

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 01/03/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Alexandre Vidotto Barboza Lima

**Influência da temperatura nas respostas aos biocidas diazinon e
carbaril em *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861.**

São José do Rio Preto - SP
2016

Alexandre Vidotto Barboza Lima

Influência da temperatura nas respostas aos biocidas diazinon e carbaril em *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto - SP

2016

Lima, Alexandre Vidotto Barboza.

Influência da temperatura nas respostas aos biocidas diazinon e carbaril em *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861. / Alexandre Vidotto Barboza Lima. -- São José do Rio Preto, 2016.

86 f. : il.

Orientador: Lilian Castiglioni

Coorientador: Eduardo Alves de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Toxicologia ambiental. 2. Caranguejo – Efeito da temperatura. 3. Stress oxidativo. 4. Diazinon. 5. Carbaril. 6. Aquecimento Global I. Castiglioni, Lilian. II. Almeida, Eduardo Alves de. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Alexandre Vidotto Barboza Lima

**Influência da temperatura nas respostas aos biocidas diazinon e
carbaril em *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao
Programa de Pós-Graduação em Genética, do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Castiglioni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Campos
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Francine Perri Venturini
UNESP – Rio Claro

Profa. Dra. Neide Aparecida Blaz
UNIRP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto – SP
01 de março de 2016

Este trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, São José do Rio Preto – SP, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº 479123/2013-6).

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos que sempre acreditaram em mim, até mais do que eu mesmo.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus** pelas experiências do passado, pela satisfação de desfrutar o presente e pela expectativa do futuro, que só Ele sabe o que me aguarda. E por ter colocado no meu caminho pessoas que, sem sombra de dúvida, me fizeram um ser humano melhor.*

*Á minha mãe **Maria Donizeti “Tutú”** e á minha irmã **Mariana** por todo amor, carinho, paciência, motivação, compreensão, apoio, abraços, beijos, puxões de orelha...etc., sem vocês eu nunca teria chegado até aqui, obrigado por estarem sempre ao meu lado. Agradeço também ao meu pai **Wladimir** que mesmo depois de onze anos sem nos falarmos me recebeu de braços abertos, sem perguntas, sem julgamentos, sem explicações, obrigado por me ensinar como deixar o passado para trás.*

*Á minha namorada e companheira **Beatris Venancio “Bia”** por ter me permitido entrar em sua vida e compartilhar momentos, amigos e família, por me aceitar incondicionalmente, mesmo com minha personalidade por vezes insana e confusa. Obrigado por todo o apoio, amor, carinho, compreensão e por sempre despertar o que há de melhor em mim.*

*Á minha orientadora **Profa. Dra. Lilian Castiglioni**, por ter me aberto as portas da ciência, me ensinado como ser profissional na academia e como conduzir minha pesquisa com responsabilidade. Obrigado por todo apoio, orientação, motivação, preocupação e “conselhos de mãe” desde os tempos de graduação. Obrigado pela amizade que com certeza levarei pelo resto de minha vida.*

*Ao meu coorientador **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida** por ter me aberto as portas do laboratório, pela prontidão em esclarecer dúvidas e por me apresentar o fascinante mundo da bioquímica e da toxicologia. Obrigado por compartilhar seu vasto conhecimento, sua paixão pela profissão e pela ciência, por todo apoio e pela amizade que também levarei por toda minha vida.*

*Ao **Prof. Dr. Fabiano Gazzí Taddei**, por ter me apresentado a carcinologia e me despertado grande interesse pelos crustáceos. Obrigado pela amizade, pelas dicas de*

coleta, identificação de espécies, sexagem, pelos “conselhos de biólogo” e pelos momentos de descontração.

*Aos amigos, as quais considero meus irmãos mais velhos na ciência, que outrora eram Tiago e “Kexu” e hoje são **Prof. Dr. Tiago Lucena da Silva** e **Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva**. Obrigado por ajudarem nos meus primeiros passos como aluno de Pós-Graduação, nos primeiros relatórios, pelas dicas na descabelante estatística, ajuda em coletas, piadas e pelos momentos de descontração de impagáveis risadas acompanhados do bom e gelado tereré.*

*Aos docentes **Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio**, **Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez**, **Prof. Dr. Marcelo Campos**, **Prof. Dr. Luis Octávio Regasini**, **Profa. Dra. Francine Perri Venturini** e **Profa. Dra. Neide Aparecida Blaz**, por gentilmente terem composto minha banca de qualificação e defesa, mas principalmente pelas sugestões que enriqueceram substancialmente o trabalho.*

*A toda equipe do **LHGDH** (Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas) e do **CEQ** (Centro de Estudo de Quelônios) pela amizade, pelos cafezinhos “roubados”, almoços e churrascos que compartilhamos.*

*A toda equipe do **LABCA** (Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática) por toda ajuda com a minha pesquisa, pela troca de conhecimento e experiências e pela convivência sempre agradável. Obrigado pela amizade de todos que desde 2010 tornaram meus dias de trabalho mais produtivos e divertidos, aprendi muito com todos vocês.*

*Aos companheiros de estrada **Maikon**, **Ruy**, **Luiz Fellipe**, “**Felipinho**”, **Amanda** e **Ronaldo** por tantos quilômetros percorridos em busca de montanhas e cachoeiras a qual pudemos celebrar a vida e a amizade em meio a natureza. “A vida é rasta!”.*

*Aos sempre amigos de infância **Diego**, **Jéssika**, **Léo**, **Gustavo**, **Maicon**, **Mauricio**, **Mayara**, **Jefferson**, **Tiago Carlos**, **Thiago Rodrigues**, **Thais**, **Eder**, **Guilherme Basaglia**, **Guilherme dos santos** e **Lucinho**. Apesar de hoje nos vermos pouco somos como uma grande família de seres noturnos. Obrigado por compartilharem comigo tantas histórias.*

Aos companheiros de república Igor “Hellboy”, “Gui” e Almir por tantas risadas, jantares, filmes, conversas e cervejas compartilhadas. Obrigado por todo apoio e amizade.

Á CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo auxílio a pesquisa que viabilizaram a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética da UNESP de São José do Rio Preto pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelas orientações burocráticas e pelos apoios financeiros.

Por fim agradeço a todos os professores da UNIRP que participaram da minha formação como biólogo e a todos os professores da UNESP que participaram da minha formação como geneticista.

*“Melhor que mil dias de estudo diligente
é um dia com um grande mestre”
(Provérbio Japonês)*

RESUMO

As mudanças climáticas globais têm recebido destaque na área da toxicologia aquática em função dos efeitos que as alterações na temperatura da água podem exercer nas respostas dos organismos aquáticos aos contaminantes ambientais. A temperatura corpórea dos organismos ectotérmicos, como os crustáceos, é totalmente dependente da temperatura do ambiente, de modo que aumentos na temperatura afetam diretamente o metabolismo desses animais, acelerando as reações bioquímicas e a absorção de muitos contaminantes aquáticos no organismo. Neste trabalho foi investigado a influência de três faixas de temperatura (18, 23 e 28 °C) na toxicidade dos biocidas diazinon (organofosforado) e carbaril (carbamato) nas brânquias e no hepatopâncreas de machos e fêmeas do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*, utilizando como parâmetros analíticos as enzimas antioxidantes glutatona *S*-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glicose 6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), níveis de peroxidação lipídica por meio da formação do malondialdeído (MDA) e os efeitos clássicos de inibição das esterases acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE). As atividades enzimáticas foram analisadas por espectrofotometria e os níveis de peroxidação lipídica por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A exposição de fêmeas de *D. pagei* ao diazinon por sete dias, levou à diminuição na atividade da GPx na concentração de 10 e 100 µg L⁻¹ a 23°C, enquanto que nas brânquias foi observado diminuição da GST apenas na concentração de 10 µg L⁻¹ em 23 °C. Quanto aos machos, os resultados apresentaram diminuição da GST na concentração de 100 µg L⁻¹ tanto em 18 °C quanto em 28 °C. Também foi observado diminuição na atividade da GR na maior concentração (100 µg L⁻¹) em 18 °C no hepatopâncreas deste mesmo sexo. Nas brânquias, este grupo apresentou diminuição da GPx em 18 °C na concentração de 100µg L⁻¹ e aumento da GR na concentração de 10µg L⁻¹ em 28 °C. Ao analisar a resposta apresentada pela G6PDH observou-se diminuição na atividade desta enzima na concentração de 100 µg L⁻¹ em 18 e 23 °C no hepatopâncreas de machos expostos ao diazinon. Por outro lado, as fêmeas apresentaram aumento na maior concentração em 23 °C. No que diz respeito às brânquias de indivíduos expostos ao diazinon, pode-se observar diminuição na atividade da G6PDH em fêmeas na concentração de 100 µg L⁻¹ a 28 °C. Por outro lado, observa-se aumento em sua atividade na maior concentração (100 µg L⁻¹) a 23 °C. Machos não apresentaram alterações significantes da G6PDH nas brânquias. Quanto aos níveis de peroxidação lipídica, foi observado aumento apenas no hepatopâncreas de indivíduos expostos a este biocida a 23 °C, tanto nos machos quanto fêmeas apresentaram aumento nos níveis de MDA em 10 µg L⁻¹ e apenas machos apresentaram aumento em 100 µg L⁻¹. Em brânquias não foram observadas alterações significantes. Após exposição por sete dias ao diazinon pôde-se observar inibição da atividade da AChE em brânquias de machos expostos a 10 e 100 µg L⁻¹ deste composto a 18 e 28 °C. No hepatopâncreas não foram observadas inibições significantes quanto a ação do composto. A CbE apresentou inibição em sua atividade no hepatopâncreas de machos nas concentrações de 10µg L⁻¹ em 18 °C e em ambas as concentrações em 23 e 28 °C. No que diz respeito às brânquias, houve inibição da CbE apenas em fêmeas expostas a 100µg L⁻¹ do diazinon a 18 °C. Quanto às respostas antioxidantes ao carbaril, em fêmeas foi observado aumento na atividade da GST na concentração de 100 µg L⁻¹ a 18 °C no hepatopâncreas. Nessa mesma temperatura, foi observado aumento na atividade da GR na concentração de 10 µg L⁻¹ e da GPx em 100 µg L⁻¹. Por outro lado, nas brânquias foi observado aumento apenas na atividade da GR na concentração de 10 µg L⁻¹ a 18 °C. Os machos expostos ao carbaril apresentaram aumento apenas da GST na concentração de 100 µg L⁻¹ a 28 °C no

