróides (Spencer et al, 2001).

Um estudo *in vitro*, realizado com miócitos ventriculares de gatos concluiu que a deltametrina aumentou a duração do potencial de ação e produziu mudanças cinéticas no canal de sódio cardíaco, semelhantes às induzidas por piretróides no canal de sódio da membrana nervosa (Dejonckheere, 1982). Estudo *in vitro*, mostrou que todos os piretróides testados; α -cipermetrina, tetrametrina e

tefluthrin, produziram mudanças similares nas propriedades eletrofisiológicas de miócitos cardíacos. Os piretróides α -cipermetrina e tefluthrin causaram um aumento significativo na duração do potencial de ação cardíaco. O prolongamento do potencial de ação causado pelo aumento de sódio para dentro das células também podem afetar direta ou indiretamente o influxo de Ca^{2+} na célula, causando uma reativação das correntes de cálcio levando a uma maior duração das despolarizações (Natarajana, 2004). Canais de cálcio voltagem-sensíveis atuam sobre o sistema cardiovascular. Evidências limitadas sugerem que os piretróides atuem sobre os canais de cálcio voltagem-sensíveis (VSCC) L do coração (Soderlund et al, 2002). No entanto, esses estudos referem-se inteiramente a dados *in vitro*, ainda não existem dados disponíveis de estudos *in vivo* relativos a alterações provocadas por piretróides.

Além disso, segundo Spencer e Sham (2005), o influxo de sódio produz abertura subsequente de canais de cálcio em cardiomiócitos, prolongando a duração do potencial de ação cardíaco (platô) permitindo, então, a reativação de canais de cálcio estendendo ainda mais a duração do potencial. Mecanismos similares podem estar envolvidos na toxicidade dos piretróides *in vivo* caracterizada, por exemplo, pelo prolongamento do intervalo QT.

Cabe mencionar que, durante o intervalo QT do ECG, ocorre toda a atividade elétrica ventricular, ou seja, a despolarização e a repolarização dos ventrículos. Dessa forma, o aumento do intervalo QT constitui-se num evento eletrocardiográfico indicativo de arritmia, uma vez que os ventrículos estão sujeitos, nessa condição, a uma nova excitação sinusal antes de terem completado o processo de repolarização. Tal fato pode acarretar em morte súbita por fibrilação ventricular.

Nossos resultados demonstraram que os intervalos QT e QTc não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, embora DMT100 tenha apresentado valores mais elevados em relação aos demais grupos. Em estudo sub crônico, Santos (2008), verificou prolongamento dos intervalos QT e QTc em ratos recém desmamados e tratados por via oral com deltametrina, indicando retardo no processo de despolarização e repolarização ventricular, sugerindo risco de morte súbita. Acreditamos, dessa forma, que a deltametrina pode ter alterado

os fluxos iônicos de sódio e cálcio interferindo, assim, na excitação e condução elétrica ventricular. Outros estudos se fazem necessários para esclarecer se tais alterações prejudicam a função ventricular. Para tanto, pretendemos analisar as pressões, força de contração e eusitropismo ventricular dos grupos experimentais.

Nossos resultados eletrocardiográficos registraram, também, aumento progressivo do infradesnivelamento do segmento ST, embora não significativo. No eletrocardiograma normal, o segmento ST é um momento isoelétrico que antecede a repolarização com valores próximos a linha de base. Durante esse período o coração encontra-se em sístole ventricular. Dessa forma, um infra ou supradesnivelamento do segmento ST pode ser indicativo de processo isquêmico cardíaco. Entretanto, como a onda T mostrou-se positiva e sem alterações significativas na sua amplitude, em todos os grupos estudados, não podemos sugerir a possibilidade de a deltametrina ter induzido isquemia miocárdica. Assim, acredita-se que as alterações eletrocardiográficas estejam relacionadas ao aumento do estresse oxidativo no tecido cardíaco, induzido pela deltametrina.

Pesquisas realizadas em várias espécies animais têm demonstrado que piretróides causam dano oxidativo (El-Demerdash et al. 2003, Giray et al. 2001, Liu et al., 2008, Prasanthi et al. 2005).

