



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 Gazzi 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.

À 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 concentração 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 Brachyura | 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).

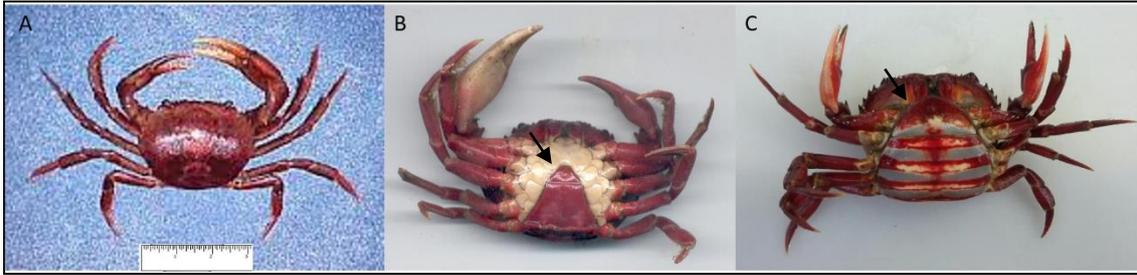


Figura 1. *Dilocarcinus pagei* em vista dorsal (A) (modificado de TADDEI et al., 1999). Macho em vista ventral (B). Fêmea em vista ventral (C).

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).

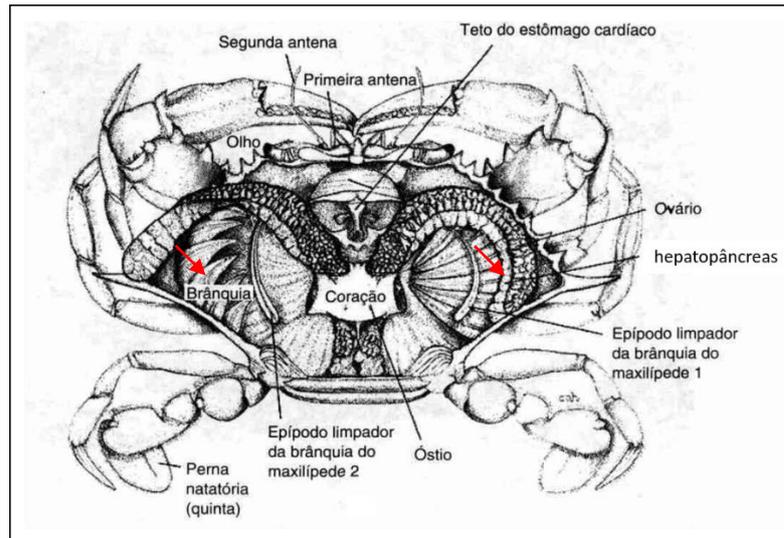


Figura 2. Morfologia geral interna de Brachyura. (Modificado de Barnes; Ruper, 2005).

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) (SOLEÉ 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 (WHEELLOCK 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.

2. Objetivos Gerais

Tendo em vista que as respostas de enzimas antioxidantes, marcadores de estresse oxidativo e enzimas esterásicas a biocidas OP e CM, frente ao aumento da temperatura, ainda são pouco conhecidos em invertebrados de água doce e o potencial aumento da temperatura em águas continentais causado pelo aquecimento global, este trabalho tem como objetivo estudar as respostas antioxidantes, o padrão inibitório de enzimas esterásicas e os níveis de peroxidação lipídica como modelo para entender a possível influência da temperatura nas respostas toxicológicas do hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de caranguejos dulcícolas da espécie *Dilocarcinus pagei* após exposição aos biocidas diazinon (OP) e carbaril (CM).

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção das amostras

Os espécimes de *D. pagei* usados nesse trabalho foram adquiridos em lojas de iscas da região de São José do Rio Preto/SP, provindos da coleta manual na represa Barra Mansa em Mendonça/SP (21°14'27''S e 49°56'28''W) (Figura 3).

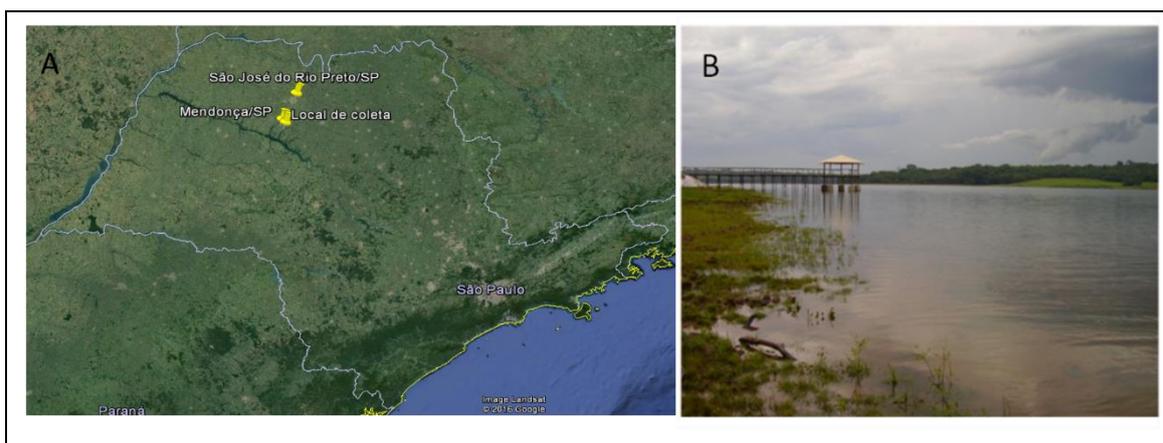


Figura 3. Mapa indicando o local de coleta (A) e foto da região não urbanizada da represa Barra Mansa (B).

Os espécimes foram então encaminhados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA) na UNESP, Campus de São José do Rio Preto/SP, onde foram mantidos por 10 dias em tanques contendo 250 L de água potável, livre de cloro, obtidas no próprio Campus, para aclimação ao ambiente de laboratório e desintoxicação de possíveis exposições prévias a contaminantes em seu ambiente de origem. Machos e fêmeas foram mantidos em tanques separados para evitar possíveis competições reprodutivas entre os machos.

Durante o período de aclimação, a água dos tanques foi oxigenada constantemente por compressores de ar acoplados a um sistema de mangueiras. Não houve manutenção da temperatura da água durante este período, a fim de prevenir mortalidade dos espécimes.

Com o intuito de evitar diminuição do tecido hepatopancreático e o desenvolvimento de fungos nos tanques de aclimação, os caranguejos foram alimentados com ração a base de algas da marca Alcon[®], dia sim dia não, os restos alimentares e fezes foram limpos nos dias seguintes à alimentação.

3.2. Manutenção dos espécimes nas diferentes temperaturas

Após o período de 10 dias de aclimação, os espécimes foram realocados para aquários contendo 16 L de água potável, livre de cloro, onde foram acondicionados um macho e uma fêmea por aquário (8 L de água por animal) em um total de 15 aquários por temperatura, sendo que cinco desses aquários foram destinados ao grupo controle, outros cinco para a exposição à menor concentração ($10\mu\text{g L}^{-1}$) e os cinco restantes para a maior concentração ($100\mu\text{g L}^{-1}$) do carbaril ou do diazinon, compondo assim, os três grupos utilizados em cada experimento. Esses aquários foram alocados em um sistema de banho circulante externo de 300 L com temperaturas constantes ajustadas para 18, 23 e 28 °C, de modo a manter a mesma temperatura da água no interior dos aquários individuais, conforme mostrado no diagrama da figura 4. Os espécimes permaneceram por mais cinco dias nas novas temperaturas para aclimação às mesmas.

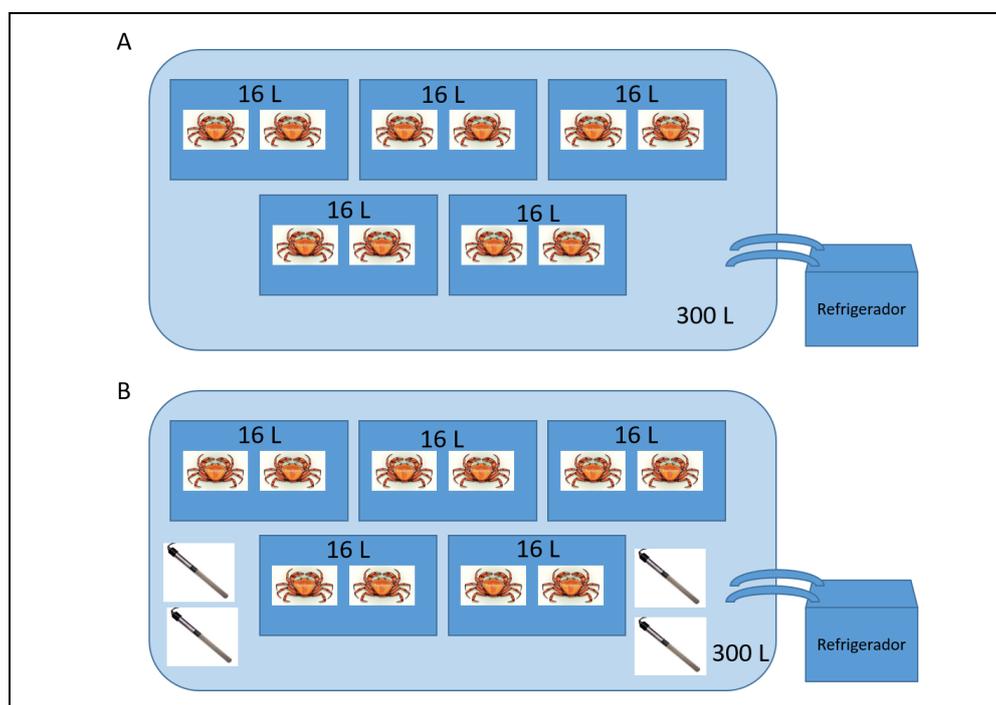


Figura 4. Esquema mostrando o sistema de manutenção da temperatura da água utilizado em 18 e 23 °C, com refrigeradores externos (A) e 28 °C, com termostatos aquecedores e refrigeradores externos para evitar variações maiores que 0,5 °C (B).

Para a manutenção das temperaturas de 18 e 23 °C foram utilizados refrigeradores específicos para aquários da marca *Chiller Gelaqua*[®] acoplados a bombas de circulação de água. Os refrigeradores foram então regulados na temperatura desejada, com tolerância de variação de 0,5 °C para mais ou para menos.

Para a manutenção da temperatura de 28 °C foram utilizados aquecedores para aquários acoplados a termostatos. Estes foram utilizados em conjunto aos refrigeradores regulados à temperatura desejada com tolerância de variação de 0,5 °C para mais ou para menos, com o intuito de evitar maiores variações na temperatura da água.

Nessa etapa foram seguidos os mesmos sistemas de alimentação dos caranguejos e limpeza dos aquários descritos no item anterior (item 3.1).

A seleção das temperaturas foi baseada no Relatório Especial sobre Gestão dos Riscos de Extremos Climáticos e Desastres (SREX/IPCC), onde supõe, em eventos de aquecimento catastrófico, aumento médio superior a 2,5 °C na temperatura anual da água, conforme previstos para a América Latina (SENEVIRATNE et al., 2012). Dessa forma, no presente estudo, utilizamos aumentos de 5 °C com o intuito de extrapolar as projeções médias feitas pelo IPCC e avaliar os efeitos de possíveis aumentos na temperatura de águas continentais, acima dos previstos por esta organização.

3.3. Experimentos de exposição dos caranguejos aos biocidas sob diferentes temperaturas

Os experimentos de exposição aos biocidas diazinon (OP) e carbaril (CM) nas diferentes temperaturas foram realizados separadamente.

Para cada experimento, os animais (n=5), foram submetidos à exposição ao diazinon ou ao carbaril. Foi utilizado um total de 15 aquários por temperatura, sendo que cinco desses aquários foram destinados ao grupo controle, outros cinco para a exposição à menor concentração (10 µg L⁻¹) e os cinco restantes para a maior concentração (100 µg L⁻¹) do carbaril ou do diazinon separadamente (Figura 5), conforme dados prévios de toxicidade dos biocidas CMs e OPs em crustáceos Decápodes (LIMA, 2012).

Além disso, de acordo com a resolução 357/2005 do CONAMA, a qual dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, indica concentração máxima tolerável de 70 µg L⁻¹ do carbaril em águas ambientais. Esta resolução não indica valor máximo tolerável ao diazinon, contudo, para o OP malation este valor é de 100 µg L⁻¹. Desta forma, os valores utilizados

no presente estudo se aproximam dos indicados na resolução 357/2005 do CONAMA, o que indica a possibilidade de ocorrência de tais concentrações no ambiente.