hepatopâncreas. As brânquias de organismos expostos ao carbaril não apresentaram respostas significantes para as enzimas antioxidantes testadas. Quanto a G6PDH, houve aumento significativo dessa enzima apenas na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 18 °C em brânquias de fêmeas. No hepatopâncreas, houve diminuição nos níveis de MDA em machos expostos ao carbaril na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 18 °C e nas duas concentrações (10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) a 23 °C, ao passo que em fêmeas, neste órgão, foi observado aumento nos níveis de MDA apenas em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 23 °C. No que diz respeito às brânquias, apenas fêmeas apresentaram aumento nos níveis de MDA na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 18 e 28 °C. Após exposição de machos e fêmeas de *D. pagei* por sete dias ao carbaril pôde-se observar inibição da atividade da AChE e da CbE no hepatopâncreas apenas de fêmeas na maior concentração a 18 °C. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que: Entre os biocidas testados, o carbaril se mostrou mais tóxico para fêmeas de *D. pagei*, uma vez que aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observados com maior frequência nesse gênero. Além disso, as brânquias deste sexo demonstraram maior sensibilidade à ação do carbaril em relação ao hepatopâncreas e a combinação deste biocida a extremos de temperatura (18 e 28 °C) são mais prejudiciais a este sexo, pois aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observadas com maior frequência nas brânquias nessas duas temperaturas. Nos machos a combinação entre o diazinon e a temperatura intermediária (23 °C) foi mais prejudicial no hepatopâncreas, uma vez que aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observadas com maior frequência nesse órgão. Além disso, o aumento da temperatura aumentou a toxicidade do diazinon a CbE no hepatopâncreas de machos. Além do mais, a sensibilidade das brânquias de machos ao diazinon é maior em extremos de temperatura (18 e 28 °C). A temperatura influenciou tanto a atividade enzimática quanto a toxicidade dos biocidas diazinon e carbaril em *D. pagei*, uma vez que todas as enzimas testadas e os níveis de peroxidação lipídica apresentaram alterações relacionadas ao aumento da temperatura e a ação dos biocidas foi diferente nas três temperaturas testadas. Por fim, a espécie *D. pagei* demonstrou grande eficiência como organismo teste para a avaliação da presença de biocidas OP e CM em ambientes sob estresse térmico.

Palavras chave: Caranguejo dulcícola, organofosforado, carbamato, estresse oxidativo, inibição esterásica, aquecimento global.

ABSTRACT

Global climate change has been highlighted in the field of aquatic toxicology due to the effects that changes in water temperature can perform on the responses of aquatic organisms to environmental contaminants. The body temperature of ectothermic organisms, such as crustaceans, is totally dependent on the environment temperature, so that increases in temperature directly affect the metabolism of these animals, accelerating the biochemical reactions and the intake of many water contaminants. In this study, we investigated the influence of three temperature ranges (18, 23 and 28°C) on toxicity of biocides diazinon (organophosphate) and carbaryl (carbamate) in the gills and hepatopancreas of males and females of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei*. Through the analytical parameters of the antioxidant enzymes glutathione *S*-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), levels of lipid peroxidation through the formation of malondialdehyde (MDA) and the classical inhibition of the esterases acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE). We measured the enzyme activities by spectrophotometry and the levels of lipid peroxidation by high performance liquid chromatography (HPLC). The exposure of *D. pagei* females to diazinon for seven days resulted in decrease in GPx activity in 10 and 100 µg/L of concentration at 23°C. In the gills, we observed reduction of GST only in the concentration of 10 µg/L at 23°C. In males, the results showed decrease in GST activity in the concentration of 100 µg/L at both temperatures (18 and 28°C). We also observed decrease in GR activity at the highest concentration (100 µg/L) at 18°C in the hepatopancreas of this gender. In the gills, this group showed decrease in GPx at 18°C in a concentration of 100 µg/L and GR increased in 10 µg/L of concentration at 28°C. According to G6PDH response, we observed decrease at a concentration of 100 µg/L on 18 and 23°C in the hepatopancreas of males exposed to diazinon. On the other hand, females showed increase in the highest concentration at 23°C. With regard to the gills of individuals exposed to diazinon, we observed decrease of G6PDH activity in females at the concentration of 100 µg/L at 28°C. On the other hand, we observed increase in this enzyme activity at the highest concentration (100 µg/L) at 23°C. Males showed no significant changes of G6PDH in the gills. The levels of lipid peroxidation increased only in hepatopancreas of individuals exposed to this biocide to 23°C, where both males and females showed increase in MDA levels in 10 µg/L and only males showed increase in 100 µg/L. In the gills no significant changes were observed. After exposure of seven days to diazinon we observed AChE inhibition in gills of males exposed to 10 and 100 µg/L of this chemical at 18 and 28°C. In hepatopancreas no significant inhibition were observed. CbE showed inhibition in the hepatopancreas of males in the concentration of 10 µg/L at 18°C and in both concentrations at 23 and 28°C. With regard to the gills, there was inhibition of CbE only in females exposed to 100 µg/L of diazinon at 18°C. Concerning to the antioxidant response to carbaryl in females we observed increase in GST activity in a concentration of 100 µg/L at 18°C in the hepatopancreas. In this same temperature, there was increase in GR activity at a concentration of 10 µg/L and GPx in 100 µg/L. On the other hand, we observed increase in GR activity only in the gills in the concentration of 10 µg/L at 18°C. The males exposed to carbaryl showed increase of GST in 100 µg/L at 28°C in the hepatopancreas. The gills of organisms exposed to carbaryl showed no significant responses to the tested antioxidant enzymes. With regard to the G6PDH, we observed a significant increase in the concentration of 10 µg/L at 18°C only in females gills. The levels of MDA decreased in the hepatopancreas of males exposed to carbaryl in a

concentration of 10 µg/L at 18°C and in both concentrations (10 µg/L and 100 µg/L) at 23°C. In females, we observed increase in MDA levels only in 100 µg/L at 23°C. In the gills, only females showed increase in MDA levels at the concentration of 100 µg/L at 18 and 28°C. After exposure of *D. pagei* males and females for seven days to carbaryl we observed inhibition of AChE and CbE only in hepatopancreas of females in the highest concentration to 18°C. According to the results, we can conclude that: Among the tested biocides, carbaryl was more toxic to females as increases in lipid peroxidation levels were observed more frequently in this gender. Moreover, females gills showed greater sensitivity to carbaryl compared to the hepatopancreas and the combination of this biocide to extremes of temperature (18 and 28°C) are more detrimental to this gender as increases in lipid peroxidation levels were observed more often in the gills at these two temperatures. In males, the combination of diazinon and the intermediate temperature (23°C) was more damaging in the hepatopancreas, as increases in lipid peroxidation levels were observed more frequently in this organ. Furthermore, the increase in temperature increased the toxicity of diazinon to CbE in the hepatopancreas of males. Moreover, the sensitivity of the male gills to diazinon is higher in extreme temperatures (18 and 28°C). The temperature influences both the enzymatic activity and the toxicity of biocides diazinon and carbaryl in *D. pagei*, since all the tested enzymes and lipid peroxidation levels showed changes related to increase in the temperature and the action of biocides was different at the three temperatures tested. Finally, the species *D. pagei* demonstrated great effectiveness as a test organism for evaluating the presence of OP and CM biocides in environments under heat stress.