No presente estudo, os resultados da redução de atividade de GST no coração e da SOD tanto no coração como no fígado, corroboram os resultados publicados por Kale et al. (1999b), os quais verificaram que a atividade dessas enzimas foram significativamente diminuídas devido à administração oral de deltametrina (Mokhtar, 2006). Conforme relatado na literatura, esse efeito pode ser resultado da produção de radicais livres ou de uma ação direta dos piretróides sobre a síntese das enzimas (Oruc e Uner, 2000). Yu e Nguyen (1996) relataram que grupos halogênio alquila ou arila contida nas moléculas de inseticidas piretróides poderiam interagir com a GST.

Neste estudo, verificou-se o aumento da atividade da enzima CAT no coração e da concentração de GSH tanto no coração como no fígado, assim como a ocorrência de lipoperoxidação, corroborando aos resultados de outro estudo, porém em eritrócitos de ratos, sob exposição oral aguda a piretróides. Kale et al (1999b) relataram aumento na peroxidação lipídica e correlação entre o estresse

oxidativo e o estímulo na atividade das enzimas antioxidantes CAT, bem como na concentração de GSH. O aumento da GSH nos eritrócitos, provavelmente pode ser uma primeira resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo em ratos intoxicados por piretróides. No presente trabalho, os níveis de MDA no coração estavam reduzidos. Assim como a atividade da GST, a relação MDA/GST apresentou diminuição dose-dependente com o aumento da exposição à deltametrina. Isso indica que apesar da redução de GST e do aumento do MDA no fígado, em função do aumento à exposição à deltametrina, a CAT e a GSH conseguiram atuar como potentes enzimas antioxidantes no coração, visto que os níveis de MDA no coração estavam baixos. Provavelmente, a molécula de GST liga-se a inseticidas piretróides por mecanismo de sequestro, acrescentando força à defesa do organismo como forma passiva de desintoxicação ou como facilitador. Portanto, é razoável sugerir que a GST funciona como uma proteína que contribui para a ação de outras enzimas envolvidas na degradação de piretróides.

Estudo de exposição dérmica crônica a permetrina em ratos mostrou aumento significativo ($p \leq 0,05$) da concentração de MDA no plasma. Isso foi registrado após 45 ou 60 dias de tratamento com permetrina. No entanto, o mesmo não foi detectado no tratamento após 30 dias com permetrina (Chargui, 2010). Estudo *in vitro* com eritrócitos sob 4 horas de incubação com ciflutrina- β , um piretróide do tipo II, verificou que houve redução da atividade da GST e SOD e aumento dos níveis de MDA (Sadowska-Woda, 2010).

A clivagem de piretróides, contendo o grupo alfa-ciano, forma cianohidrinás, as quais são instáveis sob condições fisiológicas e se decompõem em cianeto e aldeído (WHO, 1990; Shan & Hammock, 2001). Os aldeídos e outros conjugados lipofílicos também podem levar ao estresse oxidativo durante a intoxicação por piretróides (Kale et al., 1999b).

Mokhtar (2006), em um estudo com ratos sob exposição oral durante 30 dias à deltametrina, verificou que a atividade enzimática da FA aumentou significativamente no plasma. Este autor também verificou aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de lipídios plasmáticos totais (LP), colesterol, triglicérides (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de densidade muito baixa

(VLDL), enquanto o nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) diminuiu. O aumento na atividade da fosfatase alcalina no plasma pode ser indicativo de lesão hepática e isso, conseqüentemente, provoca alteração da função hepática, justificando esse efeito sobre os níveis de lipídios séricos. Esses dados ratificam os resultados do presente estudo, que evidenciam estresse oxidativo no fígado provocado pela deltametrina. Nosso estudo mostrou aumento dos níveis de MDA hepático, aumento da atividade enzimática da FA, GST e GSH e redução da SOD e da CAT no fígado. Em ratos, a ingestão fenvalerato durante 28 dias induziu redução da atividade da CAT no fígado (Prasanthi, K et al, 2005).

Sendo este estudo de exposição aguda e mesmo assim tendo sido verificados indicativos de comprometimento da função hepática, pode-se supor que se o tempo de exposição à deltametrina fosse aumentado (crônico) e os níveis séricos de lipídios plasmáticos fossem determinados, provavelmente também haveria aumento evidenciado dos lipídios séricos, pois o comprometimento hepático teria sido agravado.