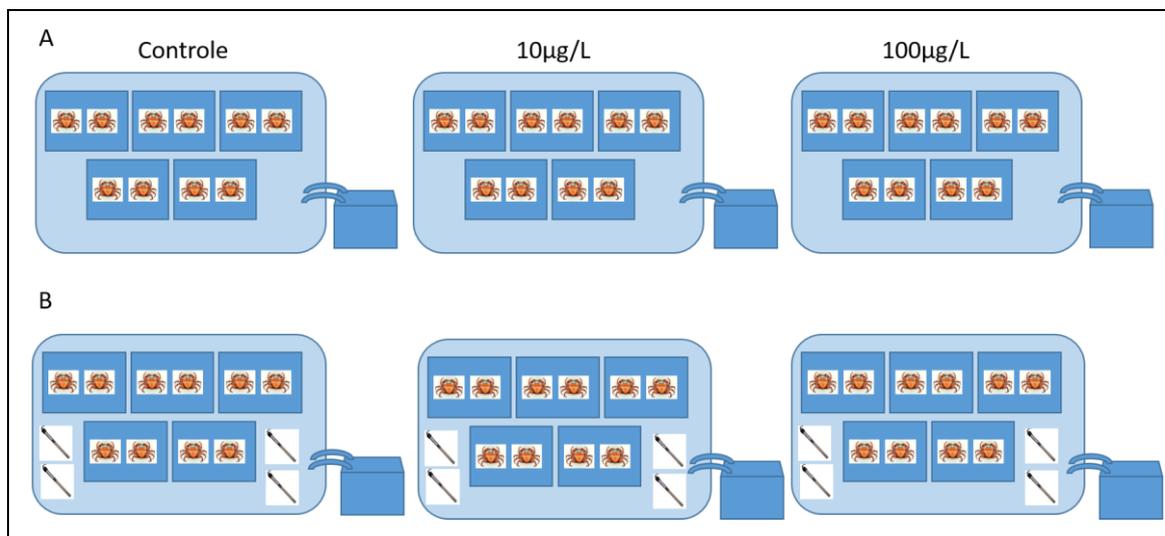


Figura 5. Esquema mostrando a configuração dos experimentos de exposição acoplados ao sistema de manutenção da temperatura da água utilizado em 18 e 23 °C (A) e 28 °C (B).

Para a obtenção das concentrações desejadas do diazinon foram pesados 25 mg de “Pikzion[®]” (produto comercial contendo 40% do diazinon), diluído em 10 mL de etanol absoluto e, posteriormente, esse volume foi completado para 100 mL com água destilada. Dessa solução foram adicionados volumes de 1,6 mL nos tanques correspondentes a concentração de 10 µg L⁻¹ e 16 mL nos tanques correspondentes a 100 µg L⁻¹. Os tanques referentes ao controle não receberam adicionais.

Para a obtenção das concentrações desejadas do carbaril foram feitas duas soluções: para a solução 1 foram pesados 0,8 mg do carbaril (99,98% Fluka[®]), diluído em 10 mL de etanol absoluto e, posteriormente, esse volume foi completado para 100 mL com água destilada. Para a solução 2 foram pesados 8 mg do carbaril (99,98% Fluka[®]), diluído em 10 mL de etanol absoluto e, posteriormente, esse volume foi completado para 100 mL com água destilada. Da solução 1 foram adicionados 20 mL nos tanques correspondentes a 10 µg L⁻¹ e da solução 2 foram adicionados 20 mL nos tanques correspondentes a 100 µg L⁻¹. Os tanques referentes ao controle não receberam adicionais.

Os caranguejos foram mantidos nos tratamentos por sete dias. Passado esse período todos os animais foram coletados e mortos por congelamento em nitrogênio líquido. Seus hepatopâncreas e brânquias foram coletados e imediatamente congelados,

também em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer -80 °C para posteriores análises bioquímicas.

3.4. Processamento das amostras

Para as análises das enzimas GST, GPx, GR e G6PDH, os tecidos hepatopancreáticos e branquiais foram homogeneizados na proporção 1:4 m/v, em tampão Tris HCl 0,2 mol L⁻¹ pH 7,5, contendo sacarose 0,5 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mmol L⁻¹ e inibidores de protease (PMSF) 1 mmol L⁻¹, e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 3 °C. A fração sobrenadante foi então coletada e re-centrifugada a 55.000 x g por 60 min a 3 °C. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para posteriores análises enzimáticas.

Para a análise de AChE e CbE foram obtidos tecidos do hepatopâncreas e das brânquias, as quais foram homogeneizados na proporção 1:4 (m/v) de tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0 e centrifugados por 30 minutos a 9168 x g, a 4 °C. A fração sobrenadante foi então coletada e congelada à -80 °C.

3.5. Atividade das enzimas antioxidantes

As análises da atividade das enzimas antioxidantes foram realizadas com o auxílio de um leitor espectrofotométrico de microplacas modelo Victor[®] X3 Multilabel (PerkinElmer).

A atividade da GPx foi feita seguindo a técnica descrita por Sies et al. (1979). Este método baseia-se na medida do decréscimo de absorvância a 340 nm (ϵ 6,22), promovido durante a redução da GSSG à GSH. A redução é catalisada pela GR na presença de NADPH. Para isto foi utilizado um meio de reação contendo: 5 μ L de amostra (extrato protéico tecido-específico); tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0; 1 mmol L⁻¹ de GSH; 0,2 mmol L⁻¹ de NADPH; 1 mmol L⁻¹ de *t*-butil hidroperóxido (*t*BOOH); EDTA 0,005 mol L⁻¹ pH 7,0; GR 0,2 u mL.

A atividade da GR foi medida baseada na metodologia de Carlberg; Mannervik (1985), a qual o consumo do NADPH é estimado por meio da variação de absorvância acompanhado por dois minutos a 340 nm (ϵ 6,22), na presença do substrato GSSG. A metodologia consiste na redução da GSSG a GSH pela GR através da oxidação do NADPH. Para isto, 10 μ L de amostra foram adicionados em um meio de reação contendo:

tampão Fosfato de Potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0; EDTA 0,005 mol L⁻¹ pH 7,0; GSSG 0,002 mol L⁻¹; GSH 0,0046 g mL⁻¹ e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) 0,046 mg mL⁻¹.

O ensaio enzimático da G6PDH foi baseado na metodologia de Glock; McLean (1953), no qual a formação de NADPH é medida por meio da variação da absorvância a 340 nm (ϵ 6,22), durante um minuto. O ensaio consiste na redução de NADP⁺ à NADPH pela G6PDH usando como substrato a glicose-6-fosfato (G6P) e como cofator os íons de Mg²⁺ a partir do MgCl₂. Para isto, 5 μ L de amostra foram adicionados em um meio de reação contendo: tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4; G6P 0,42 mg mL⁻¹; MgCl₂ 0,2 mol L⁻¹ e NADP⁺ 0,1 mg mL⁻¹.

A atividade da GST foi mensurada seguindo o método descrito por Keen et al. (1976). Este método consiste na reação entre a GSH e o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), formando um ânion tiolato (TNB) de cor amarelada, causando um aumento na absorvância acompanhado a 340 nm (ϵ 9,6). Para tal análise foram adicionados 10 μ L da amostra a um meio de reação contendo: tampão fosfato de potássio 0,2 mol L⁻¹ pH 6,5; 1 mmol L⁻¹ de CDNB; 1 mmol L⁻¹ de GSH.

Todas as análises enzimáticas citadas acima foram feitas nas respectivas temperaturas a qual o experimento de exposição foi realizado (18; 23 e 28°C).

3.6. Análise dos níveis de peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com o auxílio de um aparelho cromatográfico modelo Nexera XR[®] (Shimadzu).

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos, foi detectada a presença do produto formado entre o MDA (produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), via HPLC-UV em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003b; ALMEIDA et al., 2004). Aproximadamente 200 mg de tecido foram homogeneizados em 1,5 mL de solução de sacarose 250 mmol L⁻¹, contendo 0,05% de BHT (butilhidroxitolueno) como agente antioxidante. Em seguida, 200 μ L de solução SDS 10% e 500 μ L de solução de TBA 0,4% diluído em HCl 0,2 mol L⁻¹ foram adicionados. As amostras foram então incubadas por 1h a 90 °C. Após este período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol e então injetadas (10 μ L) no HPLC por injetor automático, sendo assim

monitoradas a 532 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução fosfato de potássio monobásico 50 mmol L⁻¹, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocriticamente (1 mL min⁻¹). Foi utilizada uma coluna LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva-padrão, injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de padrões autênticos de MDA derivatizado com o TBA. Os dados foram expressos em nmol de TBARS g⁻¹ tecido (TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – sigla em inglês).

3.7. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase

As análises da atividade das esterases foram realizadas com o auxílio de um leitor espectrofotométrico de microplacas modelo Victor® X3 Multilabel (PerkinElmer).

A atividade da AChE foi feita segundo o método descrito por Ellman et al. (1961), modificado para leitor de microplacas. Este método se baseia na ação da enzima sobre o substrato acetiltiocolina, formando um produto tiólico (tiocolina), que por sua vez reage com o ditionitrobenzeno (DTNB) formando um composto de cor amarelada, o que causa aumento na absorvância que pode ser acompanhado a 412 nm (ϵ 13,6), durante um minuto. Para isto foram adicionados 40µL de amostra (extrato proteico tecido-específico) ao meio de reação contendo: tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 8; iodeto de acetiltiocolina 0,5 mmol L⁻¹ e DTNB 1 mol L⁻¹. O mesmo volume de amostras foi utilizado para o hepatopâncreas e para as brânquias.

A atividade da CbE também foi feita de acordo com Ellman et al. (1961), modificado para leitor de microplacas. Contudo, para esta enzima foi utilizado como substrato o feniltioacetato. O princípio deste método é o mesmo descrito anteriormente, onde a ação da enzima sobre o substrato feniltioacetato, forma o produto tiólico (tioacetato), que reage com o DTNB formando um composto de cor amarelada, que pode ser monitorado a 412 nm (ϵ 13,6), durante um minuto. Para isto, as amostras (extrato proteico tecido-específico) do hepatopâncreas foram diluídas na proporção 10:1 (v:v) em tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8, ao passo que, as amostras de brânquias não necessitaram diluição. Foram aplicados 10 µL da amostra diluída do hepatopâncreas, ou 5 µL da amostra de brânquias, ao meio de reação contendo: tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8; feniltioacetato iodado 0,15 mol L⁻¹ e DTNB 0,05 mol L⁻¹.

As análises enzimáticas citadas acima foram feitas nas respectivas temperaturas a qual o experimento de exposição foi realizado (18; 23 e 28 °C).

3.8. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi feita por meio do método de Bradford (1976), modificado para leitor de microplacas, com o auxílio de um leitor espectrofotométrico de microplacas modelo Victor[®] X3 Multilabel (PerkinElmer). O reagente de Bradford contém o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução ácida. Este ao se ligar às proteínas forma um complexo aniônico estável, causando uma visível mudança na coloração de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. O valor de absorvância é determinado por espectrofotometria em 595 nm. A comparação dos resultados à curva-padrão, com valores de concentração conhecidos (extrato de albumina bovina), fornece a concentração total de proteínas da amostra. Para isso foi adicionado 1 µL de amostra em 249 µL do reagente de Bradford.

A análise da quantidade de proteínas em cada amostra foi feita nas respectivas temperaturas a qual o experimento de exposição foi realizado (18; 23 e 28°C).

3.9. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do *software* STATISTICA 8[®] (StatSoft, Inc.). Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

Foram aplicados testes para avaliar a distribuição dos dados ao longo da curva de normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (Levene), onde dados com valores de $p \geq 0,05$ para ambos os testes foram considerados paramétricos.

A avaliação dos grupos contaminados em relação ao controle foi feita através de ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (dados não paramétricos).

Para avaliar a relação entre a influência das temperaturas, em cada grupo enzimático testado, nos dois sexos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, uma vez que todas as avaliações envolviam comparações de dados paramétricos com dados não paramétricos.

Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Capítulo I

Resposta das enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato em diferentes temperaturas

O diazinon (OP) e o carbaril (CM) são biocidas utilizados mundialmente no controle de organismos considerados pragas, tanto na agricultura quanto em ambientes domésticos. Contudo, estes compostos podem atingir ambientes aquáticos, principalmente, através do escoamento superficial.

Uma vez em contato com a fauna aquática, estes compostos podem levar a alterações metabólicas, como inibições enzimáticas e ao estresse oxidativo. Além disso, o aumento da temperatura pode diminuir a solubilidade de O₂ na água, alterar vias metabólicas e a expressão gênica.

Dessa forma o aumento da temperatura pode influenciar tanto a fisiologia dos organismos aquáticos quanto as respostas toxicológicas de tais organismos a biocidas presentes na água.

4. Objetivos

- Avaliar as respostas das enzimas GST, GPx, GR e G6PDH no hepatopâncreas e nas brânquias de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição ao diazinon e ao carbaril em concentrações subletais (10 e 100 µg L⁻¹) e em três diferentes temperaturas (18, 23 e 28 °C).