Keywords: Freshwater crab, organophosphate, carbamate, oxidative stress, esterase inhibition, global warming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Dilocarcinus pagei</i> em vista dorsal (A). Macho em vista ventral (B). Fêmea em vista ventral (C)	23
Figura 2. Morfologia geral interna de <i>Brachyura</i>	24
Figura 3. Mapa indicando o local de coleta (A) e foto da região não urbanizada da represa Barra Mansa (B).....	31
Figura 4. Diagrama mostrando o sistema de manutenção da temperatura da água utilizado em 18 e 23°C, com refrigeradores externos (A) e 28°C, com termostatos aquecedores e refrigeradores externos para evitar variações maiores que 0,5°C (B).	32
Figura 5. Diagrama mostrando a configuração dos experimentos de exposição acoplados ao sistema de manutenção da temperatura da água utilizado em 18 e 23°C (A) e 28°C (B).	34
Figura 6. Atividades das enzimas GST, GR e GPx em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao diazinon.	41
Figura 7. Atividade da enzima G6PDH em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao diazinon.	44
Figura 8. Níveis de MDA no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao diazinon. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle (P<0,05).....	46
Figura 9. Atividades das enzimas GST, GR e GPx em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao carbaril.....	48
Figura 10. Atividade da enzima G6PDH em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao carbaril.....	50
Figura 11. Níveis de MDA no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao carbaril.....	52
Figura 12. Atividade da AChE e CbE no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao diazinon	64
Figura 13. Atividades da AChE e CbE no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de <i>D. pagei</i> após exposição por sete dias ao carbaril.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – microgramas

AChE - acetilcolinesterase

BHT - butilhidroxitolueno

CbE - carboxilesterase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CM - carbamato

CYP - citocromo P450

DTNB - ditionitrobenzeno

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

et al. - e outros

G6P - glicose-6-fosfato

G6PDH – glicose-6-fosfato-desidrogenase

GPx - glutationa peroxidase

GR - glutationa redutase

GS- – glutationa sulfeto

GSH - glutationa reduzida

GSSG - glutationa dissulfeto (oxidada)

GST - glutationa S-transferase

HPLC - cromatografia líquida de alta performance (sigla em inglês)

HSP - proteína de choque térmico (sigla em inglês - *Heat shock protein*)

IPCC - Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (Sigla em inglês)

MDA - malondialdeído

mM - mili molar

NADP⁺ - forma oxidada do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

OP - organofosforado

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

SDS - dodecil sulfato de sódio

SREX - Relatório Especial sobre Gestão dos Riscos de Extremos Climáticos e Desastres
(Sigla em inglês)

TBA - ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (sigla em inglês)

tBOOH – hidroperóxido de *t*-butila

TNB - ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico

Tris - (hidroximetil)aminometano

TrxR - tioredoxina redutase

U/mg - unidade de enzima* por miligrama

UV ultravioleta

μL – microlitro

* 1 U de enzima é a quantidade de enzima necessária para consumir 1 mmol de substrato por minuto, ou formar 1 mmol de produto por minuto.

Sumário

1. Introdução.....	20
1.1. Contaminação aquática e a utilização de organismos modelo.....	20
1.2. O aumento da temperatura e sua influência na fisiologia de organismos aquáticos ectotérmicos.....	20
1.3. A espécie <i>Dilocarcinus pagei</i>	22
1.3.1. O papel fisiológico do hepatopâncreas e das brânquias em crustáceos....	23
1.4. Os biocidas diazinon e carbaril.....	24
1.5. A biotransformação de xenobióticos e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	25
1.6. Estresse oxidativo e a peroxidação lipídica.....	27
1.7. Inibição da acetilcolinesterase e carboxilesterase por biocidas organofosforados e carbamatos.....	28
2. Objetivos Gerais.....	30
3. Materiais e métodos.....	31
3.1. Obtenção das amostras.....	31
3.2. Manutenção dos espécimes nas diferentes temperaturas.....	32
3.3. Experimentos de exposição dos caranguejos aos biocidas sob diferentes temperaturas.....	33
3.4. Processamento das amostras.....	35
3.5. Atividade das enzimas antioxidantes.....	35
3.6. Análise dos níveis de peroxidação lipídica.....	36
3.7. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase.....	37
3.8. Quantificação de proteínas totais.....	38
3.9. Análise estatística dos dados.....	38
Capítulo I.....	39
4. Objetivos.....	39
5. Resultados.....	39
5.1. Atividade das enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica após exposição aos biocidas diazinon e carbaril.....	39
5.1.1. Diazinon.....	40
5.1.2. Carbaril.....	47
6. Discussão.....	53

6.1. Atividade das enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica pós exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.	53
6.1.1. Diazinon	53
6.1.2. Carbaril	58
Capítulo II.....	62
7. Objetivos	62
8. Resultados	62
8.1. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.	62
8.1.1. Diazinon	62
8.1.2. Carbaril	65
9. Discussão.....	67
9.1. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.	67
9.1.1. Diazinon	67
9.1.2. Carbaril	71
10. Conclusões.....	74
11. Referências Bibliográficas.....	75

1. Introdução

1.1. Contaminação aquática e a utilização de organismos modelo

Nas últimas décadas, a contaminação ambiental passou a ser um assunto de grande importância política e social, pois grandes catástrofes ambientais vêm sendo relatadas em todo o mundo, principalmente relacionadas a resíduos industriais e agrícolas. O descarte inapropriado de compostos potencialmente tóxicos, o escoamento superficial a partir de áreas onde ocorrem aplicações regulares de agroquímicos e a dificuldade de neutralização de tais substâncias após sua aplicação permite que estas alcancem ambientes aquáticos, podendo causar grandes prejuízos aos organismos que habitam estes ambientes (TOMITA; BEYRUTH, 2005).

O estudo das alterações biológicas em espécies que habitam áreas com suspeita de contaminação tem demonstrado de forma eficiente os efeitos tóxicos da exposição a poluentes presentes no ambiente, dessa forma, são excelentes metodologias para o monitoramento de regiões potencialmente poluídas, permitindo ações prévias que visam evitar grandes danos ambientais (WALKER et al., 1996; SCHLENK, 1999). Estes estudos incluem qualquer medida que possa refletir a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, seja ele químico, físico ou biológico (AZEVEDO; CHASIN, 2003). A resposta a mudanças causadas no ambiente, tanto de origem antrópica quanto natural, pode ser evidenciada em qualquer nível de organização biológica, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares, como por exemplo organelas, ou ainda alterações no DNA e reações bioquímicas intracelulares (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

De acordo com Stegeman et al. (1994) e Darrigran (2002), além das respostas biológicas, deve-se levar em conta alguns fatores abióticos que direta ou indiretamente influenciam nas respostas apresentadas por tais organismos, como pH, salinidade e temperatura. Esta última é reconhecida pela capacidade de alterar o metabolismo dos organismos ectotérmicos, sendo responsável por alterações na atividade de algumas vias metabólicas (POWELL; WATTS, 2006; GONZALEZ, et al., 2010).

1.2. O aumento da temperatura e sua influência na fisiologia de organismos aquáticos ectotérmicos.

Vários fatores podem influenciar na temperatura da água, como: variações durante as estações do ano, incidência luminosa, períodos chuvosos e secos que alteram a profundidade dos ambientes de água doce e o aquecimento global. Vale a pena destacar que as projeções acerca do aumento da temperatura média para América do Sul causado pelo aquecimento global e os prejuízos ambientais que tal evento pode trazer para esta região se concentram, em sua maioria, em ambientes terrestres e marinhos, uma vez que informações sobre ambientes dulcícolas ainda são escassas (MOLION, 2006; MAGRIN et al., 2014).

Segundo as projeções do último relatório publicado pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), na América do Sul, a mediana anual da temperatura atmosférica dentro dos continentes pode sofrer aumento de até 4 °C, sendo que as águas continentais podem aumentar 2,5 °C em sua média anual até o final do nosso século (MAGRIN et al., 2014). Por outro lado, de acordo com o Relatório Especial sobre Gestão dos Riscos de Extremos Climáticos e Desastres (SREX) publicado pelo IPCC, as projeções podem extrapolar a intensidade do aumento médio de 2,5°C na temperatura anual da água previstos para a América Latina em eventos de aquecimento catastrófico, devido à instabilidade e imprevisibilidade das variáveis climáticas (SENEVIRATNE et al., 2012). Além disso, segundo este mesmo relatório, há uma grande escassez de informações sobre as consequências desse aumento na América do Sul, o que impossibilita projeções mais bem definidas (SENEVIRATNE et al., 2012).

Além do mais, o aumento na temperatura da água pode trazer prejuízos á fisiologia e ao ciclo de vida de organismos aquáticos por conta de alterações nas propriedades fisicoquímicas da água, como a diminuição na solubilidade de O₂, por exemplo, alterações em vias metabólicas e na expressão gênica, além de prejuízos reprodutivos pela interrupção nos períodos de acasalamento e desova (FICKE et al., 2007; MAGRIN et al., 2014).

Uma vez que modificações abióticas e possíveis alterações na qualidade da água podem causar estresse biológico e trazer consequências fisiológicas para os organismos que a habitam, o conhecimento da biologia desses animais e das possíveis adaptações dos mesmos a essas alterações torna-se importante no cenário mundial atual, especialmente considerando o aumento na temperatura da água para espécies tropicais, onde a sazonalidade térmica é pouco definida (KWOK et al., 2007; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2007; TRÍDICO et al., 2010).

A literatura científica reconhece que desvios na temperatura da água ambiental podem afetar de forma estressante os organismos que a habitam e alterar diretamente a

fisiologia e o metabolismo dos mesmos. Alterações na atividade de enzimas, como aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE), por exemplo, assim como alterações na concentração de macromoléculas de estoque energético (triglicerídeos e glicogênio) relacionadas a variações na temperatura, demonstram a sensibilidade de organismos aquáticos a variações térmicas, porém ainda pouco se conhece a respeito das respostas a tais variações abióticas no sistema enzimático antioxidante de crustáceos de água doce (MAAZOUZI et al., 2011).