Conclusões

Os resultados desse estudo mostram que a exposição aguda, por via oral, à deltametrina causou redução significativa da frequência cardíaca e aumento do intervalo RR, determinando a ocorrência de bradicardia. O aumento da duração do complexo QRS e redução da amplitude R indicam alterações na excitação e condução elétrica ventricular, decorrente do efeito tóxico por parte deste piretróide. A amplitude P não se mostrou alterada, o que permite concluir que não ocorreram alterações na excitação elétrica atrial. Nossos resultados eletrocardiográficos registraram, também, aumento progressivo do infradesnivelamento do segmento ST, entretanto, como a onda T mostrou-se positiva e sem alterações significativas na sua amplitude, em todos os grupos estudados, não podemos sugerir a possibilidade de a deltametrina ter induzido isquemia miocárdica. Já os intervalos QT e QTc não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados. Entretanto, o grupo DMT100 apresentou valores mais elevados em relação aos demais grupos. Mesmo assim, ficou descartado o risco de morte súbita. São necessários mais estudos para esclarecimento desta possibilidade.

Verificou-se que a exposição aguda à deltametrina, por via oral, causou estresse oxidativo no fígado e no coração. O fígado, quiçá por ser o local da biotransformação, apresentou maior quantidade de malondialdeído, produto da lipoperoxidação, bem como aumento da atividade da FA que nesse caso representa atividade celular voltada, preferencialmente, aos processos antioxidantes, já que houve aumento da atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST) e da concentração de glutathione reduzida (GSH), mesmo no grupo DMT 100. A GST mostra-se aumentada devido à intensa destoxificação do fígado na tentativa de biotransformar as moléculas de deltametrina em moléculas mais polares. Ainda no fígado, evidenciou-se redução da atividade das enzimas SOD e CAT, levando a crer que íons superóxidos acumularam-se nas células levando a uma rápida lipoperoxidação da membrana, o que explica o aumento do MDA dose-dependente.

Já, no coração, verificou-se que, apesar do evidente estresse oxidativo, níveis de MDA mostraram-se reduzidos. A atividade das enzimas, CAT e GSH, estavam aumentadas, o que provavelmente tenha contribuído com que a lipoperoxidação da membrana tenha sido controlada e por isso o MDA não tenha apresentado valores aumentados. A redução da atividade da GST mostra que, possivelmente, a ação indireta de proteção da GST, agregando-se a moléculas de piretróides pode ter influenciado na redução da atividade da mesma. A redução da SOD leva a crer que houve aumento de peróxido de hidrogênio intracelular.

Assim, além dos efeitos esperados da deltametrina sobre canais iônicos das membranas das células desses órgãos, é possível que as alterações eletrocardiográficas verificadas estejam relacionadas ao aumento do estresse oxidativo constatado neste estudo.

Referências Bibliográficas

- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. **Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure.** Biochim et Biophys Acta, v.1523, p.37-48, 2000.
- ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. **Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers.** Aquat Toxicol, v.73, p. 171-180, 2005.
- ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; HOLTH, T. F.; FÖRLIN, L. **Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site.** Mar Environ Res, v.66, p.271-277, 2008.
- AMES, B. M.; SHIGENA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging.** Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A., v.90, p.7915-7922, 1993.
- ANDRADE, A. J. M. ET AL. **Reproductive Effects of Deltamethrin on Male Offspring of Rats Exposed during Pregnancy and Lactation.** Regul Toxicol Pharmacol, v.36, p.310-317, 2002.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**, 2008, disponível no site www.anvisa.gov.br. Acessado em julho de 2009;
- BHASKAR, E. M., MOORTHY, S., GANESHWALA, G, ABRAHAM, G. **Cardiac conduction disturbance due to prallethrin (pyrethroid) poisoning.** J Med Toxicol, v.6, n.1, p. 27-30, 2010.
- BAGNYUKOVA, T. V.; VASYLKIV, O. Y.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V.I. **Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain.** Brain Res, v.1052, p.180-186, 2005.
- BANU, C.; ULKU Ç.; AYSE P. F.; FIGEN, K. **Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v.57, n.2, p.220-225, 2004.
- BARATA, C.; CALBET, A.; SAIZ, E., ORTIZ, L., BAYONA, J. M. **Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to**