- Avaliar os níveis de estresse oxidativo induzidos por estes mesmos biocidas através da quantificação do MDA no hepatopâncreas e nas brânquias de machos e fêmeas de *D. pagei* nas diferentes temperaturas (18, 23 e 28 °C).

- Comparar as respostas bioquímicas entre machos e fêmeas de *D. pagei* a fim de identificar possíveis diferenças nas respostas toxicológicas entre esses dois grupos.

5. Resultados

5.1. Atividade das enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica após exposição aos biocidas diazinon e carbaril.

5.1.1. Diazinon

A exposição de fêmeas de *Dilocarcinus pagei* ao diazinon por sete dias, levou a diminuição na atividade da GPx nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 23 °C. Ao passo que nas brânquias foi observado diminuição da GST na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 23 °C (figura 6).

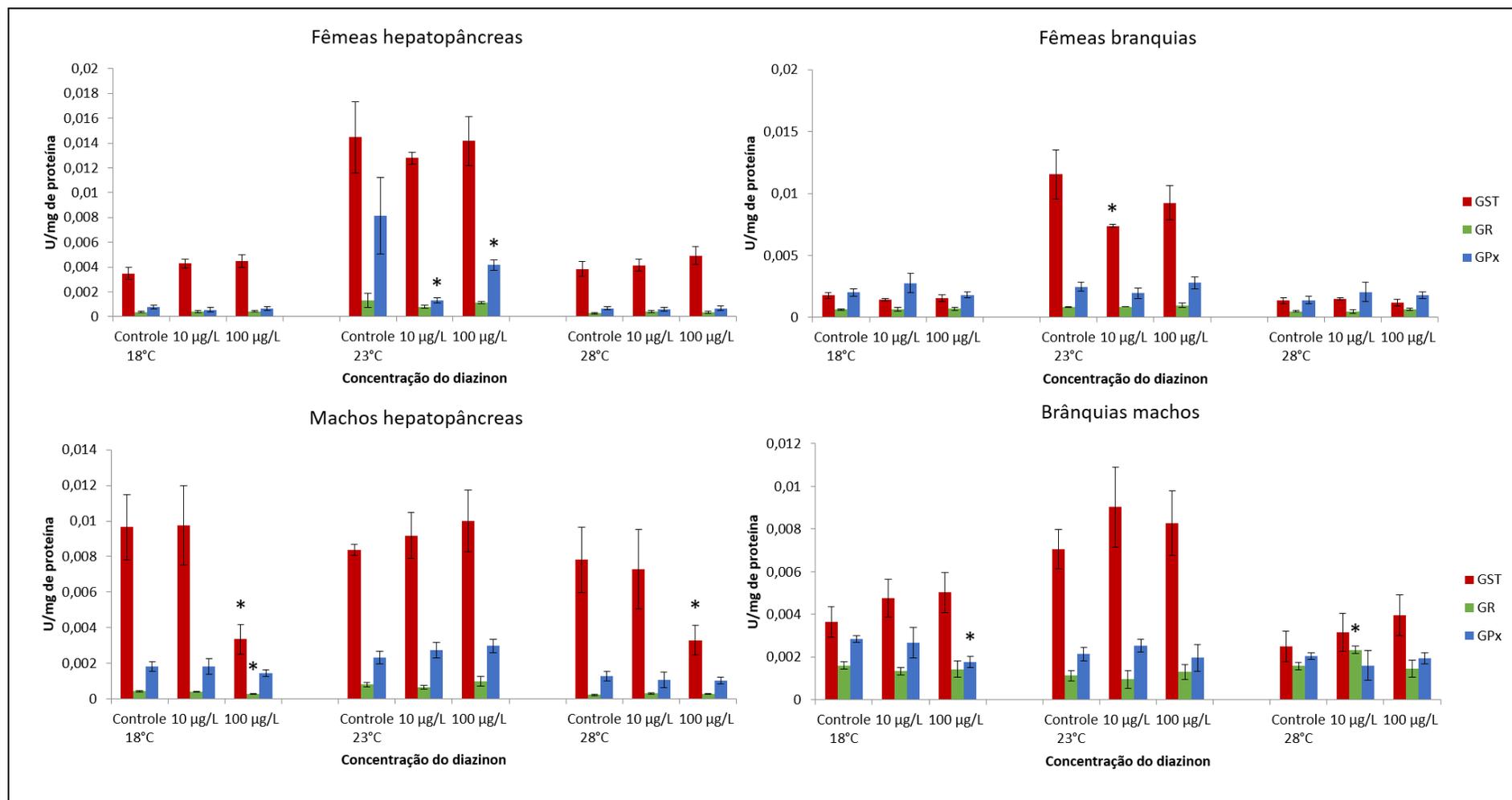


Figura 6. Atividades das enzimas GST, GR e GPx em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de *D. pageni* após exposição por sete dias ao diazinon. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle (P<0,05).

Quanto aos machos, os resultados apresentaram diminuição da GST na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ tanto em 18°C quanto em 28°C (figura 6). Também foi observado diminuição na atividade da GR na maior concentração ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) em 18°C no hepatopâncreas deste mesmo sexo. Nas brânquias, este grupo apresentou diminuição da GPx em 18°C na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e aumento da GR na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em 28°C (figura 6).

O aumento da temperatura apresentou relação com o aumento na atividade enzimática da GST no hepatopâncreas de fêmeas em 23°C , ao passo que nas brânquias deste mesmo gênero em 23°C houve influência da temperatura tanto na atividade enzimática quanto na inibição da GST em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do diazinon. Da mesma forma, este fator abiótico apresentou relação com as respostas toxicológicas observadas na GST do hepatopâncreas de machos em 18 e 28°C , ao passo que nas brânquias desse sexo a temperatura apresentou relação apenas com o aumento da atividade dessa enzima em 23°C ($p < 0,0001$).

Quanto a GR, a temperatura mostrou relação com as alterações na atividade dessa enzima observadas na temperatura de 23°C do hepatopâncreas tanto de fêmeas quanto de machos. Nas brânquias houve relação do aumento da temperatura com as alterações na atividade da GR em 23°C em machos, assim como a resposta toxicológica em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do diazinon a 28°C ($p = 0,0003$).

No que diz respeito a GPx, a temperatura apresentou relação tanto com o aumento na atividade enzimática quanto nas respostas toxicológicas no hepatopâncreas das fêmeas em 23°C e com a diminuição na atividade dessa enzima em 28°C ($p < 0,0001$), porém, nas demais análises não foram observadas alterações dessa enzima relacionadas a temperatura.

Ao analisar a resposta apresentada pela G6PDH observa-se diminuição na atividade desta enzima na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em 18 e 23°C no hepatopâncreas de machos expostos ao diazinon. Por outro lado, as fêmeas apresentaram aumento da G6PDH na maior concentração em 23°C (figura 7).

No que diz respeito às brânquias de indivíduos expostos ao diazinon, pode-se observar diminuição na atividade da G6PDH em fêmeas na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle a 28°C . Por outro lado, observa-se aumento em sua atividade na maior concentração ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) a 23°C (figura 7). Machos não apresentaram alterações significantes da G6PDH nas brânquias.

O aumento da temperatura apresentou relação com o aumento na atividade da G6PDH no hepatopâncreas de machos na temperatura de 23 °C e na resposta toxicológica observada neste mesmo órgão em fêmeas expostas a 100 µg L⁻¹ a 23 °C. Quanto às brânquias, em fêmeas, o aumento da temperatura apresentou relação tanto com a diminuição na atividade da G6PDH em 23 °C quanto como o aumento em sua atividade em 28 °C. Da mesma forma, este fator abiótico apresentou influência nas respostas toxicológicas apresentadas por fêmeas entre 23 e 28 °C expostas a 100 µg L⁻¹ (p<0,0001). Machos não apresentaram alterações na atividade da G6PDH relacionada a temperatura neste órgão.

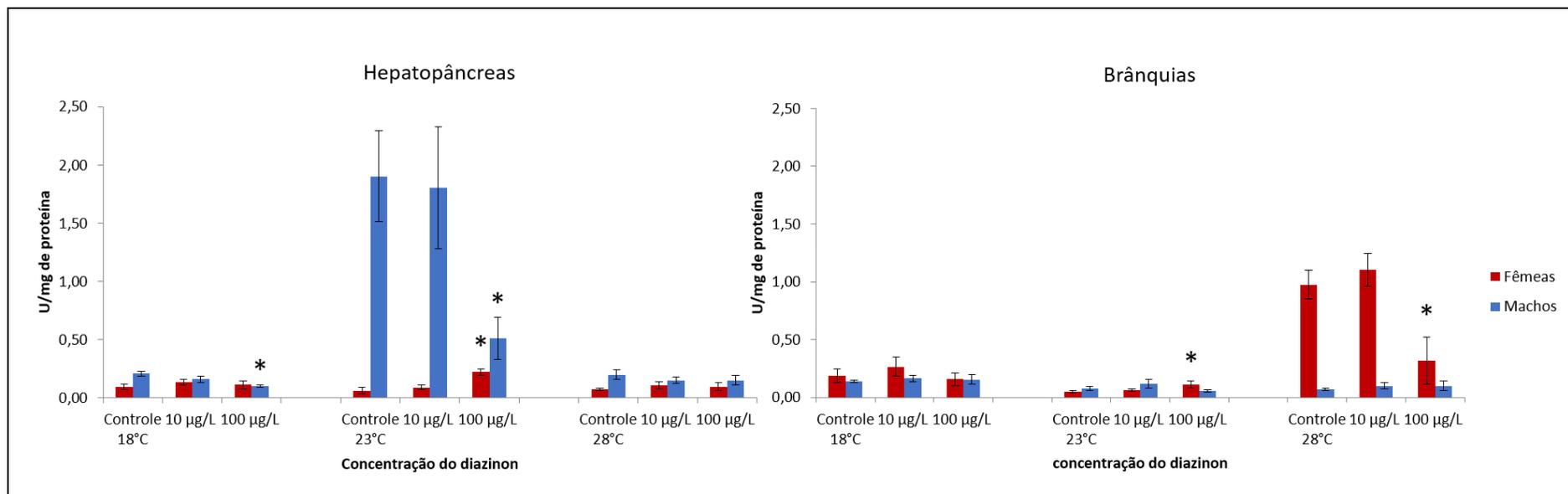


Figura 7. Atividade da enzima G6PDH em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição por sete dias ao diazinon. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle (P<0,05).

Apesar das alterações observadas nas enzimas antioxidantes em resposta ao diazinon, foi observado aumento nos níveis de MDA apenas no hepatopâncreas de indivíduos expostos a este biocida a 23 °C, onde tanto machos quanto fêmeas apresentaram aumento nos níveis de MDA em 10 µg L⁻¹ e apenas machos apresentaram aumento em 100 µg L⁻¹ (figura 8). Em brânquias não foram observadas alterações significantes em relação ao controle.

As alterações nos níveis de MDA observadas no hepatopâncreas de machos e fêmeas em 23°C apresentaram relação à influência do aumento da temperatura, assim como a diminuição nos níveis de MDA observados nas brânquias de fêmeas em 23 e 28 °C (p=0,0003).

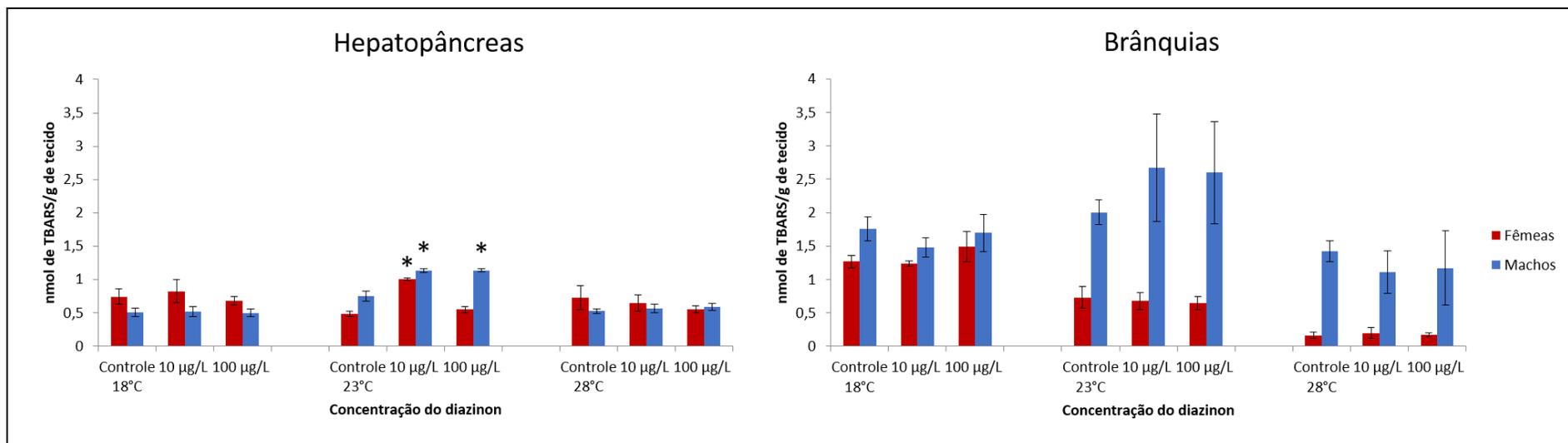


Figura 8. Níveis de MDA no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição por sete dias ao diazinon. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

5.1.2. Carbaril

No que diz respeito às respostas antioxidantes ao carbaril, em fêmeas foi observado aumento na atividade da GST na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a 18°C no hepatopâncreas (figura 9). Nessa mesma temperatura, foi observado aumento na atividade da GR na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e da GPx em $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, nas brânquias foi observado aumento apenas na atividade da GR na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a 18°C (Figura 9).