1.3. A espécie *Dilocarcinus pagei*

Os crustáceos compreendem um grupo taxonômico altamente distribuídos pelos ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres de todo o mundo. Dentro deste grande grupo, a infra-ordem Brachyura, popularmente denominados caranguejos verdadeiros, são os decápodos que apresentam a mais alta especialização morfológica e, julgando pela riqueza de espécies (± 4.500), são considerados os crustáceos de maior sucesso evolutivo pela irradiação adaptativa que sofreram (BARNES; RUPER, 2005). A família Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 é composta por caranguejos exclusivamente neotropicais e se distribuem pela América do Sul e Central, tipicamente em rios de planície (MAGALHÃES, 1991; MAGALHÃES et al., 2005).

Dentro desta família, a espécie *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Figura 1A), destaca-se como um importante integrante de muitas cadeias tróficas, possuem alta tolerância a variações ambientais como disponibilidade de oxigênio, longos períodos de exposição ao ar e variações na temperatura (MELO, 2003; TADDEI; HERRERA, 2010). Apresentam dimorfismo sexual bem definido onde machos apresentam abdômen triangular e pouco desenvolvido (Figura 1B), ao passo que as fêmeas apresentam e abdômen arredondado e bem desenvolvido (Figura 1C) (MELO, 2003).

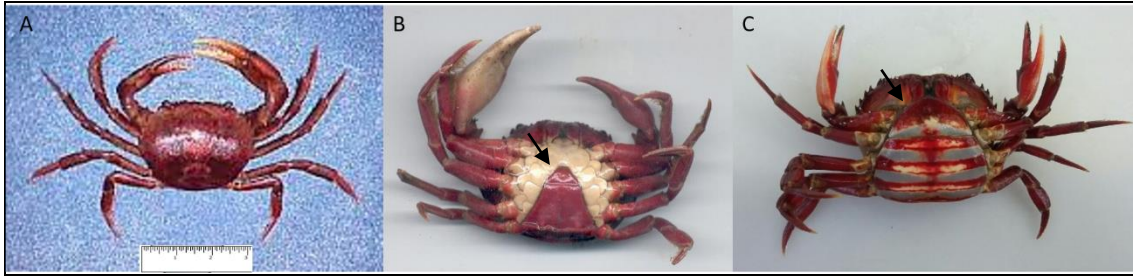


Figura 1. *Dilocarcinus pagei* em vista dorsal (A) (modificado de TADDEI et al., 1999). Macho em vista ventral (B). Fêmea em vista ventral (C).

Além disso, diferenças na expressão de algumas enzimas, como esterases e CYPs, entre machos e fêmeas de camarões sugerem algumas especializações fisiológicas provavelmente ligados a processos reprodutivos (LIMA et al., 2013), contudo muito pouco se conhece a respeito das diferenças fisiológicas e metabólicas entre os sexos em crustáceos.

Por conta de sua importante atuação ecológica, alta tolerância a variações ambientais e sensibilidade a contaminantes, várias espécies de crustáceos vêm sendo utilizados como organismos modelo na identificação de respostas toxicológicas a poluentes (VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2007; DUTRA et al., 2009; NARRA, 2014).

1.3.1. O papel fisiológico do hepatopâncreas e das brânquias em crustáceos

Nos decápodes, o hepatopâncreas consiste em um órgão relativamente desenvolvido, que ocupa a maior parte da cavidade cefalotorácica e está conectado ao estômago pilórico por meio de dois ductos primários (Figura 2) (BARNES; RUPER, 2005).

Segundo Franceschini-Vicentini et al. (2009), suas funções estão relacionadas à digestão e absorção de nutrientes, ao estoque de reservas energéticas (glicogênio e triglicerídeos) necessárias para os períodos de jejum ecdise e processos reprodutivos (produção de ovos), à excreção dos metabólitos resultantes do processo digestivo e, ainda, à metabolização de compostos endógenos (hormônios, por exemplo) e a desintoxicação do organismo (JOHNSTON et al., 1998; SOUSA; PETRIELLA, 2000).

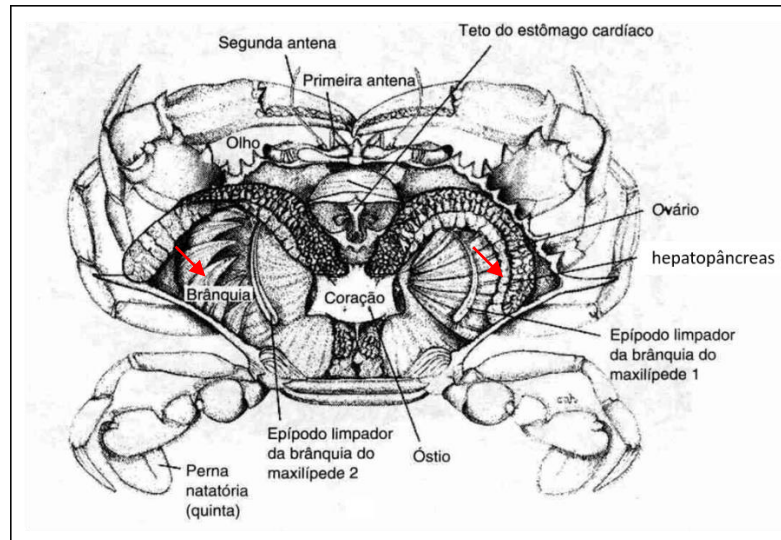


Figura 2. Morfologia geral interna de Brachyura. (Modificado de Barnes; Ruper, 2005).

Por outro lado, as brânquias dos decápodes se encontram dentro de uma câmara branquial localizada ventrolateralmente no corpo do animal (Figura 2) (TAYLOR; TAYLOR, 1992). O tecido branquial constitui uma interface seletiva entre o ambiente externo e o meio interno, trata-se de um órgão multifuncional que atua nas trocas gasosas, na osmorregulação, na excreção e regulação do equilíbrio ácido-base (LUCU; TOWLE, 2003; FREIRE et al, 2008).

De fato, a função e localização das brânquias expõem este órgão a alterações do ambiente aquático, como por exemplo, a presença de contaminantes. Desse modo, estão expostas a uma grande variedade de compostos tóxicos presentes no ambiente aquático fruto da ação antrópica e representam uma das principais vias de entrada destes compostos, incluindo os biocidas (AMADO et al., 2010).

1.4. Os biocidas diazinon e carbaril

Atualmente, os agroquímicos são identificados como um dos principais contaminantes aquáticos. Dentre eles podemos destacar os biocidas organofosforados (OPs) e os carbamatos (CM), uma vez que estes são compostos utilizados mundialmente, inclusive no Brasil, e seus efeitos tóxicos podem atingir organismos não alvo, alterando não apenas a fisiologia de tais organismos, mas também níveis de organização biológica mais altos como populações e comunidades (MURRAY et al., 2010). Dessa forma, o conhecimento da ação tóxica destes biocidas no ambiente apresenta grande importância

para o monitoramento e prevenção de prejuízos ambientais em regiões com frequente aplicação de tais compostos (VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009).

O diazinon é um biocida da família química dos OPs, cuja fórmula geral é dietil-2-isopropil-4-metil-6-pirimidil-tionofosfato ($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$). Este composto é classificado pela CETESB (2010) como grupo de alto risco, ou seja, apresenta uma alta toxicidade em vertebrados e invertebrados, contudo, é largamente utilizado na agricultura e possui ação neurotóxica em animais, baseada na inibição de colinesterases (LARKIN; TJEERDEMA, 2000).

O carbaril é um biocida CM, de nome químico 1-naftil metilcarbamato ou metilcarbamato de naftila ($C_{12}H_{11}NO_2$). Apresenta amplo espectro de toxicidade e é considerado um dos biocidas mais populares do mundo no controle de pragas. É classificado pela ANVISA (2010) no patamar de risco entre alto e moderado, ou seja, sua toxicidade pode variar de acordo com sua concentração. Este composto pode levar a diversas alterações no organismo em níveis bioquímicos, estruturais e comportamentais, como inibição enzimática, esterases por exemplo, formação de túbulos necróticos e dificuldades de locomoção e alimentação (BHAVAN; GERALDINE, 2002; 2009).

1.5. A biotransformação de xenobióticos e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Quando compostos tóxicos, como os biocidas, são absorvidos pelo organismo, em uma tentativa de neutralizar seus efeitos deletérios, inicia-se o processo de detoxificação desses compostos, o qual ocorre geralmente em três fases: na primeira ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise, na segunda acontecem as reações de conjugação e na terceira há a excreção dos produtos metabolizados (VAN DER OOST, 2003).

Na fase I grupos funcionais como -OH, -NH₂, -COOH, etc., são adicionados aos compostos xenobióticos por meio da ação de enzimas oxidases, redutases, hidrolases, monooxigenases, paraoxonases, etc., os quais na fase II, são conjugados com moléculas endógenas, como a glutationa (GSH), pela ação das enzimas de conjugação. Estes produtos conjugados são menos tóxicos e mais hidrossolúveis, sendo dessa forma, mais facilmente excretados durante a fase III (VAN DER OOST, 2003).