- the copepod *Oithona davisae*.** Environmental Toxicology and Chemistry, v.24, p.2992-2999, 2005.
- BARJA , G. **Mitochondrial free radical generation: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relationship with aging rate.** J. Bioenerg. Biomembr, v.31, p.347-366, 1999.
- BARJA, G.; HERRERO , A. **Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain non-synaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon.** J Bioenerg Biomembr, v.30, p.235-243, 1998.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress,** J Biol Chem, v.272, p.20313-20316, 1997.
- BLEUTER, E.; ROBSON, M.J; BUTTERNWESER, E. **The glutathione instability of drug sensitive red ceclls.** J Lab Clin Med, v.49, p.84-95,1957.
- BLOOMQUIST, J. R. Insecticides: **Chemistries and Characteristics.** Disponível no site <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acessado em novembro de 2009.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. **Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical,** Arch Biochem Biophys, v.240, p.500–508, 1985.
- BONILHA, A. M. M.; SARAIVA R. M.; KANASHIRO, R. M.; PORTES, L. A.; ANTÔNIO, E. L.; TUCCI, P. J. F. **A routine eletrocardiogram should not be used to determine the size of myocardial infarction in the rat.** Braz J Med Biol Res, v.38, p.615-619, 2005.
- BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. **Poisoning due to pyrethroids.** Toxicol Rev, v.24, n.2, p.93-106, 2005.
- CHARGUI, I ; HAOUAS, Z.; ZAOUALI, M.; BEN, C. H. **Effects of dermal sub-chronic exposure of pubescent male rats to permethrin (PRMT) on the histological structures of genital tract, testosterone and lipoperoxidation.** Experimental and Toxicologic Pathology, 2010.
- COHEN, G; DEMBIEC, D; MARCUS, J. **Measurement of catalase activity in tissue extracts.** Anal Biochem, v.34, p.30-8, 1970.
- DAVIES, K. J. A. **Oxidative stress, the paradox of aerobic life.** Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives, p.1-31, 1995.

- DE LA CERDA, E.; NAVARRO-POLANCO, R. A; SÁNCHEZ-CHAPULA, J. A. **Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin.** Arch Med Res, v.33, p.448-454, 2002.
- DEAN, R. T. S.; FU, R. S.; DAVIES, M. J. **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** Biochem J, v.324, p.1-18, 1997.
- DEJONCKHEERE, W. **Permethrin and deltamethrin residues on lettuce.** Pestic Sci, v.13, p.351-356, 1982.
- DHINGRA R.; NAM, B. H.; BENJAMIN, E. J.; WANG, T. J.; LARSON, M. G.; D'AGOSTINO, R. B.; LEVY, D.; VASAN, R. S. **Cross-sectional relations of eletrocardiographic QRS duration to feft ventricular dimensions.** Journal of the American College of Cardiology, v.45, p.685-689, 2005.
- DRÖGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol Rev, v.82, p.47-95, 2003.
- DUIKAN, S. A.; FAREWELL, M.; BALLESTEROS, F.; TADDEI, M.; RADMAN T. N. **Protein oxidation in responses to increased transcriptional or translation errors.** Proc Natl Acad Sc, v.97, p.5746-5749, 2000.
- EL-DEMERDASH, F. M. **Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants.** Toxicology in Vitro, v.21, n.3, p.392-397, 2007.
- ERCAL, N. H.; GURER, O; AYKIN-BURNS, N. **Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage,** v.1, p.529-539, 2001.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of aging.** Nature, v.408, p.239–247, 2000.
- FRIDOVICH, L. **The biology of oxygen radicals,** v.201, p.875-880, 1978.
- GASSNER, B. A; WUTHRICH, G; SCHOLTYSIK, M. S. **The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I.** J Pharmacol, v.281, p.855-860, 1997.
- GIMA, K; RUDY, Y. **Ionic currente basis of eletrocardiography waveforms: A model study,** v.90, p.889-896, 2002.