Os machos expostos ao carbaril apresentaram aumento apenas da GST na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a 28°C no hepatopâncreas (figura 9). As brânquias de organismos expostos ao carbaril não apresentaram respostas significantes para as enzimas antioxidantes testadas (figura 9).

O aumento da temperatura apresentou relação com o aumento na atividade da GST no hepatopâncreas de fêmeas em 23 e 28°C , assim como com a resposta toxicológica observada em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do carbaril em 18°C . Porém, a temperatura não apresentou influência na atividade dessa enzima nas brânquias de fêmeas. Por outro lado, em machos a temperatura apresentou influência significativa apenas na resposta toxicológica apresentada pela GST do hepatopâncreas em exposição a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do carbaril em 28°C ($p < 0,0001$).

No que diz respeito a GR, as brânquias de machos apresentaram influência da temperatura no aumento de sua atividade em 23°C . Da mesma forma, em fêmeas, o aumento na atividade desta enzima nas brânquias expostas a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do carbaril apresentaram relação com a temperatura em 18°C . No hepatopâncreas de fêmeas, a temperatura apresentou relação tanto com o aumento na atividade da GR em 23°C quanto como sua resposta a exposição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ao carbaril em 18°C ($p = 0,003$).

Quanto a GPx, a temperatura apresentou influência na resposta toxicológica observada no hepatopâncreas de fêmeas expostas a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do carbaril em 18°C , assim como o aumento na atividade dessa enzima em 23°C . No que diz respeito às brânquias, o aumento da temperatura influenciou as variações observadas na atividade da GPx tanto em machos quanto em fêmeas ($p = 0,02$).

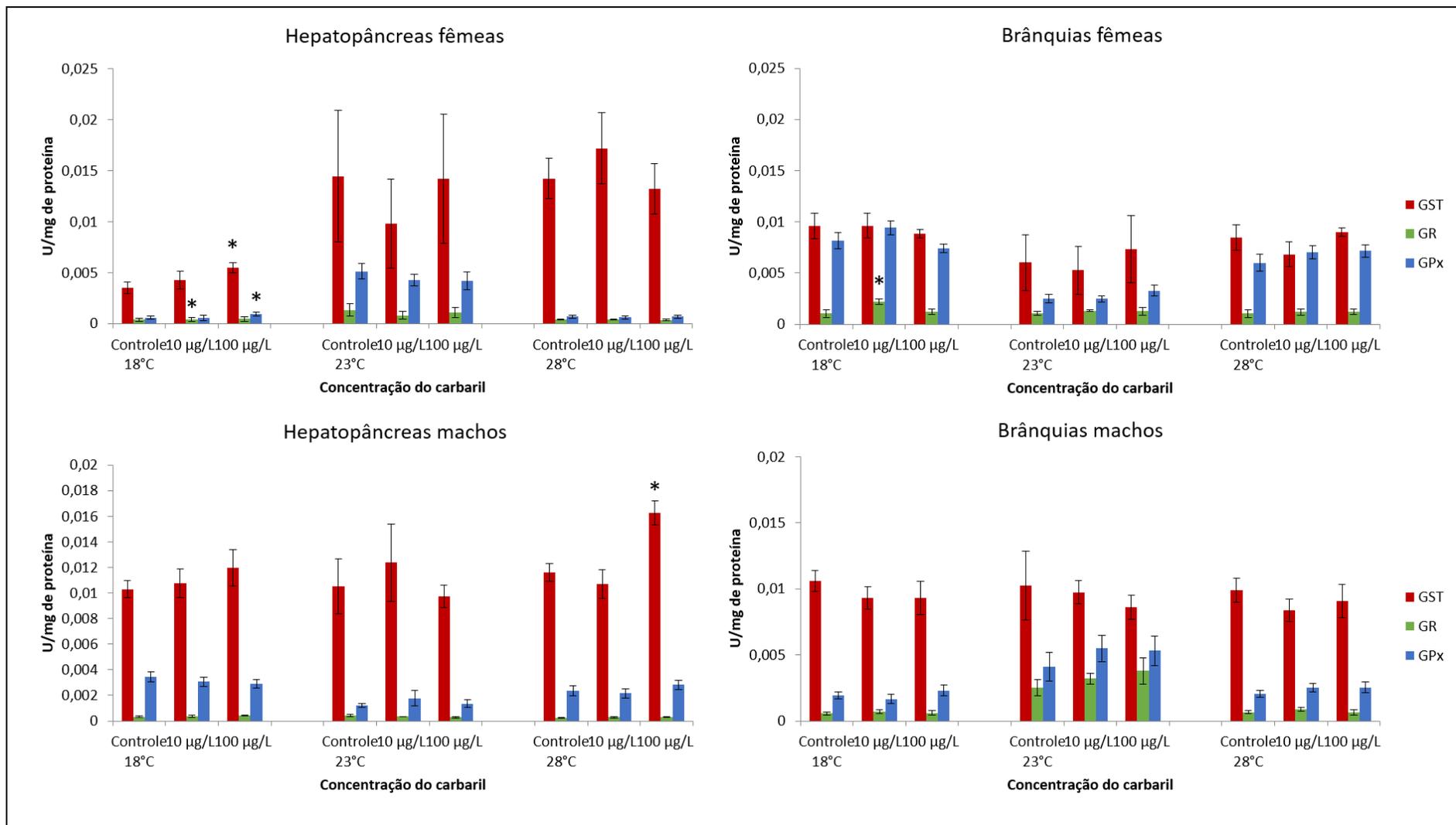


Figura 9. Atividades das enzimas GST, GR e GPx em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de *D. pageni* após exposição por sete dias ao carbaryl. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

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 (figura 10).

A temperatura apresentou influência nas alterações da atividade dessa enzima no hepatopâncreas de fêmeas em 18 e 28°C , assim como na resposta toxicológica ao carbaril nas brânquias de fêmeas observadas em 18°C e com a diminuição na atividade da G6PDH a 23°C ($p=0,006$).

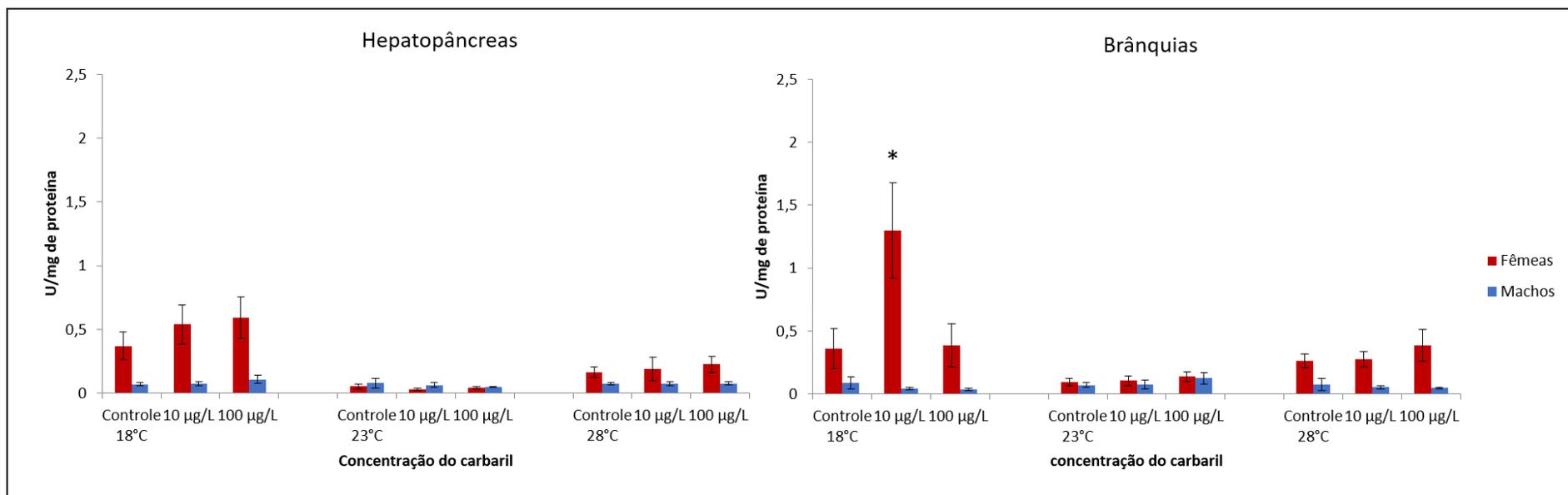


Figura 10. Atividade da enzima G6PDH em brânquias e hepatopâncreas de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição por sete dias ao carbaril. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

No hepatopâncreas, houve diminuição nos níveis de MDA em machos expostos ao carbaril na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em $18 \text{ }^\circ\text{C}$ e nas duas concentrações ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$) a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, já em fêmeas, nesse órgão, foi observado aumento nos níveis de MDA apenas em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (figura 11). Quanto as brânquias, apenas fêmeas apresentaram aumento nos níveis de MDA na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em 18 e $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 11).

O aumento da temperatura apresentou relação com as alterações nos níveis de peroxidação lipídica observadas em machos, em $18 \text{ }^\circ\text{C}$ e em machos e fêmeas a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ no hepatopâncreas. Quanto as brânquias, a temperatura apresentou influência nos níveis de MDA nas três temperaturas testadas, em ambos os sexos ($p=0,002$).

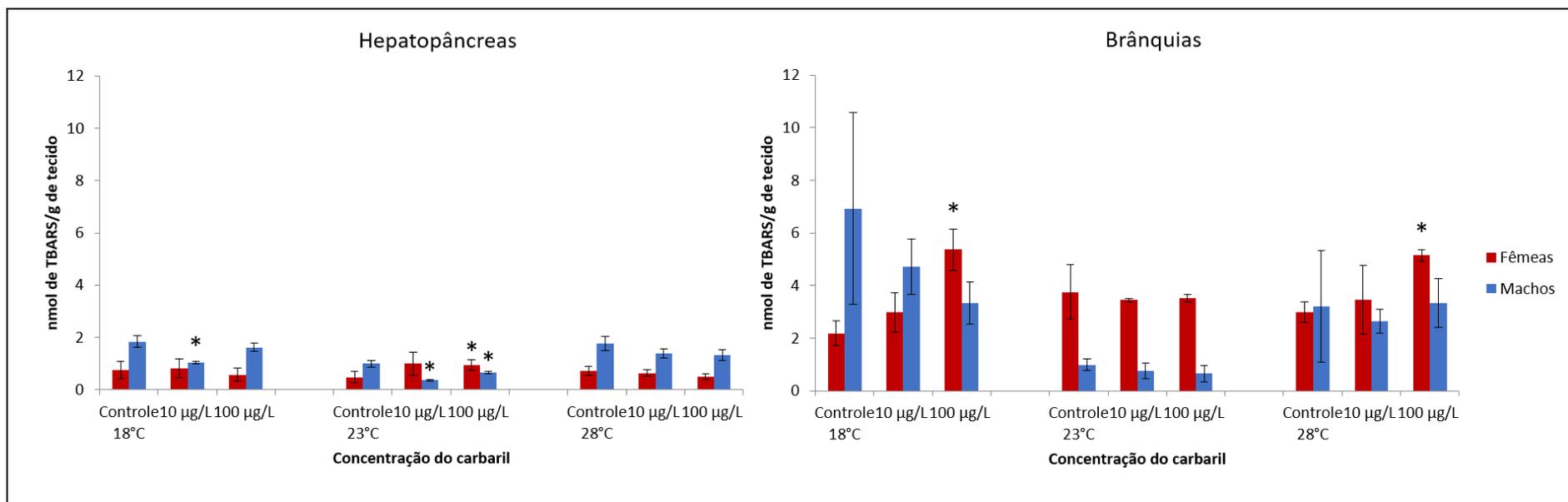


Figura 11. Níveis de MDA no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de *D. pageni* após exposição por sete dias ao carbaryl. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

6. Discussão

6.1. Atividade das enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica pós exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.