Apesar de o processo de biotransformação resultar na detoxificação de xenobióticos a metabólitos mais facilmente excretáveis, tal processo pode resultar também no aumento da ativação de espécies químicas mais reativas como metabólitos

radicalares, eletrofílicos e nucleofílicos e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SOLE^É et al., 1995).

As ERO são naturalmente formadas e degradadas por organismos em decorrência do metabolismo aeróbico. Quando o oxigênio molecular (O_2) consumido por tais organismos é reduzido a água (H_2O) por processos monoelétrônicos, são formados radicais intermediários como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são altamente reativos. Para que essa reação seja finalizada o radical formado deve reagir com outro radical livre, eliminando assim os elétrons desemparelhados, ou então reagir com compostos antioxidantes, como a GSH, um tripeptídio que atua como doador de elétrons para a redução de várias moléculas, por exemplo, peróxidos orgânicos (LIVINGSTONE et al, 1985; NORDBERG; ARNER, 2001).

Biocidas OPs e CMs, assim como outros xenobióticos, podem induzir a produção de ERO por vários mecanismos bioquímicos, como danos a membranas ligadas ao transporte de elétrons, ciclo redox, inibição de enzimas antioxidantes, entre outros (SLANINOVA et al., 2009; TRÍDICO et al., 2010).

Em resposta ao aumento das ERO, as células possuem sistemas de enzimas antioxidantes e de conjugação, tais como a glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST) que são induzidas pelo aumento das ERO e atuam neutralizando essas espécies reativas ou mantem a homeostase da GSH (STEGEMAN et al., 1992).

A GST é uma enzima que atua na fase II do metabolismo de xenobióticos a qual catalisa reações de conjugação entre o composto e a GSH, aumentando assim sua hidrossolubilidade, o que facilita a excreção (TAN et al., 1987). Suas funções essenciais são o transporte intracelular de grupos heme, bilirrubina e ácidos biliares, além de atuar na biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas. Contudo, um papel crítico para esta enzima é a defesa contra danos oxidativos e produtos de peroxidação de DNA e lipídios (VAN DER OOST et al., 2003).

A GPx é uma enzima que degrada H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos. Esta enzima utiliza a GSH como doadora de elétrons para a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 , com concomitante oxidação da GSH em GSSG (glutathione dissulfeto). A GPx desempenha um importante papel na proteção de membranas á peroxidação lipídica, pela sua rápida

redução de hidroperóxidos, o que leva á interrupção da propagação destes radicais (VAN DER OOST et al., 2003).

Apesar de não estar diretamente envolvida na defesa antioxidante, a GR merece atenção por conta de sua importância na manutenção da homeostase GSH/GSSG em organismos sob condições de estresse oxidativo. Esta enzima catalisa a transformação da forma oxidada, dissulfeto, da glutathione (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), com concomitante oxidação de NADPH a NADP⁺ (VAN DER OOST et al., 2003).

Outra enzima importante para o sistema antioxidante é a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), apesar de também não estar diretamente envolvida no processo de detoxificação de ERO. Esta enzima atua como reguladora da via de desvio das pentoses, importante para a regeneração do NADP⁺ a NADPH, composto este que atua na reciclagem da GSSG, formada durante a conjugação com intermediários eletrofílicos e na neutralização de ERO, para sua forma reduzida (GSH) por meio da reação catalisada pela GR, conforme citado anteriormente (VAN DER OOST et al., 2003).

Dessa forma, o aumento na formação de ERO em resposta a xenobióticos, leva a alterações na atividade de enzimas antioxidantes, as quais são amplamente empregadas como indicadores da presença de poluentes no ambiente (SILVA et al., 2005).

1.6. Estresse oxidativo e a peroxidação lipídica

A intoxicação por xenobióticos pode levar a superprodução de ERO ao ponto que sua taxa de decomposição pelas enzimas antioxidantes não são suficientes para neutralizar as ERO produzidas (ALMEIDA et al., 2003a). Dessa forma, o desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes caracterizam o grau de estresse oxidativo a qual o organismo se encontra (FINKEL; HOLBROOK, 2000). O excesso de ERO aumentam o dano oxidativo a biomoléculas, como DNA e lipídios, podendo induzir mutações e desestabilizar membranas biológicas através da oxidação ou peroxidação de lipídios (ALMEIDA et al., 2003b).

No DNA as ERO podem interagir com a desoxirribose, o que quase sempre leva a ruptura da cadeia do DNA, pela abstração de um átomo de hidrogênio. Ou ainda, podem causar mutações pontuais, pela interação de forma aditiva com as bases nitrogenadas (BARREIROS et al., 2006).

Além disso, as ERO podem atacar ácidos graxos poli-insaturados. A abstração de um átomo de hidrogênio desses ácidos graxos pode formar um radical lipídico que por

sua vez pode interagir com o O₂, formando um radical peroxila. Este radical pode abstrair um átomo de hidrogênio de um outro ácido graxo adjacente, o que estabelece uma cadeia de reações autocatalíticas, levando a oxidação das membranas em hidroperóxidos de lipídios e a formação de aldeídos como o malondialdeído (MDA) (ALMEIDA, 2003b). Além do mais, a peroxidação lipídica pode provocar o rompimento de membranas celulares levando a uma liberação de cálcio para as células adjacentes, o que pode causar o descontrole na ativação das lipases e proteases, enquanto que o ataque a membranas mitocondriais pode alterar sua permeabilidade e induzir um desequilíbrio energético celular (STOREY, 1996; ALMEIDA, 2003a). Estes produtos da oxidação lipídica têm sido largamente mensurados em invertebrados como indicadores de lesão causada por estresse oxidativo (PELLERIN-MASSICOTTE, 1994; MIYAMOTO et al., 2011; EL JOURMI et al., 2012).

Entre os aldeídos produzidos pela peroxidação lipídica, o MDA apresenta um importante papel na análise da toxicidade associada a danos em biomembranas causada por ERO. A derivatização do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) nos permite quantificá-lo e, assim, avaliar os níveis de danos oxidativos sofridos por membranas biológicas devido à ação de diversos contaminantes e/ou fatores abióticos (Almeida et al., 2003b).

1.7. Inibição da acetilcolinesterase e carboxilesterase por biocidas organofosforados e carbamatos.

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam, preferencialmente, os ésteres. Segundo Oakeshott et al. (2005), elas são capazes de hidrolisar uma ampla gama de substratos, incluindo amidas e peptídeos.

As colinesterases formam um grupo de enzimas envolvidas principalmente com a degradação de neurotransmissores e a condução neural. A acetilcolinesterase (AChE) está localizada nas membranas de diversos tipos celulares e controlam as correntes iônicas nas membranas excitáveis, desempenhando um importante papel nos processos de controle na condução do impulso nervoso e das junções neuromusculares. Esta enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina à colina e ácido acético nas sinapses (WHITTAKER, 1984; LIMA-CATELANI et al., 2004; OAKESHOTT et al., 2005; GUNNING, 2006). É conhecido que biocidas OPs e CMs são efetivos inibidores desta

enzima através da ligação ao sítio ativo da AChE (CAJARAVILLE et al., 2000; LIMA et al., 2013).

Outro grupo enzimático importante nos estudos em toxicologia aquática são as carboxilesterases (CbE). As CbEs formam uma família de enzimas que hidrolisam ésteres carboxílicos. Estão presentes em vários tecidos e órgãos, de invertebrados e vertebrados (WHEELOCK et al., 2008a) e estão envolvidas com a desintoxicação do organismo e a degradação do hormônio juvenil, o qual controla a metamorfose, a oogênese, a vitelogênese e a produção de feromônios, em insetos (LIMA-CATELANI et al., 2004; GUNNING, 2006; NASCIMENTO; BICUDO, 2006). Este grupo de enzimas é amplamente utilizado no estudo dos efeitos de biocidas OPs e CMs, uma vez que alguns destes compostos podem inibir sua atividade catalítica através da ligação química ao seu sítio ativo (OMKAR, 1985; BHAVAN; GERALDINE, 2009). Além disso, a CbE está envolvida no processo de desintoxicação de alguns carbamatos, por exemplo o carbaril e o sulfato de eserina, ao passo que são inibidas pelo carbofuran, dependendo da espécie analisada (JACKSON; OAKESHOTT et al., 2010).

Dessa forma, a caracterização dos efeitos toxicológicos sobre as enzimas AChE e CbE, pode fornecer importantes subsídios utilizados em programas de monitoramento ambiental e auxiliar na obtenção de dados preditivos que sejam capazes de atestar a qualidade da água ambiental, indicando a presença de CMs e OPs. Além de fornecer informações a respeito das respostas destas enzimas a variáveis abióticas, como a temperatura, por exemplo e sua influência na toxicidade de biocidas (FRASCO et al., 2010; HOMSTRUP et al., 2010).

Portanto, é de grande importância o conhecimento das respostas toxicológicas induzidas por biocidas OPs e CMs e a influência do aumento da temperatura em ambientes potencialmente poluídos por tais compostos, principalmente no cenário de mudanças climáticas atual.

10. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitiram concluir que;

Entre os biocidas testados, o carbaril apresentou maior toxicidade em fêmeas de *D. pagei*, uma vez que aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observados com maior frequência. Além disso, as brânquias deste sexo demonstraram maior sensibilidade à ação do carbaril em relação ao hepatopâncreas e a combinação deste biocida a extremos de temperatura (18 e 28 °C) são mais prejudiciais para fêmeas, pois aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observadas com maior frequência nas brânquias nessas duas temperaturas.

Nos machos a combinação entre o diazinon e a temperatura intermediária (23 °C) foi mais deletéria no hepatopâncreas, uma vez que aumentos nos níveis de peroxidação lipídica foram observadas com maior frequência nesse órgão.

O aumento da temperatura aumentou a toxicidade do diazinon a CbE no hepatopâncreas de machos. Além disso, a sensibilidade das brânquias de machos ao diazinon é maior em extremos de temperatura (18 e 28 °C).

A temperatura influenciou tanto a atividade enzimática quanto a toxicidade dos biocidas diazinon e carbaril em *D. pagei*, uma vez que todas as enzimas testadas e os níveis de peroxidação lipídica apresentaram alterações relacionadas ao aumento da temperatura e a ação dos biocidas foi diferente nas três temperaturas testadas.

Por fim, a espécie *D. pagei* demonstrou grande eficiência como organismo teste para a avaliação da presença de biocidas OP e CM em ambientes sob estresse térmico.

11. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. ANVISA, 2010.

ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. DNA and Lipid Damage in the Brown Mussel *Perna perna* from a Contaminated Site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 71, p. 270-275, 2003b.

ALMEIDA, E.A.; MARQUES, S.A.; KLITZKE, C.F.; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P.M. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 135, p. 295–303, 2003a.

ALMEIDA, E.A.; MIYAMOTO, S.; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*. v. 49, p. 386-392, 2004.

AMADO, E.M.; SOUZA, M.M.; FREIRE, C.A.O. O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos. UFPR (**Tese de Doutorado**), 2010.

ANGUIANO, O.L.; CASTRO, C.; VENTURINO, A.; FERRARI, A. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *hyalella curvispina*. *Environmental Toxicology*. p. 1043-1053, 2012.

ANGUIANO, O.L.; FERRARI, A.; SOLENO, J.; MARTINEZ, M.C.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P.; MONTAGNA, C.M. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ Toxicol Chem*. v. 27, n. 10, p. 2117–2123, 2008.

ARUN, S.; RAJENDRAN, A.; SUBRAMANIAN, P. Subcellular/tissue distribution and responses to oil exposure of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and glutathione S-transferase in freshwater prawns (*Macrobrachium malcolmsonii*, *M. lamarrei lamarrei*). *Ecotoxicology*. v. 15, p.341–346, 2006.

ASHAUER, R.; HINTERMEISTER, A.; O'CONNOR, I.; ELUMELU, M.; HOLLENDER, J.; ESCHER, B.I. Significance of Xenobiotic Metabolism for Bioaccumulation Kinetics of Organic Chemicals in *Gammarus pulex*. *Environ. Sci. Technol*. v. 46, p. 3498–3508, 2012.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Rima, São Carlos, 2003.

BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res*. v. 50, p. 411-416, 2000.

BANAEE, M.; SUREDA, A.; MIRVAGHEFI, A.R.; AHMADI, K. Biochemical and histological changes in the liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish Physiol Biochem.* v. 39, p. 489–501, 2013.

BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution.* v.104, n. 3, p. 469–476, 1999.

BARNES, R.D, RUPER, E.E. **Zoologia dos Invertebrados**. Ed. 6. Editora Roca, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Carbaryl-induced alterations in biochemical metabolism of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *J Environ Biol.* v. 23, 157-62, 2002.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology.* p. 331-339, 2000.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Journal of Environmental Biology*, 2009.

BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of Sesamol. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* v. 67, p. 100–108, 2007.

BIANCO, K.; YUSSEPPONE, M.S.; OTERO, S.; LUQUET, C.; MOLINA, M.C.R.; KRISTOFF, G. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. *Aquatic Toxicology.* 144– 145 (2013) 26– 35.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 7; p. 248-254, 1976.

BRADLEY, B.P. Increase in range of temperature tolerance by acclimation in the copepod *eurytemora affinis*. *Biol. Bull.* v. 154, p. 177-187, 1978.

BRAUSCH, J.M.; SMITH, P.N. Mechanisms of resistance and cross-resistance to agrochemicals in the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca). *Aquatic Toxicology.* v. 92, n. 3, p. 140–145, 2009.

BRAY, W.; LEUNG-TRUJILLO, J.; LAWRENCE, A.; ROBERTSON, S. Preliminary investigation of the effects of temperature, bacterial inoculation, and EDTA on sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. *J. World Mar. Soc.* v.16, p. 250–257, 1985.

CACCIATORE, L.C.; KRISTOFF, G.; GUERRERO, N.R.V.; COCHON, A.C. Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic

cholinesterase inhibition in *Planorbarius corneus*. *Chemosphere*. v. 88, p. 450–458, 2012.

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

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. *Methods Enzimol*. v. 113, p. 484-490, 1985.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ficha de Informação de Produto Químico**. CETESB, 2010.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*. n. 53, p. 58-63, 2005.

COTTIN, D.; SHILLITO, B.; CHERTEMPS, T.; TANGUY, A.; LÉGER, N.; RAVAUX, J. Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. *Marine Genomics*. v. 3, n. 2, p. 71–78, 2010.

DANDAPAT, J.; CHAINY, G.B.N.; RAO, K.J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 135, n. 3, p. 221–233, 2003.

DARRIGRAN, G. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions*. v. 4, p. 145-156, 2002.
Deriving Safe Extrapolation Factors

DESOUKY, M.M.A.; ABDEL-GAWAD, H.; HEGAZI, B. Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Food and Chemical Toxicology*. v. 52, p. 42–52, 2013.

DUTRA, B.K.; FERNANDES, F.A.; LAUFFER, A.L.; OLIVEIRA, G.T. Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 149, p. 640–646, 2009.

DUTRA, B.K.; FERNANDES, F.A.; OLIVEIRA, G.T. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na⁺/K⁺ATPase activity of *Hyaella pleoacuta* and *Hyaella curvispina* in bioassays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 147, p. 179–188, 2008.

EL JOURMI, L.; AMINE, A.; ALAOUI, M.M.; LAZAR, S.; HMYENE, A.; EL ANTRI, S. Assessment of water quality in coastal environments of mohammedia applying responses of biochemical biomarkers in the brown mussel *Perna perna*. *IJCSI*. v. 9, 2012.

ELIA, A.C.; DÖRR, A.J.M.; MASTRANGELO, C.; PREARO, M.; ABETE, M.C. Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (girard, 1852) of lake trasimeno (italy). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* v. 380, p. 1351-1361, 2006.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pest Biochem Physiol.* v. 88, p. 134-142, 2007.

FERRARI, A.; LASCANO, C.; D'ANGELO, A.M.P.; VENTURINO, A. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* v. 153, p. 34-39, 2011.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J.A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev. Port. Cien. Desp.* v. 7, p. 257-275, 2007.

FICKE, A.D.; MYRICK, C.A.; HANSEN, L.J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev Fish Biol Fisheries.* v. 17, p.581-613, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, 2000.

FOURNIER, D.; MUTERO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 108C, n. 1, p. 19-31, 1994.

FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; RIBEIRO, K.; PAPA, L.P. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J. Morphol.* v. 27, p. 121-128, 2009.

FRASCO, M.F.; ERZEN, I.; STOJAN, J.; GUILHERMINO, L. Localization and properties of cholinesterases in the common prawn a kinetic-histochemical study. *Biol Bull.*, v.218, p.1-5, 2010.

FRASCO, M.F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Cholinesterase from the prawn eyes. *Aq. Tox.*, v.77, p.412-21, 2006.

FREIRE C.A., ONKEN H., MCNAMARA J.C. A structure function analysis of íon transport in crustaceans gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 151(A), p. 272-304, 2008.

FUKUTO, R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives.* v. 87, p. 245-254, 1990.

GHAZALA; MAHBOOB, S.; SULTANA, S.; SULTANA, T.; AHMAD, L.; ASI, M.R. Cholinesterases: cholinergic biomarkers for the detection of sublethal effects of

organophosphorous and carbamates in *Catla catla*. *Int. J. Agric. Biol.* v. 16, p. 406–410, 2014.

GHEDIRA, J.; JEBALI, J.; BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; CHOUBA, L.; BOUSSETTA, H. Acute effects of chlorpyrifos-ethyl and secondary treated effluents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in *Carcinus maenas*. *Journal of Environmental Sciences*. v. 21, p. 1467–1472, 2009.

GLOCK, G.E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* v. 55, p. 400-408, 1953.

GONZALEZ, R.A.; DIAZ, F.; LICEA, A.; RE, A.D.; SANCHEZ, L.N.; GARCIA-ESQUIVEL, Z. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *J. Therm. Biol.* v. 35, p. 218–224, 2010.