- GIRAY, B.; GURBAY, A.; HINCAL, F. **Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol**, Toxicology Letters, v.118, p.139-146, 2001.
- GLOMOT, R.; CHEVALIER, B. **Acute toxicity study mouse and rat by oral route** WHO by Roussel Uclaf, 1976.
- GOTO S.; NAKAMURA, A. **Age-associated oxidatively modified proteins: a critical evaluation**, v.20, p.81-89, 1997.
- GUPTA, A.; NIGAM, D.; GUPTA, A.; SHUKLA, G. S.; AGARWAL, A. K. **Effects of pyrethroids based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats**. J Appl Toxicology, v.19, p.67-72, 1999.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Décima Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2002;
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. **Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation**. J Biol Chem, v.249, p.7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Terceira edição, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- HENKENS, I. R. **Early changes in rat hearts with development pulmonary arterial hypertension can be detected with 3-dimensional electrocardiography**. Am J Physiol Heart Search Physiol, v.293, n.2, p. H1300-1307, 2007.
- HORIA, V.; MARTIN, S.; WILLIAMSON, A. L.; DEVONSHIRE AND PETER, N.R. **The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels**. Pest Manag Sci, v.57, p.877-888, 2001.
- IMLAY, J. A.; LINN, S. **DNA damage and oxygen radical toxicity**, v. 240, p.1302-1309, 1988.
- JACKSON, A. L.; LOEB, L. A. **The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer**. Mutat Res v.477, p.7-21, 2001.
- KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. **Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible**

- involvement of reactive oxygen species.** J Nutr Environ Med, v.9, p.37-46, 1999.
- KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. **Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species.** Toxicol Lett, v.105, p.197-205, 1999.
- KAPPUS H.; SIES, H. **Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation.** Experientia, v.37, p.1233–1241, 1981.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. **Superoxide radical inhibits catalase.** J Biol Chem, v.257, p.5751-5754, 1982.
- LIU, H.; ZHAO, M. C.; ZHANG, M. Y.; LIU, W. **Enantio selective cytotoxicity of the insecticide bifenthrin on a human amnion epithelial (FL) cell line.** Toxicology, v.253, p.89-96, 2008.
- LIVINGSTONE, D. R. **Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms.** Mar Pollut Bull, v.42, p.656-666, 2001.
- LOMBARD, E. A. **Eletrocardiograms of Small Mammalis.** From the Department of Physiology, University of Wisconsin Medical School, Madison, Wisconsin, p.189-193, 1952.
- LUDOMIRSKY, A. **Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisonig.** Am J Cardiol, v.49, p.1654-1658, 1982.
- LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES, L. M. **Oxidative stress and antioxidant defenses in gold- sh Carassius auratus during anoxia and reoxygenation.** Am J Physiol, v.280, p.100-107, 2001.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. **Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish.** Comp Biochem Physiol B, v.44, p. 283-289, 2006.
- MAGDALAN, J.; ZAWADZKI, M.; MERWID, L. A. **Fatal intoxication with hydrocarbons in deltamethrin preparation.** Clinical Toxicology, v.28, n.12, p.791-3, 2009.

- MAITI, P. K.; KAR, A.; GUPTA, P.; CHAURASIA, S. S. **Loss of membrane integrity and inhibition of type –I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by fenvalerate in female mouse.** Biochem Biophys Res Commun, v.214, p.905-909, 1995.
- MANNA, S. **Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats.** J Vet Sci, v.7, n.2, p.133-136, 2004.
- MARTINS, M. J.; NEGRAO, M. R.; HIPOLITO, R. C. **Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated.** Clinical Biochemistry, v.34, p.463-468, 2001.
- MATÉS, J. M. **Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.** Toxicology, v.153, p.83-104, 2000.
- MATSUNAGA, T.; MAKITA, T. M.; HIGO, A.; NISHIBE, I.; DOHARA, K. S. G. **Studies on prallethrin, a new synthetic pyrethroid for indoor applications.** J Sanit Zool, v.38, p.219-223, 1987.
- MILL, J. G.; STEFANON, I.; LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V. **Changes in performace of the surviving myocardium after left ventricular Infarction in rats.** Cardiovascular Research, v.9, p.748-753, 1990.
- MOKHTAR, I.; YOUSEF, T. I.; EDRISS, H. M. **Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E.** Toxicology, v.227, p.240-247, 2006.
- MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S. O. **Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (Leporinus obtusidens).** Chemosphere, v.68, p.1597-1601, 2007.
- NATARAJANA, B. P.; MOLNARA, B. K.; SIEVERDESB, A.; HICKMANA, J. J. **Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity.** Nanoscience Technology Center, 2004.
- NORMANN, S. J.; PRIEST, R. E.; BENEDITT, E. P. **Eletrocardiogram in the normal rat an its alteration with experimental coronary occlusion.** Circulation Research, v.9, p.282-287, 1960.