6.1.1. Diazinon

No presente estudo foi observado diminuição da GST e da GPx no hepatopâncreas de machos e fêmeas após exposição ao diazinon. Este resultado pode ser atribuído a inibição dessas enzimas pelo diazinon. Trídico et al. (2010) e Silva et al. (2014) também relataram diminuição da GST e da GPx em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao diazinon, assim como Hodge et al. (2000) no inseto *Micromus tasmaniae* exposto a este mesmo biocida. Estes autores atribuíram tal diminuição a uma possível inibição pela ação do diazinon, o que corrobora com os resultados observados em *D. pagei*. Porém, este mecanismo inibitório ainda não é muito bem compreendido na literatura científica.

Além disso, a GST foi inibida apenas no hepatopâncreas de machos e nas brânquias de fêmeas, ao passo que a GPx foi inibida no hepatopâncreas de fêmeas e nas brânquias de machos. De acordo com Van der Oost et al. (2003) e Slaninova et al. (2009), em animais aquáticos, o sexo do indivíduo analisado pode apresentar diferenças tanto na atividade enzimática quanto nas respostas a ação de biocidas, assim como, nas adaptações a temperatura do ambiente a qual estes indivíduos se encontram. Além disso, é sugerido na literatura que em invertebrados aquáticos, diferenças na regulação endócrina entre os sexos pode alterar diversas vias metabólicas, dentre elas a biotransformação de xenobióticos e conseqüentemente, levar a diferenças nas respostas toxicológicas (McCLELLAN-GREEN et al., 2007).

Dessa forma, é razoável supor que as alterações metabólicas relacionadas a regulação endócrina entre os sexos pode ter influenciado as respostas apresentadas pela GST e GPx frente ao diazinon nas diferentes temperaturas, em *D. pagei*. Porém, a relação entre o sistema endócrino de crustáceos e as respostas antioxidantes a biocidas ainda é pouco conhecida na literatura.

No que diz respeito a GR, embora talvez não esteja diretamente envolvida na defesa antioxidante, a GR promove a manutenção da homeostase entre GSH/GSSG sob condições de estresse. A GR catalisa a transformação da forma dissulfeto da glutatona (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), com concomitante oxidação do NADPH a NADP⁺ (VAN DER OOST et al., 2003).

No presente trabalho a GR apresentou diminuição no hepatopâncreas de machos em 18 °C quando expostos a concentração de 100 µg L⁻¹ e aumento nas brânquias em 28 °C expostos a 10 µg L⁻¹.

Conforme mencionado acima, esta enzima tem como principal função a manutenção dos níveis de GSH (tripeptídeo utilizado como doador de elétrons na biotransformação de xenobióticos). Ao doar elétrons durante o processo de biotransformação, a GSH se oxida gerando GS-, que por sua vez pode se ligar a uma outra GS- formando GSSG (FERREIRA et al., 2007). A GR então retira elétrons do NADPH e os transfere para GSSG, reciclando, assim duas GSH (VAN DER OOST et al., 2003). A diminuição na atividade da GR no hepatopâncreas de machos apresentou forte correlação (correlação de Spearman) com a inibição da GST nesse mesmo experimento (p=0,03; r=0,90) (figura 6), dessa forma podemos supor que a GSH passou a ser menos oxidada pela conjugação com o biocida, por conta da inibição da GST, aumentando assim seus níveis celulares, o que diminuiu a necessidade de sua redução, levando a diminuição na atividade da GR (BANAEI et al., 2013). Além disso, a diminuição da conjugação da GSH ao diazinon diminui sua excreção, o que prejudica a neutralização de sua ação tóxica no organismo (VAN DER OOST et al., 2003).

Por outro lado, nas brânquias de machos à temperatura 18 °C (figura 6), apesar de não ser estatisticamente significativa, podemos observar aumento na atividade da GST, o que aumenta a demanda de GSH, requerendo assim maior atuação da GR. De acordo com Elia et al. (2006), em um estudo de campo utilizando o lagostim europeu *Procambarus clarkii*, o aumento na atividade da GR no hepatopâncreas dessa espécie apresentou relação ao aumento do consumo de GSH por enzimas antioxidantes, o que corrobora com as observações feitas em *D. pagei*.

Quanto a G6PDH, esta é uma enzima chave na regulação da via de desvio das pentoses, esta enzima converte a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato (composto este que regula sua atividade) (JUGDALE; GORDON, 1997; BAINY et al., 2000) e reduz NADP⁺ a NADPH (URICH, 1994; JUGDALE; GORDON, 1997).

Tranulis et al. (1991) e Robert; Gray (1972), relataram influência da temperatura na atividade da G6PDH em trutas (*Salmo gairdneri*) e no caranguejo *Callinectes sapidus*, respectivamente. De acordo com esses autores, o aumento da temperatura pode alterar a atividade de enzimas relacionadas a via de desvio das pentoses como um fenômeno transitório associado a manutenção da demanda energética, pela reorganização metabólica frente ao estresse térmico e ao processo de aclimação a temperatura.

Segundo Kuo; Hsieh (2006), o aumento na atividade da G6PDH em animais aquáticos (peixes e invertebrados) sob estresse térmico atua como uma importante via auxiliar de suprimento energético até que o organismo se aclimate a nova temperatura, porém o tempo necessário para aclimação a temperatura é variável, podendo levar vários dias para que seus níveis energéticos se estabilizem, dependendo da espécie.

Ainda, segundo Kuo; Hsieh (2006), a elevação da temperatura a níveis próximos do limite tolerável estimula maior liberação de cortisol e catecolaminas, o que aumenta a taxa de glicose e lactato na hemolinfa de invertebrados aquáticos, podendo assim diminuir a atuação da G6PDH em tal condição de estresse. Em *D. pagei*, os machos apresentaram maior atividade da G6PDH no hepatopâncreas apenas na temperatura de 23 °C, esse dado sugere que nessa temperatura intermediária a via de desvio das pentoses trabalha de forma mais intensa que em temperaturas maiores no processo de aclimação. Por outro lado, em fêmeas, a atividade da G6PDH foi maior nas brânquias a 28 °C, o que indica maior dificuldade de aclimação de seu sistema respiratório a temperaturas elevadas.

Além disso, ao comparar a atividade da G6PDH entre os controles da figura 7 e 10, podemos observar que na figura 10 o processo de aclimação parece estar completo, uma vez que há pouca diferença na atividade desta enzima nas temperaturas testadas. De acordo com Sánchez-Paz et al. (2006), em períodos de intermuda os caranguejos acumulam grande quantidade de energia em forma de glicogênio e triglicérides. Ao passo que o período da ecdise se aproxima, estes organismos diminuem a alimentação e seus níveis energéticos começam a declinar. Dessa forma, podemos concluir que, nos experimentos referentes a figura 7, estes indivíduos podem estar mais próximos da ecdise, assim, seus níveis de estoque de energia seriam menores, o que levou ao aumento na atividade da G6PDH como alternativa a demanda energética requerida para a manutenção da homeostase frente ao aumento da temperatura.

Além do mais, no presente estudo, foi observada diminuição na atividade da G6PDH no hepatopâncreas de machos de *D. pagei* expostos a 100µg L⁻¹ do diazinon em 18 e 23 °C e em brânquias de fêmeas expostas a esta mesma concentração em 28 °C. A atividade da G6PDH é regulada principalmente pela concentração de NADPH (NIETO et al., 2010). Como não houve aumento na atividade das enzimas antioxidantes nas condições onde observamos diminuição da G6PDH, podemos concluir que o consumo de NADPH diminuiu, causando seu acúmulo, o que levou a diminuição na atividade da G6PDH (NIETO et al., 2010; BANAEI et al., 2013).

Por outro lado, foi observado aumento nos níveis de G6PDH no hepatopâncreas e nas brânquias de fêmeas expostas ao diazinon a 23 °C. Observações feitas por Bhavan e Geraldine (2000) mostram que a exposição do camarão *Macrobrachium malcomsonii* ao diazinon levou a alterações estruturais e diminuição nos níveis de glicogênio no hepatopâncreas dessa espécie. Nagato et al. (2016) relataram diminuição nos níveis de aminoácidos e maior demanda no consumo de glicose e lactato no microcrustáceo *Daphnia magna* exposto ao diazinon nas concentrações de 0,04 e 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dessa forma, podemos concluir que o estresse gerado pelo diazinon pode ter comprometido a produção de energia no hepatopâncreas e nas brânquias em fêmeas de *D. pagei*, aumentando, assim, a demanda energética para a manutenção da homeostase nesses órgãos. Além disso, a figura 6 mostra que a atividade das enzimas antioxidantes diminuiu ou permaneceu inalterada no hepatopâncreas e nas brânquias de fêmeas a 23 °C. Uma vez que essas enzimas não requerem aumento nos níveis de NADPH, a G6PDH pode ter aumentado sua atividade para suprir parte da demanda energética requerida pelo hepatopâncreas e pelas brânquias, por conta da exposição ao diazinon.

A peroxidação lipídica é um dos principais processos induzidos pelo estresse oxidativo (NARRA, 2014). Este processo ocorre quando a geração de ERO excede a capacidade antioxidante do organismo ou de determinado órgão (BIANCHINI, MONSERRAT, 2007; TONGBAI; DAMRONGPHOL, 2011).

A comparação da atividade da GPx entre os grupos controle no hepatopâncreas de fêmeas de *D. pagei*, apresentou aumento de oito vezes em 23 °C comparados a 18 e 28 °C. Além disso, o diazinon inibiu mais acentuadamente a atividade da GPx de fêmeas expostas a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em comparação a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, na temperatura de 23 °C. Este dado indica uma superprodução de H_2O_2 na temperatura intermediária (23 °C), livre da ação do diazinon. Por outro lado, os níveis de MDA no grupo controle foi menor na temperatura de 23 °C em comparação as demais temperaturas. Estes dados indicam que o aumento na atividade da GPx no controle do hepatopâncreas de fêmeas foi suficiente para neutralizar a superprodução de H_2O_2 e proteger esse órgão de danos oxidativos causados por esse composto (KONG et al., 2008). Ao passo que a inibição dessa enzima causada pelo diazinon nos tratamentos levou ao aumento nos níveis de MDA, o que indica aumento na peroxidação lipídica, em decorrência do acúmulo de H_2O_2 . A inibição da GPx também foi relatada por Tu et al. (2012) no camarão *Penaeus monodon* exposto a piretróides, de acordo com esses autores, tal resultado explica o aumento nos níveis de

peroxidação lipídica nas concentrações onde houve inibição dessa enzima pelo acúmulo de H₂O₂.

Além disso, em *D. pagei* houve aumento da GPx em relação a temperatura apenas em 23 °C, ao passo que em 28 °C a atividade dessa enzima diminuiu. Segundo Hansen et al. (2007) e Cottin et al. (2010), em estudos avaliando a expressão gênica da GPx no copépode *Calanus finmarchicus* e no camarão *Rimicaris exoculata*, respectivamente, relataram que em temperaturas próximas a 30 °C, esses crustáceos diminuem a capacidade de regular a expressão de genes relacionados a defesa antioxidante, como a GPx. Por outro lado, conforme a temperatura aumenta, ocorre aumento na expressão dos genes que codificam a HSP (*Heat shock protein*) e a enzima tioredoxina redutase (TrxR), ambas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo. O descontrole na expressão gênica poderia explicar a baixa atividade da GPx em 28 °C em *D. pagei* e a indução de outras vias metabólicas, como da HSP e da TrxR, pode ter protegido esses organismos da peroxidação lipídica na ausência da GPx nessa temperatura, uma vez que não houve aumento nos níveis de MDA.

No que diz respeito aos machos de *D. pagei*, houve aumento nos níveis de MDA no hepatopâncreas, nas duas concentrações do diazinon testadas, na temperatura de 23 °C, porém não houve alterações significantes nas enzimas antioxidantes avaliadas. É conhecido que a elevação da temperatura combinado com a presença de compostos OPs, pode aumentar os danos oxidativos a biomembranas de crustáceos aquáticos, através da superprodução de ERO (DANDAPAT et al., 2003). Trabalhos realizados por Matozzo et al. (2011) e Paital; Chainy (2013), relatam maior aumento nos níveis de peroxidação lipídica em caranguejos machos da espécie *Carcinus aestuari* e *Scylla serrata*, quando combinados os efeitos do aumento da temperatura e a presença de compostos OPs. Segundo esses autores, a capacidade antioxidante dos machos pode ser excedida pelo aumento na absorção dos biocidas e pelos efeitos da temperatura em seu metabolismo basal de forma diferente das fêmeas, por conta de variações entre sua fisiologia.

Por outro lado, em machos expostos ao diazinon a 28 °C observamos inibição da GST em 100 µg L⁻¹ desse composto e diminuição na atividade da GPx relacionado a influência da temperatura, porém não há aumento nos níveis de MDA nessa condição. Esse resultado pode ser explicado pela atuação protetora ao estresse oxidativo de outras vias metabólicas termossensíveis de ação antioxidante, como a HSP e a TrxR, (HANSEN et al., 2007; COTTIN et al., 2010), conforme sugerido anteriormente.