GONZÁLEZ, R.A.; DÍAZ, F.; LICEA, A.; RE, A.D.; SÁNCHEZ, L.N.; GARCÍA-ESQUIVEL, Z. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*. v. 35, p. 218–224, 2010.

GUERRA, A.L.; LIMA, A.V.B.; TADDEI, F.G.; CASTIGLIONI, L. Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. *Genetics and Molecular Research*. v. 9, n. 4, p. 2317-2327, 2010.

GUNNING, R.V. Inhibition of carbamate-insensitive acetylcholinesterase by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera*. *J. Mol. Neurosci.*, v. 30, p. 21-22, 2006.

HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; HESSEN, K.M.; DAHL, U.; BREITHOLTZ, M.; NORDTUG, T.; OLSEN, A.J. Expression of ecdysteroids and cytochrome P450 enzymes during lipid turnover and reproduction in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda). *General and Comparative Endocrinology*. v. 158, p. 115–121, 2008.

HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; NORDTUG, T.; OLSEN, A.J. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. v. 2, n. 3, p. 250–256, 2007.

HASEGAWA, Y.; HIROSE, E.; KATAKURA, Y. Hormonal Control of Sexual Differentiation and Reproduction in Crustacea. *Amer. Zool.* v. 33, p. 403-411, 1993.

HASSETT, R.P.; CROCKETT, E.L. Habitat temperature is an important determinant of cholesterol contents in copepods. *The Journal of Experimental Biology*. v. 212, p. 71-77, 2009.

HERNÁNDEZ-MORENO, D.; SOLER, F.; MÍGUEZ, M.P.; PÉREZ-LÓPEZ, M. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of

continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of the Total Environment*. v. 408, n. 21, p. 4976–4983, 2010.

HODGE, S.; LONGLEY, M.; BOOTH, L.; HEPPELTHWAITE, V.; O'HALLORAN, K. An evaluation of glutathione S-transferase activity in the Tasmanian Lacewing (*Micromus tasmaniae*) as a biomarker of organophosphate contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v. 65, p. 8–15, 2000.

HOLMSTRUP, M.; BINDESBØL, A.M.; OOSTINGH, G.J.; DUSCHL, A.; SCHEIL, V.; KÖHLER, H.R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A.M.V.M.; FERREIRA, A.L.G.; KIENLE, C.; GERHARDT, A.; LASKOWSKI, R.; KRAMARZ, P.E.; BAYLEY, M.; SVENDSEN, C.; SPURGEON, D.J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment*. v. 408, p. 3746–3762, 2010.

HOMOLA, E.; CHANG, E.S. Methyl Farnesoate: Crustacean Juvenile Hormone in Search of Functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. v. 117, p. 347–356, 1997.

HYNE, R.V.; MAHER, W.A. Macroinvertebrate biomarkers: links to toxicosis and changes in populations or communities. *Ewater*, 2001.

JACKSON, C.J.; OAKESHOTT, J.G. Carboxylesterase in the metabolism and toxicity of pesticides. In: SATOH, T.; GUPTA, R.C. **Anticholinesterase pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology**. Wiley, New Jersey, 2010.

JAMES, M.O.; BOYLE, S.M. Cytochromes P450 in crustácea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. v. 121, p. 157–172, 1998.

JOHNSTON, D.J.; ALEXANDER, G.C.; YELLOWHIFES, D. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis*. *Journal Crustacean Biol.* v. 18, p. 271-278, 1998.

JUGDALE, G.B.; GORDON, R. Effect of Temperature on the Activities of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Hexokinase in Entomopathogenic Nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Camp. Rtochem. I'hyiol VLJ*. v. 118, p. 1151-1156, 1997.

KAYHAN, F.E.; KAYMAK, G.; YÖN, N.D. Insecticide Groups and Their Effects in Aquatic Environment. *Fen Bilimleri Dergisi*. v. 25, n. 4, p. 167-183, 2013.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*. v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KEIZER, J.; D'AGOSTINO, G.; NAGEL, R.; VOLPEB, T.; GNEMID, P.; VITTOZZI, L. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *The Science of the Total Environment*. v. 17, p. 213-220, 1995.

KOENIG, S.; FERNÁNDEZ, P.; SOLÉ, M. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: Relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). *Aquatic toxicology*. v. 108, p. 11-17, 2012.

KONG, X.; WANG, G.; LI, S. Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). *Mar Biol.* v. 154, p. 269–276, 2008.

KUO, C.M.; HSIEH, S.L. Comparisons of physiological and biochemical responses between milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) to cold shock. *Aquaculture*. v. 251, p. 525–536, 2006.

KWOK, K.W.H.; LEUNG, K.M.Y.; LUI, G.S.G.; CHU, V.K.H.; LAM, P.K.S.; MORRIT, D.; MALTBY, L.; BROCK, T.C.M.; VAN DEN BRINK, P.J.; WARNE, M.S.; CRANE, M. Comparisson of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: Implications for deriving safe extrapolation factors. *Integrated Environmental Assessment and Management*. v. 3, n.1, p. 49-67, 2007.

LAETZ, C.A.; BALDWIN, D.H.; HEBERT, V.R.; STARK, J.D.; SCHOLZ, N.L. Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. *Aquatic Toxicology*. v. 146, p. 38– 44, 2014.

LARKIN, D.J.; TJEERDEMA, R.S. Fate and effects of diazinon. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* v. 166, p. 49–82, 2000.

LIMA, A.V.B. Análise da variabilidade genética e do padrão de atividade esterásica no hepatopâncreas de camarões palemonídeos expostos a diferentes pesticidas. UNESP-IBILCE (**Dissertação de Mestrado**), 2012.

LIMA, A.V.B.; GUERRA, A.L., ALMEIDA, E.A.; TADDEI, F.G.; CASTIGLIONI, L. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 47, p. 132–138, 2013.

LIMA-CATELANI, A.R.A.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation during development, revealed by esterase patterns of *A. aegypti*. *Biochem. Gen.*, v. 42, p. 69-84, 2004.

LIVINGSTONE, D.R.; MOORE, M.N.; LOWE, D.M.; NASCI, C.; FARRAR, S.V. Responses of the cytochrome P-450 monooxygenase system to diesel oil in the common mussel, *Mytilus edulis*, and the periwinkle, *Littorina littorea*. *Aq. Toxicol.* v. 7, p. 79-91, 1985.

LOS, D.; MURATA, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1666, p. 142-157, 2004.

LUCU, Č.; TOWLE, D.W. Na(+) + K(+) - ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 135(A), p. 195-214, 2003.

MAAZOUZI, C.; PISCART, C.; LEGIER, F.; HERVANT, F. Ecophysiological responses to temperature of the “killer shrimp” *Dikerogammarus villosus*: is the invader really stronger than the native *Gammarus pulex*? *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 159, p. 268-274, 2011.

MAGALHÃES, C.; BUENO, S.L.; BOND-BUCKUP, G.; VALENTI, W.C.; SILVA, H.M.; KIYOHARA, F.; MOSSOLIN, E.C.; ROCHA, S. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of Sao Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. *Biodiversity and Conservation*. v. 14, p. 1929-1945, 2005.

MAGALHÃES, C.V.F. **Revisão Taxonômica dos Caranguejos Dulcícolas da Família Trichodactylidae. (Crustacea: Decapoda: Brachyura)**. Usp, 75 p., 1991.

MAGRIN, G.O.; MARENCO, J.A.; BOULANGER, J.P.; BUCKERIDGE, M.S.; CASTELLANOS, E.; POVEDA, G.; SCARANO, F.R.; VICUÑA, S. Central and South America. Em: **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** [BARROS, V.R.; FIELD, C.B.; DOKKEN, D.J.; MASTRANDREA, M.D.; MACH, K.J.; BILIR, T.E.; CHATTERJEE, M.; EBI, K.L.; ESTRADA, Y.O.; GENOVA, R.C.; GIRMA, B.; KISSEL, E.S.; LEVY, A.N.; MACCRACKEN, S.; MASTRANDREA, P.R.; WHITE, L.L. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1499-1566. 2014.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U.H. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. v. 23, p. 283-337, 1988.

MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; CARROLA, J.; ROCHA, E. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 89, p. 73–80, 2007.

MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; CARROLA, J.; ROCHA, E. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 89, p. 73–80, 2007.

MATOZZO, V.; GALLO, C.; MARIN, M.G. Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *Marine Environmental Research*. v. 71, n. 5, p. 351-356, 2011.

MCCLELLAN-GREEN, P.; ROMANO, J.; OBERDÖRSTER, E. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environmental Research*. v. 104, p. 183–191, 2007.

MELO, G.A.S. **Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil**. pp. 289-415 Edições Loyola, São Paulo, 2003.

MENEZES, S.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L.; PECK, M.R. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 335, p. 114 – 122, 2006.

MINIER, C.; FORGET-LERAY, J.; BJØRNSTAD, A.; CAMUS, L. Multixenobiotic resistance, acetyl-choline esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate. *Marine Pollution Bulletin*. v. 56, n. 8, p. 1410–1415, 2008.

MIYAMOTO, S.; ALMEIDA, E.A.; NOGUEIRA, L.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Evaluation of malondialdehyde levels. Em: ZENTENO-SAVIN, T.; VÁZQUEZ-MEDINA, J.P.; ABELE, D. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. v. 1, p. 440-446, 2011.