- OLIVEIRA-SILVA, J. J. **Influência de Fatores Sócio-econômicos na Contaminação por Agrotóxicos.** Revista Brasileira de Saúde Pública, v.35, n.2, p.130-135, 2005.
- ORUC, E. O.; UNER, N. **Combined effects of 2,4 D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of Oreochromis niloticus.** Comp Biochem Physiol, v.127, p.291-296, 2000.
- PAULUHN, J. L.; MACHEMER, H. **Assessment of pyrethroid-induced paraesthesias: comparison of animal model and human data Original Research.** Article Toxicology Letters, v.96-97, p.361-368, 1998.
- PEIXOTO, F.; ALVES, F.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS, F. A. **Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia Oreochromis niloticus.** Pestic Biochem Physiol, v.85, p.91-96, 2006.
- PRASANTHI, K.; MURALIDHARA, R.; RAJINI, P.S. **Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to fenvalerate and its metabolite.** Toxicology in Vitro, v.19, p.449-456, 2005.
- RAY, D. E.; FORSHAW, P. J. **Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies and therapy.** Clinical Toxicology, v.38, p.95-101, 2000.
- RICHTER, C. **Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes,** Chem Phys Lipids, v. 44, p.175-189, 1987.
- ROSEN, M. R. **The Eletrocardiogram 100 Years Later – Electrical Insights Into Molecular Messages.** Circulation, v.106, p.2173-2179, 2002.
- SAMBHI, M.; WHITE, F. E. **The eletrocardiogram of the normal and hypertensive rat.** Circulation Research, v.7, p.129-134, 1959.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Pyrethroids: a review.** Alim Nutr Araraquara, v.18, n.3, p.339-349, 2007.
- SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. **Oxidative biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish *Channa punctatus*.** Bloch Ecotoxicol Environ Saf, v. 56, p.295-301, 2003.
- SHAFER, T. J; MEYER, D. A. **Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative**

- neurotoxicity**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.196, p.303-318, 2004.
- SHAN, G.; HAMMOCK, B. D. **Development fo sensitive assays based on a-cyanocontaining esters**. *Anal Biochem*, v.299, p.54-62, 2001.
- SHUKLA, Y.; TANEJA, P. **Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay**. *Mutat Res*, v.467, n.2, p.119-127, 2000.
- SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. *Exp Physiol*, v.82, p.291-295, 1997.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. **Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment**. *Toxicology*, v.171, p.3-59, 2002.
- SOHAL, S. R.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. **Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis**. *Free Radicals Biol Med*, v.33, p.575-586, 2002.
- SOSNOWSKI M.; KORZENIOWSKA, B.; TENDERA, M. **Left ventricular mass and hypertrophy assessment by means of the QRS complex voltage-independent measurements**. *International Journal of Cardiology*, v.106, p.382-389, 2005.
- SPENCER, C. I.; YUILL, K. H.; BORG, J. J.; HANCOX, J. C.; KOZLOWSKI, R.Z. **Actions of Pyrethroid Insecticides on Sodium Currents, Action Potentials, and Contractile Rhythm in Isolated Mammalian Ventricular Myocytes and Perfused Hearts**. *J Pharmacol Exp Ther*, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.
- STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S. **Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease**. Plenum Press, p.657-675, 1999.
- TRENZADO, C.; HIDALGO, M. C.; GARCÍA-GALLEGO, M.; MORALES, A. E.; FURNÉ, M.; DOMEZAIN, A.; DOMEZAIN, J.; SANZ, A. **Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccari* and trout *Oncorhynchus mykiss***. *Aquaculture*, v.254, p.758-767, 2006.
- TURRENS, J. F. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species**. *J Physiol*, v.552, p.335-344, 2003.

- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thibarbituric acid test.** Anal Biochem, v.86, p.271-278, 1978.
- UNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. **Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of Oreochromis niloticus.** Environ Toxicol Pharm, v.20, p.99-106, 2005.
- WHO- World Helth Organization. Disponível no site <http://www.pyrethroids.com/who.asp>. Acessado em novembro de 2008.
- WINTERBOURN, E.; HAWKINS, M; BRAIN, W.; CARRELL, J. **Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system.** Lab Clin Med, v.85 p.337, 1975.
- WOLFF, S. P.; DEAN, R. T. **Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis.** Biochemistry, v.234 , p.399-403, 1986.
- YU, S. J.; NGUYEN, S. N. **Insecticide susceptibility and detoxication enzyme activities in permethrin-selected diamondback moths.** Pestic Biochem Physiol, v.56, p.69-77, 1996.
- ZEYMER, U; SCHRODER, K; WEGSCHEIDER, K; SENEGES, J; NEUHAUS, K L; SHRODER, R. **ST resolution in a single eletrocardiographic lead: A simple and accurate predictor of cardiac mortality in patients with fibrinolytic therapy for acute ST-elevation myocardial infarction.** Am Heart J, v.149, p.91-97, 2005.
- ZHANG, J. F.; LIU, H.; SUN, Y. Y.; WANG, X. R.; WU, J. C.; XUE, Y. Q. **Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish Carassius auratus exposed to 2,4- dichlorophenol.** Environ Toxicol Pharm, v.19, p.185-190, 2005.

Conclusões Gerais

Os resultados deste estudo mostraram que a deltametrina é tóxica ao coração, interferindo na excitação e condução elétrica cardíaca e causando estresse oxidativo tanto no coração quanto no fígado.

Quanto aos dados eletrocardiográficos, a alteração significativa da amplitude R, e as alterações não significativas, porém, sugestivas da FC, intervalo RR, segmento ST, segmento T e amplitude P, indicam que seus efeitos podem interferir no aumento da duração da despolarização ventricular e a ocorrência de um infradesnivelamento do ápice ventricular, sugerindo isquemia cardíaca. Esses efeitos podem ser explicados, devido a deltametrina (piretróide do tipo II), causar um influxo mais demorado de sódio para o interior do miócito ventricular o que, em um estudo crônico, poderia efetivar a isquemia cardíaca. Tal consequência também pode ser associada a possível interferência da deltametrina na abertura dos canais de cálcio/sódio, ocorrendo um aumento do influxo de cálcio para o interior das células musculares cardíacas, aumentando o tempo de contração ventricular. Neste estudo, os resultados refutam a idéia de risco de morte súbita e de arritmias, provavelmente pelo tempo de exposição ser curto.

A ação da deltametrina no SNC pode estar influenciando os efeitos observados no eletrocardiograma, sabendo-se que este piretróide é um potente estimulador do sistema nervoso simpático e que o mesmo interfere diretamente no potencial de ação cardíaco e, por consequência, na despolarização e repolarização atrial e ventricular. Este trabalho reforça a tese de que, além dos efeitos tóxicos cardiovasculares sistêmicos observados, também se pode supor que estes efeitos sejam locais, ou seja, que o influxo de cálcio e sódio aconteça também nas células cardíacas, tal como acontecem nas células nervosas.

Os dados não deixam dúvidas sobre o fato de a deltametrina causar estresse oxidativo no coração e no fígado. Resta saber se o estresse oxidativo causa alteração direta sobre os canais iônicos do coração ou se a deltametrina causa seu efeito somente de forma direta, alterando os canais iônicos, repercutindo em desequilíbrio oxidativo. Não é descartado que os dois tipos de efeitos ocorram simultaneamente.

Este estudo constatou alterações no sistema de condução e excitação cardíaca e evidenciou estresse oxidativo no fígado e no coração, mostrando que a biotransformação da deltametrina no fígado foi intensificada pelo sistema enzimático antioxidante. Ainda assim, por se tratar de um potente piretróide, a exposição, mesmo sendo aguda, causou danos aos miócitos, o que também poderia explicar as alterações eletrofisiológicas verificadas.

ANEXO



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2119-1**, sobre "**Avaliação cardiovascular e de estresse oxidativo sobre o efeito tóxico oral agudo do agrotóxico deltametrina em ratos Wistar adultos machos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes / Raquel Apratto Maciel**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **03 de maio de 2010**.

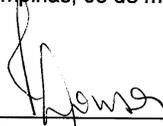
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2119-1**, entitled "**Cardiovascular evaluation and oxidative stress on oral acute toxic effects of the pesticide deltamethrin in adult male Wistar rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 3, 2010**.

Campinas, 03 de maio de 2010.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>