No que diz respeito às brânquias, ao contrário do hepatopâncreas, não houve aumento nos níveis de MDA em *D. pagei*, frente a exposição ao diazinon, em nenhuma das temperaturas testadas. Por outro lado, o aumento da temperatura diminuiu os níveis de MDA em fêmeas.

De acordo com resultados obtidos por Desouky et al. (2013) no lagostim *P. clarkii*, o hepatopâncreas apresenta maior capacidade de acúmulo de compostos OP que as brânquias, mesmo em pouco tempo de exposição (oito dias) por conta da maior concentração de lipídios no hepatopâncreas e da alta lipofilicidade do composto. De acordo com esses autores, o maior acúmulo dessas substâncias no hepatopâncreas pode aumentar a susceptibilidade desse órgão aos efeitos dos OP, incluindo lesões de membrana por lipoperoxidação em decorrência da biotransformação desses compostos. Além disso, uma vez que o acúmulo de biocidas OPs é menor nas brânquias, a atividade das enzimas antioxidantes nesse órgão pode ter sido suficiente para proteção contra os danos oxidativos a biomembranas (VAN DER OOST et al., 2003). Estes resultados poderiam explicar os menores efeitos do diazinon nos níveis de MDA nas brânquias em relação ao hepatopâncreas em *D. pagei*.

6.1.2. Carbaril

No presente estudo, pôde-se observar aumento na atividade da GST, GPx e GR no hepatopâncreas de fêmeas expostas ao carbaril a 18 °C e em GST de machos a expostos a este mesmo composto a 28 °C. Da mesma forma, observou-se aumento da GR nas brânquias de fêmeas expostas ao carbaril a 18 °C.

Vários trabalhos na literatura científica têm demonstrado aumento nas enzimas antioxidantes de animais aquáticos frente a exposição ao carbaril. Vioque-Fernández et al. (2009), relataram aumento da GST no hepatopâncreas do lagostim *P. clarkii* após exposição ao carbaril nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹. Matos et al. (2007), descreveram aumento na atividade da GR hepática em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após 14 dias de exposição a este mesmo biocida a 0,25 e 0,5 mg L⁻¹. Ferrari et al. (2011), também relataram aumento na atividade da GST em girinos de *Rhinella arenarum* após 2 dias de exposição ao carbaril nas concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹. Ferrari et al. (2007), observaram aumento na atividade da GST hepática em truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) juvenis após exposição a 3 mg L⁻¹ por dois dias ao carbaril.

O carbaril induz o aumento de ERO em animais aquáticos principalmente pela sua biotransformação, formando 1-naftol. Na tentativa de neutralizar as ERO formadas, ocorre o aumento na atividade das enzimas antioxidantes, GST e GPx por exemplo, o que leva a diminuição nos níveis de GSH, por conta do consumo dessa substância através da catálise realizada por tais enzimas. O maior consumo de GSH aumenta os níveis de GSSG, o que por sua vez leva ao aumento na atividade da GR a fim de reciclar maiores quantidades de GSH para neutralizar os radicais livres formados durante a biotransformação do biocida (MANNERVIK; DANIELSON, 1988; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009). Dessa forma, o aumento nas enzimas antioxidantes observado em *D. pagei* podem ter ocorrido para neutralização das ERO geradas pela biotransformação do carbaril.

Quanto a G6PDH, conforme apresentado nos resultados, após exposição ao carbaril, apenas brânquias de fêmeas expostas a concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ deste composto a 18°C apresentaram aumento dessa enzima. Este resultado também poderia explicar o aumento da GR nessas mesmas condições em fêmeas (figura 9), uma vez que o aumento da G6PDH pode ter suprido a demanda de NADPH para a manutenção da homeostase da GSH.

Por outro lado, em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do carbaril, nessa mesma temperatura (18°C) não houve aumento significativo da G6PDH. Da mesma forma, nessa mesma concentração em 18°C não houve aumento na atividade da GR. Dessa forma, podemos concluir que a GSH passou a ser menos consumida, o que por sua vez diminuiu o consumo de NADPH, diminuindo assim a atividade da G6PDH (VAN DER OOST et al., 2003; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009).

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica em *D. pagei* após exposição ao carbaril, em machos, os níveis de MDA diminuíram no hepatopâncreas e não foram alterados nas brânquias. Por outro lado, em fêmeas, foi observado aumento nos níveis de MDA tanto no hepatopâncreas quanto nas brânquias.

O aumento nos níveis de MDA no hepatopâncreas de fêmeas foi observado apenas na temperatura de 23°C , ao passo que em brânquias tal aumento pode ser observado tanto em 18°C quanto em 28°C . Por outro lado, a diminuição nos níveis de MDA no hepatopâncreas de machos ocorreu apenas em 18°C e 23°C .

Dutra et al. (2008) também relataram maior aumento nos níveis de peroxidação lipídica em fêmeas do microcrustáceo anfípode *Hyaella curvispina* em relação aos machos. Segundo esses autores, tal diferença poderia estar relacionada a uma

variabilidade nos mecanismos bioquímicos entre os sexos em função da composição do fenótipo de machos e fêmeas, relacionada a expressão de hormônios, por exemplo (HASEGAWA et al., 1993; MONTOYA, 2001; HOMOLA; CHANG, 1997; SAINATH et al., 2013).

Em um trabalho realizado com o peixe dulcícola *Tinca tinca* expostos ao carbamato carbofuran, Hernández-Moreno et al. (2010) observaram aumento nos níveis de MDA hepático apenas em exposições de longo período (70-80 dias). Além disso, Matos et al. (2007) relataram aumento na atividade de enzimas antioxidantes e GSH após 14 dias de exposição em tilápias (*O. niloticus*) ao carbaril. Da mesma forma, Toumi et al. (2016) demonstraram aumento na mortalidade e diminuição na fecundidade em *D. magna* após 21 dias de exposição a este mesmo biocida. Estes trabalhos sugerem relação entre longos períodos de exposição e as respostas fisiológicas apresentadas por organismos aquáticos frente ao carbaril. A literatura científica indica que o aumento do estresse oxidativo nesses organismos ocorre pela formação do metabólito 1-naftol (MATOS et al., 2007). Este metabólito é formado durante a fase I da biotransformação pelas enzimas monooxigenases do citocromo P450, com subsequente conjugação por enzimas de fase II, como a GST, por exemplo, formando naftol-sulfato, metabólito mais hidrofílico e passível de excreção (ASHAUER et al., 2012). Porém, a biotransformação do carbaril é lenta em invertebrados aquáticos, o que exige grande acúmulo desse biocida em tecidos para induzir estresse oxidativo (KAYHAN et al., 2013). Dessa forma, podemos concluir que a diminuição nos níveis de peroxidação lipídica através da análise do MDA em machos de *D. pagei* pode ser explicada pelo curto período (sete dias) a qual esses organismos foram expostos. Uma vez que a biotransformação do carbaril é lenta, a formação de ERO foi menor, assim, a atividade das enzimas antioxidantes foram suficientes para neutralizar a formação de ERO, o que protegeu esses organismos do estresse oxidativo.

Por outro lado, as fêmeas de *D. pagei* apresentaram aumento nos níveis de MDA e este aumento foi mais pronunciado nas brânquias. De acordo com Desouky et al. (2013), o hepatopâncreas é o órgão que apresenta maior capacidade de acúmulo de biocidas, seguido pelas brânquias. Além disso, o hepatopâncreas é o principal órgão de metabolismo e desintoxicação do organismo em crustáceos, apresentando alta atividade de vias metabólicas relacionadas a esta função (ARUN et al., 2006), ao passo que as brânquias representam a primeira via de entrada de compostos tóxicos e pode ser o primeiro órgão a apresentar efeitos a exposição subletal (DESOUKY et al., 2013). Dessa

forma, podemos concluir que o maior aumento nos níveis de peroxidação lipídica apresentada pelas brânquias em fêmeas de *D. pagei* pode ser devido ao seu contato constante e direto com o carbaril e como primeira via de absorção desse composto, esse órgão pode ter excedido sua capacidade protetora, enquanto que no hepatopâncreas a proteção foi maior pela sua alta capacidade de metabolização e desintoxicação.

Além do mais, conforme mencionado anteriormente, a maior taxa de peroxidação lipídica observada em fêmeas de *D. pagei* em relação aos machos, pode ser explicado por diferenças relacionadas a variabilidade nos mecanismos bioquímicos entre os sexos, como a regulação hormonal, por exemplo (DUTRA et al., 2008). De fato, a literatura científica concorda que, em crustáceos, o processamento hormonal pode ter relação com alterações enzimáticas e com diferentes respostas observadas entre os sexos frente a exposição a contaminantes aquáticos. De acordo com James; Boyle (1998) e Hansen et al. (2008), o citocromo P450 está relacionado ao metabolismo de vários hormônios esteroides em crustáceos e a indução dessa via metabólica coincide com períodos de ecdise, reprodução e privação nutricional. Segundo Rewitz et al. (2006), o citocromo P450 apresenta indução acentuada nas brânquias de fêmeas do caranguejo *Carcinus maenas* em períodos de intermuda. Esses autores relataram maior indução na regulação gênica da CYP4C das brânquias de fêmeas em relação ao hepatopâncreas. De acordo com Koenig et al. (2012), a indução das quatro primeiras famílias das CYPs (CYP1-CYP4) estão relacionadas ao processamento hormonal, da ecdisona, por exemplo, e no metabolismo de xenobióticos, porém, ainda pouco se conhece a respeito da atuação dessas vias no metabolismo de biocidas em crustáceos.

Dessa forma, podemos inferir que a indução de algumas enzimas do citocromo P450 em fêmeas de *D. pagei*, estimulada pelo processamento hormonal, pode ter acelerado a biotransformação do carbaril, o que aumentou a formação de ERO, aumentando assim os níveis de peroxidação lipídica nesse sexo, tanto no hepatopâncreas quanto nas brânquias. Porém, ainda pouco se conhece a respeito da atuação dessa via metabólica de fase I na biotransformação de compostos carbamatos em crustáceos.

Capítulo II

Inibição das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato em diferentes temperaturas.

O padrão inibitório das enzimas AChE e CbE são largamente utilizadas nos estudos dos efeitos tóxicos dos biocidas diazinon (OP) e carbaril (CM). A biotransformação do diazinon em diazoxon promove o aumento em sua toxicidade, sendo este capaz de se ligar covalentemente ao sítio ativo dessas enzimas, inibindo-as. Por outro lado, o carbaril inibe a atividade da AChE, ao passo que é metabolizado pela CbE em 1-naftol.

Além disso, alguns fatores abióticos, tais como temperatura e salinidade, também podem alterar a atividade dessas enzimas. Dessa forma, o estudo dos efeitos do aumento da temperatura combinado com a presença de biocidas OP e CM podem fornecer informações a respeito da influência de tal fator abiótico na toxicidade destes biocidas.

7. Objetivos

- Avaliar a inibição da AChE e da CbE no hepatopâncreas e nas brânquias de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição ao diazinon e ao carbaril nas concentrações (10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) nas três temperaturas testadas (18, 23 e 28 °C).

- Comparar estas respostas bioquímicas entre machos e fêmeas de *D. pagei* a fim de identificar possíveis diferenças nas respostas toxicológicas entre esses dois grupos.

8. Resultados

8.1. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.

8.1.1. Diazinon

Após exposição por sete dias ao diazinon podemos observar inibição da atividade da AChE em brânquias de machos expostos a 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ deste composto a 18 e 28

°C. No hepatopâncreas não foram observadas inibições significantes quanto a ação do composto (figura 12).

Por outro lado, o aumento da temperatura apresentou influência no aumento da atividade da AChE no hepatopâncreas de machos em 28 °C em relação as demais temperaturas, assim como em fêmeas nas temperaturas de 23 e 28 °C. Enquanto que, nas brânquias, apenas machos apresentaram diminuição na atividade da AChE relacionada a influência dessa temperatura ($p=0,0008$).

A CbE apresentou inibição em sua atividade no hepatopâncreas de machos na concentração de $10\mu\text{g L}^{-1}$ 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 $100\mu\text{g L}^{-1}$ do diazinon a 18 °C (Figura 12).

Também foi possível observar diminuição na atividade da CbE do hepatopâncreas relacionado ao aumento da temperatura tanto em 23 °C quanto em 28 °C em machos e fêmeas. Ao passo que nas brânquias houve aumento na atividade dessa enzima em relação ao aumento da temperatura em ambos os sexos ($p<0,0001$).