MOLION, L.C.B. Aquecimento global, el niños, manchas solares, vulcões e oscilação decadal do pacífico. *Revista Climánálise*, 2006.

MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Some kinetic and toxicological characteristics of thoracic ganglia cholinesterase of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. v. 120, p. 193–199, 1998.

MONTOYA, J.A. **Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement**. Wageningen, 2001.

MURRAY, K.E.; THOMAS, S.M.; BODOUR, A.A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*. v. 158, p. 3462–3471, 2010.

NAGATO, E.G.; SIMPSON, A.J.; SIMPSON, M.J. Metabolomics reveals energetic impairments in *Daphnia magna* exposed to diazinon, malathion and bisphenol-A. *Aquatic Toxicology*. v. 170, p. 175–186, 2016.

NARRA, M.R. Tissue-Specific Recovery of Oxidative and Antioxidant Effects of Chlorpyrifos in the Freshwater Crab, *Barytelphusa guerini*. *Arch Environ Contam Toxicol*. v. 67, p. 158–166, 2014.

NASCIMENTO, A.P.; BICUDO, H.E.M.C. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (saltans group): intraspecific and interspecific variations in the development. *Genetica*, v. 126, p. 265-276, 2006.

NEGRO, L.; SENKMAN, E.; MONTAGNA, M.; COLLINS, P. Freshwater Decapods and Pesticides: An Unavoidable Relation in the Modern World. *In tech*, 2013.

NIETO, R.M.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J.L.; LÓPEZ-BAREA, J. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. *Environmental Pollution*. v. 158, n. 2, p. 401–408, 2010.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Med.* v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OAKESHOTT, J.G.; DEVONSHIRE, A.L.; CLAUDIANOS, C.; SUTHERLAND, T.D.; HORNE, I.; CAMPBELL, P.M.; OLLIS, D.L.; RUSSELL, R.J. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin and carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions.* v. 157–158, p. 269–275, 2005.

OMKAR, A., SHUKLA, G.S. Dichlorvos intoxication in a freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei* (H. Milne Edwards). *Ecotoxicol Environ Saf.* v. 9, p. 392-396, 1985.

PAITAL, B.; CHAINY, G.B.N. Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* v. 87, p. 33-41, 2013.

parison of Tropical and Temperate Freshwater Animal

PELLERIN-MASSICOTTE, J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosys. Health.* v. 3, p. 101–111, 1994.

PÖRTNER, H.O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science.* v. 315, n. 5808, p. 95-97, 2007.

POWELL, M.L.; WATTS, S.A. Effect of temperature acclimation on metabolism and hemocyanin binding affinities in two crayfish, *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* v. 144, p. 211–217, 2006.

PRINTES, L.B.; CALLAGHAN, A. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry.* v. 23, n. 5, p. 1241–1247, 2004.

PRUITT, N.L. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J. therm. Biol.* v. 15, n. 1, p. 1-8, 1990.

REWITZ, K.F.; STYRISHAVE, B.; LØBNER-OLESEN, A.; ANDERSEN, O. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* v. 143, p. 363–381, 2006.

RIVADENEIRA, P.R.; AGRELO, M.; OTERO, S.; KRISTOFF, G. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* v. 90 p. 82–88, 2013.

ROBERT, M.; GRAY, I. Enzymatic mechanisms during temperature acclimation of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Oxygen consumption and activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 42B, p. 377 – 387, 1972.

SAINATH, S.B.; SWETHA, C.H.; REDDY, P.S. What Do We (Need to) Know About the Melatonin in Crustaceans? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology.* v. 319, p. 365–377, 2013.

SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCÍA-CARREÑO, F.; MUHLIA-ALMAZÁN, A.; PEREGRINO-URIARTE, A.B.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 36, p. 241–249, 2006.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar Pollut Bull*. v. 39, p. 48-53, 1999.

SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S.; HURK, P.; WILLETT, K. Biotransformation in Fishes. Em: DI GIULIO, R.; HILTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press. p. 153-234, 2008.

SENEVIRATNE, S.I.; NICHOLLS, N.; EASTERLING, D.; GOODESS, C.M.; KANAE, S.; KOSSIN, J.; LUO, Y.; MARENGO, J.; MCINNES, K.; RAHIMI, M.; REICHSTEIN, M.; SORTEBERG, A.; VERA, C.; ZHANG, X. Changes in climate extremes and their impacts on the natural physical environment. Em: **Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation** [FIELD, C.B.; BARROS, V.; STOCKER, T.F.; QIN, D.; DOKKEN, D.J.; EBI, K.L.; MASTRANDREA, M.D.; MACH, K.J.; PLATTNER, G.K.; ALLEN, S.K.; TIGNOR, M.; MIDGLEY, P.M. (eds.)]. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA, pp. 109-230, 2012.

SHARBIDRE, A.A.; METKARI, V.; PATODE, P. Effect of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation of *Poecilia reticulata*. *Research Journal of Environmental Toxicology*. v. 2, n. 5, p. 152-161, 2011.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett*. v. 103, p. 287-290, 1979.

SILVA, A.Z.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 62, p. 376–382, 2005.

SILVA, D.C.; TRÍDICO, C.P.; SERRANO, L.; ALMEIDA, E.A. Effect of mixture of diazinon and benzo[a]pyrene in Glutathione S-transferase of Nile tilapia. *O Mundo da Saúde*. v. 38, p. 9-15, 2014.

SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*. v. 30, 2009.

SOGORB M.A.; VILANOVA E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*. n. 128, p. 215–228, 2002.

SOLÉ, M.; GARCÍA DE LA PARRA, L.M.; ALEJANDRE-GRIMALDO, S.; SARDÁ F. Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, p. 1708–1716, 2006.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. Seasonal variation in mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 14, p. 157-164, 1995.

SOUSA, L.G.; PETRIELLA, A.M. Histology of the hepatopancreas of the freshwater *P. argentines*. *Biol.* v. 24, p. 189-195, 2000.

Species' Acute Sensitivities to Chemicals: Implications for

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FORLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN HELD, P.A. Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. *CRC Press*. p. 235-335, 1992.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *CRC press*, 1994.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 29, n. 12, p. 1715-1733, 1996.

STRINGUETTI, C.; GUILHERMINO, L.; SILVA, E. M. Cholinesterase Activity in the Head of Wild *Poecilia reticulata* from Bahia, Brazil: Biochemical Characterization, Effects of Sample Storage and Normal Range of Activity. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* v. 3, p. 57-63, 2008.

TADDEI, F.G.; HERRERA, D.R. Crescimento do caranguejo *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Crustacea, Brachyura, Trichodactylidae) na represa Barra Mansa, Mendonça, SP. *Boletim do Instituto de Pesca.* v. 36, p. 99-110, 2010.

TAN, K.H.; MEYER, D.J.; COLES, B.; GILLIES, N.; KETTERER, B. Detoxification of peroxidized DNA by glutathione transferases. *Biochem. Soc. Trans.* v. 15, p. 628-629, 1987.

TAYLOR H.H., TAYLOR E.W. Gills and lungs: the exchange of gases ions. Em: HARRISON F.W. **Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea.** v. 10, pp. 203-293. Ed. WileyLiss: New York, 1992.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. **Divulgação Técnica: Toxicologia De Agrotóxicos em Ambiente Aquático.** v. 1, pp. 135-142, Biológico, São Paulo, 2005.

TONGBAI, W.; DAMRONGPHOL, P. Bioactivation of chlorpiriphos in the Riceland Prawns, *Macrebrachium lanchesteri*. *Journal of Biological Sciences.* v. 11, p. 275-281, 2011.

TOUMI, H.; BURGA-PEREZ, K.F.; FERARD, J.F. Acute and chronic ecotoxicity of carbaryl with a battery of aquatic bioassays. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.* v. 51, n. 1, 2016.

TRANULIS, M.A.; CHRISTOPHERSEN, B.; BLOMT, A.K.; BORREBAEK, B. Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of

rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 99B, p. 687-691, 1991.

TRÍDICO, C.P.; RODRIGUES, A.C.F.; NOGUEIRA, L.; SILVA, D.C.; MOREIRA, A.B.; ALMEIDA, E.A. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pirene and Diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010.

TU, H.T.; SILVESTRE, F.; MEULDER, B.; THOME, J.P.; PHUONG, N.T.; KESTEMONT, P. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*. v. 86, n. 1, p. 83–91, 2012.

URICH, K. **Comparative animal biochemistry**. Springer-Verlag, 1994.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environm Toxicol Pharmacol.* v. 13, p. 57-149, 2003.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers*. 2009.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. p. 404-412, 2007.

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

WHEELOCK, C.E.; PHILLIPS, B.M.; ANDERSON, B.S.; MILLER, J.L.; MILLER, M.J.; HAMMOCK, B.D. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. p. 117-177, 2008b.

WHEELOCK, M. J.; SHINTANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; JOHNSON, K. Cadherin switching. *Journal of Cell Science*. v. 121, p. 727-735, 2008a.

WHITTAKER, T.R.F. Cholinesterase. Em: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3. Ed. Florida: Verlag Chemie, v. II, cap. 1.4, p. 52-74, 1984.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos, 2006.