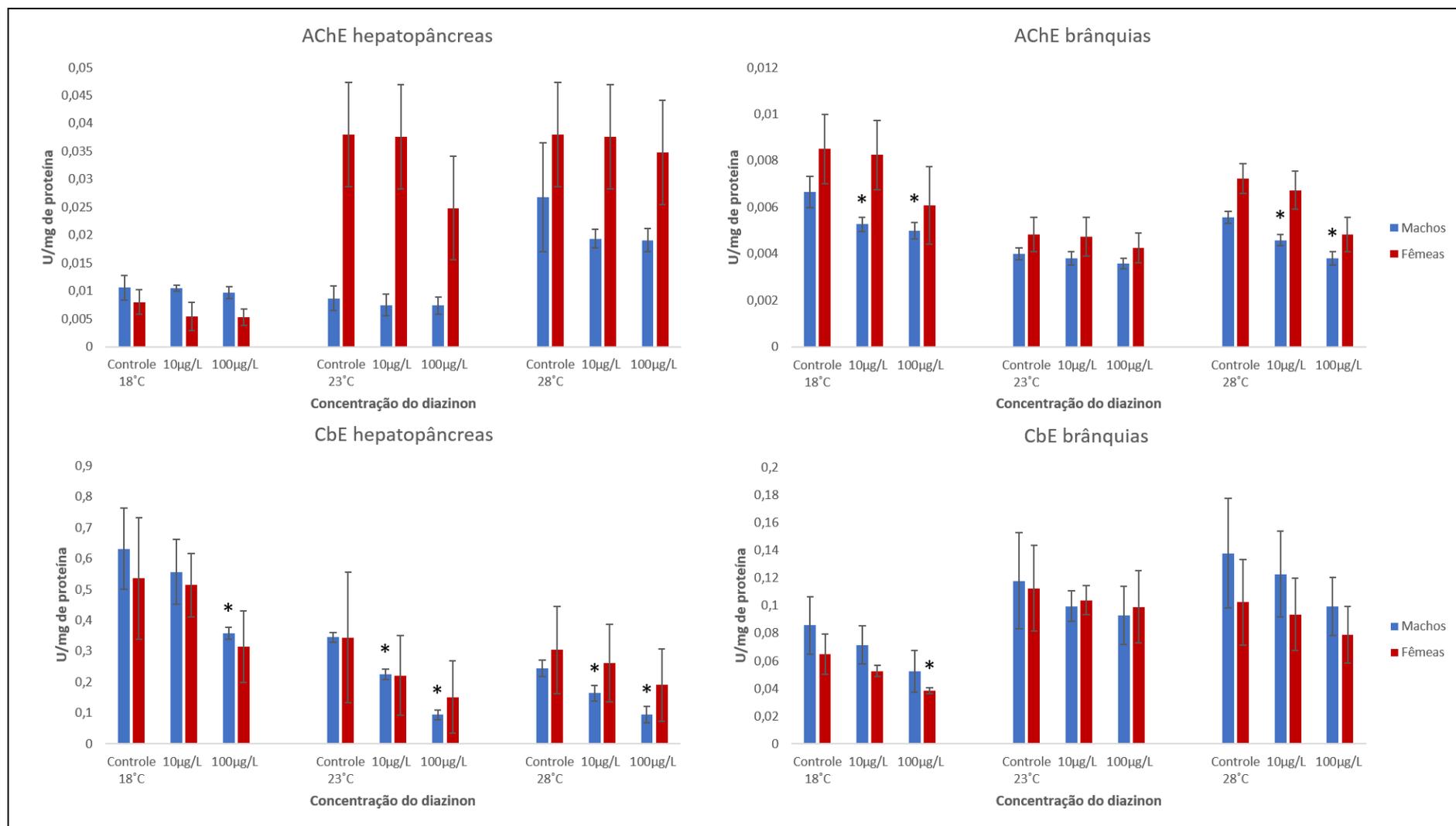


Figura 12. Atividade da AChE e CbE no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de *D. paguei* após exposição por sete dias ao diazinon. * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

8.1.2. Carbaril

Após exposição de machos e fêmeas de *D. pageni* por sete dias ao carbaril podemos observar inibição da atividade da AChE e da CbE no hepatopâncreas apenas de fêmeas na maior concentração a 18 °C (figura 13).

Por outro lado, a diminuição na atividade da AChE no hepatopâncreas de machos a 23 °C, assim como seu aumento em 28 °C está relacionada a influência da temperatura sobre essa enzima. Da mesma forma, nas brânquias houve diminuição na atividade da AChE de machos e fêmeas nas temperaturas de 23 e 28 °C a qual também se relacionam ao aumento da temperatura ($p=0,001$).

A CbE não apresentou alterações na atividade enzimática entre os controles relacionadas a temperatura, apenas a resposta inibitória dessa enzima em fêmeas a 18 °C apresentou relação a este fator abiótico ($p=0,02$).

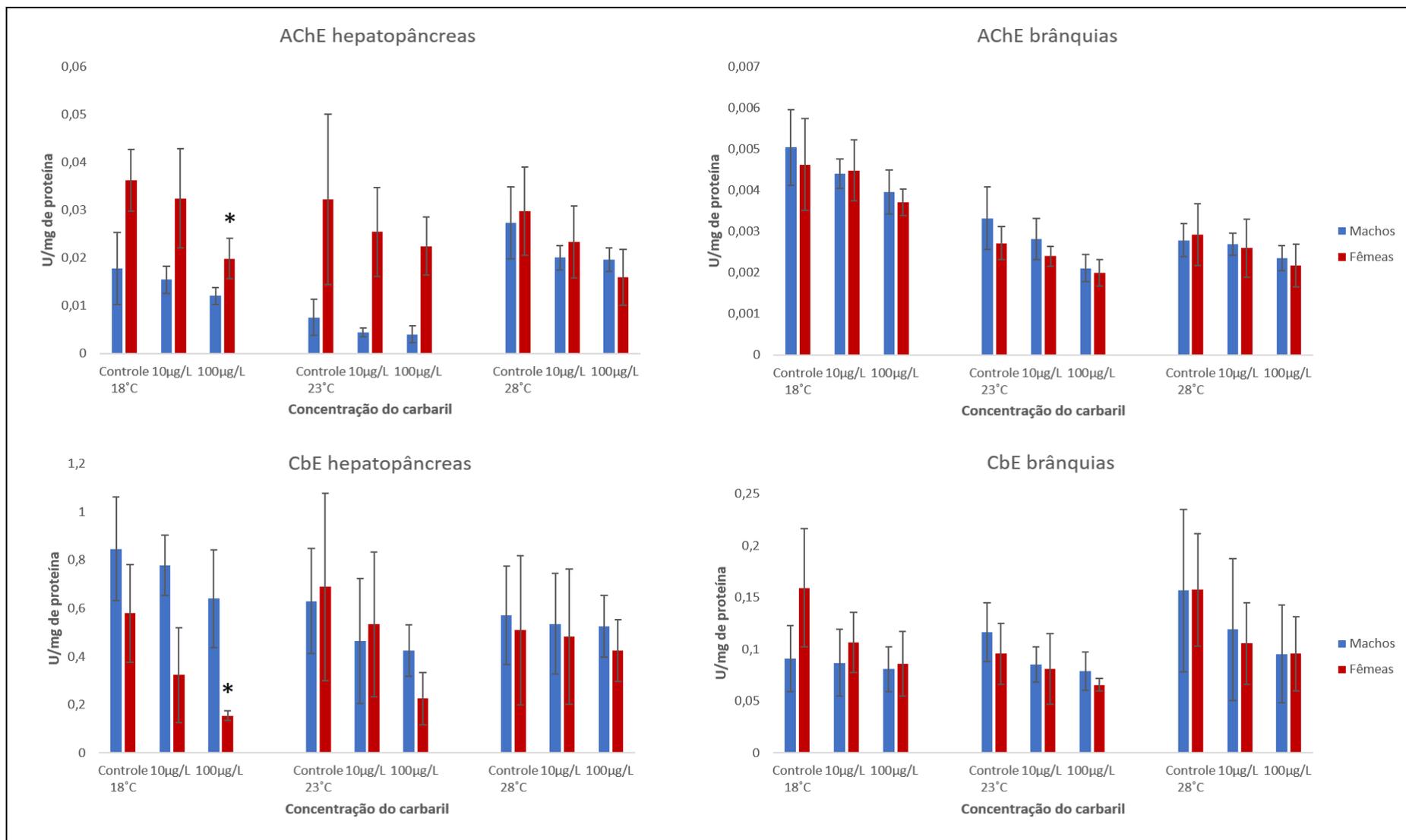


Figura 13. Atividades da AChE e CbE no hepatopâncreas e brânquias de machos e fêmeas de *D. pagei* após exposição por sete dias ao carbaril. * indica diferença estatística em relação ao controle (P<0,05).

9. Discussão

9.1. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase após exposição aos biocidas organofosforado e carbamato.

9.1.1. Diazinon

As enzimas AChE e CbE são clássicas no estudo dos efeitos de compostos OPs e CMs em animais aquáticos (OMKAR, 1985; BHAVAN; GERALDINE, 2009). A inibição da AChE por compostos OPs ocorre por meio de uma reação química em que o grupo hidroxil de um resíduo de serina presente no sítio ativo da enzima é fosforilado pelo OP. Essa reação é altamente estável e impede a reativação de sua atividade catalítica (FUKUTO, 1990; STRINGUETTI et al., 2008).

Por outro lado, a maioria dos OPs, dentre eles o diazinon, são ésteres de fosforotionatos, compostos estáveis e menos propensos a degradação hidrolítica, mas que apresentam baixo efeito anticolinesterase (FUKUTO, 1990). Porém, durante sua biotransformação, o diazinon é convertido em diazoxon pelas enzimas monooxigenases do citocromo P450, substituindo a ligação P=S por P=O (KEIZER et al., 1995). A ligação P=O apresenta maior reatividade ao centro catalítico colinérgico por conta da maior eletronegatividade do oxigênio. Isto facilita o ataque do grupo hidroxila da serina (agente nucleofílico) ao grupo fosfato do diazoxon, promovendo assim a inibição da atividade catalítica da AChE (FUKUTO, 1990).

As AChEs estão presentes em praticamente todos os tecidos e em crustáceos, particularmente, já foram isoladas nos olhos, tecido nervoso, hepatopâncreas, trato digestivo, tecido muscular e brânquias (FRASCO et al., 2006; SOLÉ et al., 2006; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009), porém sua atividade pode variar entre os tecidos e conseqüentemente sua resposta a compostos tóxicos.

No presente trabalho, foi observado inibição da AChE apenas nas brânquias de machos expostos ao diazinon. As brânquias correspondem ao principal órgão responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, excreção e trocas gasosas. Além disso, seu contato direto com a água também permite a absorção de compostos tóxicos, o que faz desse órgão uma das principais vias de entrada de tais compostos (NEGRO et al., 2013).

A inibição da atividade da AChE em brânquias causada por OPs vem demonstrando grande relevância em estudos de toxicologia aquática. Sharbidre et al. (2011) e Ghazala et al. (2014), relataram inibição dessa enzima em brânquias de peixes expostos ao diazinon e profenofos, respectivamente. Ghedira et al., (2009) também

demonstraram inibição da AChE em brânquias do caranguejo marinho *Carcinus maenas* expostos ao clorpirifos-etil em concentrações de 1,56 e 7,81 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Além disso, o presente trabalho apresentou maior sensibilidade de machos de *D. pagei* nas respostas inibitórias. McClellan-Green et al. (2007) atribuem diferenças nas respostas toxicológicas dentre os sexos à natureza divergente do sistema endócrino nos invertebrados. De acordo com esses autores, diferenças na regulação endócrina pode alterar a absorção, a biotransformação, a eliminação e o armazenamento de compostos tóxicos. Dessa forma, podemos concluir que diferenças na regulação endócrina entre os sexos pode ter influenciado na maior sensibilidade da AChE observada em brânquias de machos em *D. pagei*.

A temperatura também apresentou influência na sensibilidade da AChE de machos de *D. pagei*, onde foi observada inibição nas brânquias apenas nas temperaturas de 18 e 28 °C. De fato, a literatura científica demonstra que na medida em que a temperatura aumenta, muitas espécies aquáticas alteram a estrutura das brânquias, pois quanto maior a temperatura da água, menor a solubilidade do oxigênio. Logo, aumentam a superfície branquial para aumentar a capacidade de captação do oxigênio que está mais escasso. Na mesma situação, as células do epitélio branquial tendem a diminuir de espessura, também para facilitar a difusão do oxigênio. Ao mesmo tempo em que a taxa de ventilação aumenta. Tudo isso para compensar a menor concentração do oxigênio dissolvido (PRUITT et al., 1990; PÖRTNER; KNUST, 2007). Além disso, de acordo com Los; Murata (2004), em microrganismos, o aumento da temperatura aumenta a fluidez da membrana plasmática, ao passo que a diminuição da temperatura leva ao enrijecimento e consequente diminuição na fluidez da mesma. Como consequência, observa-se aumentos significativos na absorção de contaminantes pelas brânquias em maiores temperaturas, o que pode estar relacionado a sensibilidade da AChE das brânquias na temperatura de 28 °C.

Por outro lado, na temperatura de 23 °C não há inibição da AChE em brânquias em nenhum dos biocidas testados (diazinon e carbaril). Este resultado pode indicar maior eficiência nos processos de eliminação e/ou armazenamento e eliminação de substâncias tóxicas nessa temperatura para *D. pagei*. Trabalhos na literatura científica que avaliam parâmetros de estabilidade fisiológica como oxigenação, disponibilidade de energia e excreção em crustáceos dulcícolas de regiões tropicais e subtropicais, indicam maior estabilidade homeostática entre as temperaturas de 23 e 26 °C (BRAY et al., 1985; GONZÁLEZ et al., 2010). Além do mais, uma vez que a temperatura de 23 °C apresenta

melhor desempenho fisiológico, a fluidez da membrana plasmática pode favorecer a excreção de compostos tóxicos quando comparados a 18 °C, temperatura a qual a membrana encontra-se mais rígida. Por outro lado, a maior rigidez da membrana plasmática a 23 °C, em comparação a 28 °C, pode ser mais seletiva, impedindo assim a entrada de maiores concentrações do diazinon (LOS; MURATA, 2004). Dessa forma, podemos concluir que tanto fatores fisiológicos quanto a seletividade e rigidez da bicamada lipídica podem ter contribuído para a resistência das brânquias em *D. pagei* expostos ao diazinon.

No que diz respeito ao hepatopâncreas, não foi observado inibição da AChE frente ao efeito do diazinon, as alterações na atividade dessa enzima apresentaram relação apenas com o aumento da temperatura.

Alguns autores sugerem a existência de um mecanismo protetor de ação das CbEs em relação à atividade da AChE. A CbE tem a capacidade ligar-se a biocidas OPs antes que este alcance seu alvo no sistema nervoso (SOGORB; VILANOVA, 2002; WHEELOCK et al., 2008b). Esse mecanismo poderia explicar a manutenção da atividade da AChE no hepatopâncreas de *D. pagei*, uma vez que a CbE apresentou alta atividade nesse órgão. Por outro lado, nas brânquias a atividade dessa enzima é menor em relação ao hepatopâncreas, dessa forma, a capacidade protetora da CbE pode ser menor, o que explicaria a inibição da AChE apenas nesse órgão.

Quanto a relação do aumento da temperatura com o aumento da atividade da AChE, Menezes et al. (2006), avaliaram a resposta dessa enzima no camarão *Crangon crangon*, submetidos a temperaturas de 9, 20 e 25 °C e demonstraram que a atividade da AChE no cefalotórax dessa espécie aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura, o que condiz com a resposta apresentada em *D. pagei*. Além disso, o aumento na atividade da AChE em relação ao aumento da temperatura em fêmeas foi proporcionalmente maior que em machos. A literatura científica sugere que fêmeas de crustáceos são mais responsivas fisiologicamente ao estresse térmico, uma vez que este fator abiótico está relacionado ao aumento no seu metabolismo basal e a sinalização de início de processos reprodutivos (BRADLEY, 1978; HASSETT; CROCKET, 2009).

No que diz respeito aos resultados observados dos efeitos do diazinon na CbE, em brânquias de *D. pagei*, houve inibição dessa enzima apenas em fêmeas expostas a 18 °C, ao passo que no hepatopâncreas apenas machos apresentaram inibição dessa enzima nas três temperaturas testadas.

Recentemente, vários trabalhos na literatura científica tem demonstrando a sensibilidade da CbE de invertebrados aquáticos (crustáceos e moluscos) a compostos OPs (ANGUAIANO et al., 2012; BIANCO et al., 2013; RIVADENEIRA et al., 2013; CACCIATORE et al., 2013).

Assim como na inibição de colinesterases, compostos OPs são metabolizados em sua oxon-forma, como diazoxon, por exemplo, e assim, inibem a atividade da CbE pela fosforilação de um nucleófilo de oxigênio, presente no resíduo de serina do centro catalítico da enzima. Porém, diferentemente da AChE, a CbE fosforilada pode liberar o substrato OP por hidrólise após algumas horas (WHEELLOCK et al., 2008b).

Alguns autores tem considerado a CbE como importantes enzimas no processo de desintoxicação do organismo em invertebrados aquáticos, uma vez que podem reduzir a concentração de OPs livres pela sua capacidade de interação com tais compostos (ANGUAIANO et al., 2012; BIANCO et al., 2013).

A CbE branquial de *D. pagei* apresentou aumento em sua atividade relacionada ao aumento da temperatura. Da mesma forma, foi observado inibição dessa enzima apenas em fêmeas expostas a 18 °C. A literatura científica reconhece que o aumento na atividade de esterases pode estar relacionado a mecanismos de resistência a biocidas. Aumentos quantitativos, ou seja, livre de mutações estruturais em genes que codificam a CbE, proporcionam maior resistência a biocidas (FOURNIER; MOUTERO, 1994; ANGUIANO, 2008). Dessa forma, podemos supor que o aumento da CbE em resposta a temperatura, em *D. pagei*, pode ter diminuído os efeitos da ação inibitória do diazinon sobre essas enzimas, o que explicaria a inibição restrita a 100µg L⁻¹ em 18 °C.

Por outro lado, no hepatopâncreas houve diminuição na atividade da CbE relacionada ao aumento da temperatura e, como consequência, observa-se aumento no padrão inibitório dessa enzima frente ao diazinon, uma vez que em 18 °C ocorreu inibição apenas na maior concentração testada e em 23 e 28 °C em ambas as concentrações (10 e 100µg/L).

A relação entre o aumento da temperatura e a diminuição na atividade da CbE hepática foi relatado por Laetz et al. (2014) no salmão *Oncorhynchus kinutch*. Estes autores observaram diminuição na atividade dessa esterase nas temperaturas de 15, 18 e 21 °C comparado a 12 °C. Além disso, a CbE hepática de *O. kinutch* apresentou maior inibição após exposição ao OP malation na concentração de 0,4 e 0,75µg L⁻¹ nas temperaturas de 15, 18 e 21 °C em relação a 12 °C. Estes autores relacionaram a diminuição na atividade dessa enzima em temperaturas mais elevadas ao aumento do

efeito inibitório do malation. Dessa forma, podemos concluir que o aumento na resposta inibitória da CbE hepatopancreática em machos de *D. pagei* nas temperaturas de 23 e 28 °C ocorreu por conta da diminuição na atividade dessa enzima nessas duas temperaturas. Porém, os efeitos da temperatura na atividade da CbE em animais aquáticos ainda são pouco conhecidos pela literatura científica, permanecendo ainda obscura a explicação para a redução de sua atividade frente ao aumento térmico.

9.1.2. Carbaril

A inibição da AChE por CMs ocorre por um mecanismo similar aos OPs, contudo, esta inibição não depende da bioativação do biocida por outros complexos enzimáticos. O processo inibitório da AChE por carbamatos envolve a formação do complexo enzima-inibidor com subsequente carbamilação da serina no centro catalítico enzimático, resultando em sua inibição. No entanto, a enzima carbamilada pode reativar espontaneamente sua atividade, formando metilamina e CO₂. Além disso, a reativação da AChE carbamilada é relativamente rápida, aproximadamente 30 minutos após a reação, enquanto que a enzima fosforilada pode levar de horas a dias, dependendo do organismo (FUKUTO, 1990; SOGORB; VILANOVA, 2002).

A inibição da CbE por carbamatos ocorre por um mecanismo semelhante a hidrólise de seus substratos naturais. Primeiramente o resíduo de serina presente em seu centro catalítico é carbamilado pelo CM liberando uma molécula de etanol. Posteriormente, uma molécula de água nucleofílica ataca a ligação serina-carbamato, liberando a enzima ativa, ácido carbâmico (a qual instantaneamente se decompõe em CO₂ + amina), e o produto, no caso do carbaril, 1-naftol (SOGORB; VILANOVA, 2002; SCHLENK et al., 2008).

No presente estudo, a inibição das enzimas AChE e CbE foram observadas apenas em fêmeas de *D. pagei* expostas a maior concentração do carbaril em 18 °C. Este resultado indica menor sensibilidade desses organismos ao carbaril em relação ao diazinon (OP). Em um trabalho utilizando o lagostim *P. clarkii*, Vioque-Fernández et al. (2009), relataram menores efeitos do carbaril em esterases quando comparado ao OP clorpirifos. De acordo com Printes e Callaghan (2004), as diferenças na estrutura molecular e a bioativação dos OPs pode explicar as diferenças nas respostas apresentadas pelos organismos frente a estes biocidas. Segundo estes autores, a formação do diazoxon

proporciona maior estabilidade química a fosforilação, o que pode apresentar efeitos inibitórios mais acentuados, quando comparada a carbamilação promovida pelos CMs.

Além disso, de acordo com Sogorb; Vilanova (2002) e Wheelock et al. (2008), a CbE apresenta um mecanismo protetor a AChE, conforme discutido anteriormente. Dessa forma, podemos supor que a resposta inibitória acentuada da CbE ao carbaril nessa temperatura foi suficiente para reduzir seu efeito protetor, levando a inibição da AChE em *D. pagei*.

Vale a pena salientar que 18 °C foi a única temperatura que apresentou inibição significativa da CbE hepatopancreática em fêmeas (100µg L⁻¹) e que tal inibição levou-a a menor atividade observada, quando comparada as demais temperaturas (Figura 13). Dessa forma, podemos supor que o efeito protetor proporcionado pela CbE nas temperaturas de 23 e 28 °C foi suficiente para manter a integridade da atividade da AChE, preservando assim o controle do impulso nervoso nos organismos expostos a essas temperaturas.

Além disso, não houve inibição significativa das esterases testadas, em nenhuma das temperaturas testadas, no hepatopâncreas de machos e nas brânquias de ambos os sexos. Estes dados corroboram a hipótese do mecanismo de proteção entre a CbE e a AChE, pois, uma vez que a atividade da CbE foi mantida em níveis elevados, esta pode ter impedido a ação inibitória do carbamato sobre a AChE.

Por outro lado, o local de coleta desses indivíduos corresponde a uma área predominantemente agrícola e parcialmente urbanizada (observação pessoal). De acordo com Negro et al. (2013), é comum a utilização de biocidas carbamatos em locais com tais características. Dessa forma, podemos sugerir que pode ter havido exposição prolongada da população de *D. pagei* a compostos carbamatos na região de coleta, com possível desenvolvimento de resistência a esses compostos (GUERRA et al., 2010; LIMA et al., 2013).

Segundo Hyne; Maher (2001), o aumento na atividade de enzimas de metabolismo de xenobióticos, e a diminuição da sensibilidade de sítios catalíticos alvo correspondem aos mecanismos mais eficientes de desenvolvimento de resistência a biocidas. Segundo Fournier; Mutero (1994), de fato, o contato prolongado de determinada população a biocidas pode selecionar mutações que resultam em enzimas com novas propriedades catalíticas, tanto relacionadas a seus substratos específicos quanto a inibidores.

Várias mutações pontuais como substituições de nucleotídeos e de aminoácidos tem sido caracterizada em insetos drosofilídeos, hemípteras, lepidópteros e himenópteras

e atribuídos ao desenvolvimento de resistência a biocidas em enzimas esterásicas pela diminuição da afinidade do centro catalítico dessas enzimas a tais compostos (OAKESHOTT et al., 2005). Porém, em crustáceos aquáticos, a resistência esterásica a biocidas parece estar relacionada a atuação conjunta de outras vias metabólicas que acabam por proteger esse grupo enzimático (BRAUSCH; SMITH, 2009).

De acordo com Brausch; Smith (2009) enzimas do citocromo P450 e hidrolases, incluindo a CbE, estão envolvidas no processo inicial de resistência a biocidas por conta do aumento na detoxificação metabólica proporcionada por essas vias. Segundo esses mesmos autores, a inibição de tais vias metabólicas restaurou a sensibilidade do microcústáceo *Thamnocephalus platyurus*, a compostos piretróides e carbamatos. Além disso, o desenvolvimento de resistência a biocidas tem sido descrita em diversas populações de crustáceos: *Chasmagnathus granulata* (MONSERRAT; BIANCHINI, 1998); *Artemia salina* (BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999); *Hyalella curvispina* (ANGUIANO et al., 2008) e *Hyasa araneus* (MINER et al., 2008), o que mostra a alta capacidade desses organismos em se adaptarem a condições estressantes.

De acordo com Hyne; Maher (2001) e Brausch; Smith, (2009), além das esterases, outras vias metabólicas, como das enzimas monooxigenases do complexo do citocromo P450, podem estar relacionadas a resistência desses organismos ao carbaril. Contudo, pesquisas que correlacionem a atividade das monooxigenases e as esterases na resistência a carbamatos ainda são escassas em crustáceos.

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. argentine*. *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.