

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Angelo Antonio Franzoi Ardengui

Influência do inseticida Malathion sobre a mortalidade e a arquitetura branquial de camarões
Macrobrachium amazonicum (HELLER, 1862) oriundos da bacia do rio Grande

Uberaba
2018

Angelo Antonio Franzoi Ardengui

Influência do inseticida Malathion sobre a mortalidade e a arquitetura branquial de camarões
Macrobrachium amazonicum (HELLER, 1862) oriundos da bacia do rio Grande

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico Interdisciplinar em Biociências Aplicadas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, na área de concentração: Materiais Aplicados à Biociências, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Andressa de Almeida Buranello

Uberaba
2018

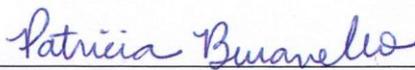
ANGELO ANTONIO FRANZOI ARDENGUI

**INFLUÊNCIA DO INSETICIDA MALATHION SOBRE A MORTALIDADE E A
ARQUITETURA BRANQUIAL DE CAMARÕES *Macrobrachium amazonicum*
(HELLER, 1862) ORIUNDOS DA BACIA DO RIO GRANDE**

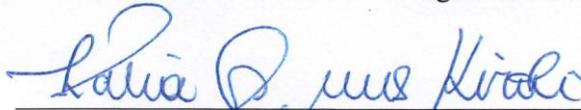
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

28 de agosto de 2018.

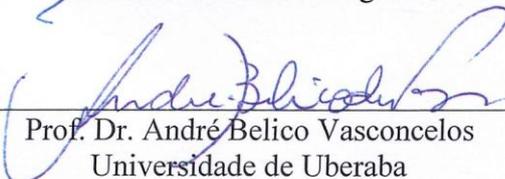
Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Patrícia Andressa de Almeida Buranello - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof.^a Dr.^a Kátia Aparecida Nunes Hiroki Gurgel
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. André Belico Vasconcelos
Universidade de Uberaba

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha professora e orientadora Patrícia Andressa de Almeida Buranello pela sua orientação, paciência e por todo aprendizado conquistado durante todo o período do mestrado. Agradeço também o professor Marcelo Rodrigues Pinto pela sua imensa colaboração e ajuda na pesquisa, na coleta dos camarões, no bioensaio, na histologia e na conclusão deste trabalho.

Agradeço também a todos demais professores, familiares e amigos que de forma direta ou indireta me apoiaram durante o percurso para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

A biota nos ecossistemas aquáticos é geralmente exposta a diversas condições de estresse, como variações ambientais naturais e distúrbios antropológicos, incluindo as descargas de poluentes nos recursos hídricos. Sendo assim importante a realização de estudos que avaliem os efeitos desses poluentes sobre os ecossistemas. O malathion é um exemplo de poluente, pois, é um inseticida comumente utilizado como defensivo agrícola em culturas ao redor do mundo e, embora apresente baixa toxicidade para espécies de mamíferos, espécies aquáticas podem ser sensíveis mesmo a pequenas concentrações. Dentre os diversos organismos aquáticos os crustáceos tem se destacado como organismos sensíveis para avaliar a poluição do ecossistema aquático. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do malathion sobre camarões *Macrobrachium amazonicum* através da obtenção da DL50 e da análise morfológica de suas brânquias. Para isso, camarões nativos do rio Grande foram capturados e aclimatados ao ambiente laboratorial para a realização de bioensaios. Os camarões foram divididos em grupos de dez animais cada e expostos a concentrações crescentes do inseticida por 48 horas. Nossos achados mostraram que a DL50 foi atingida a 0,73 mg/L de malathion, e que alterações relevantes na arquitetura das brânquias podem ser observadas em camarões expostos a concentrações de 1,25 a 1,5 mg/L do inseticida. Este é o primeiro estudo demonstrando que mesmo em curto prazo, o malathion interfere na estrutura microscópica das brânquias de camarões do gênero *Macrobrachium*, e vem contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos promovidos por determinados defensivos agrícolas sobre organismos aquáticos que, comumente ficam expostos a estes.

Palavras-chave: Malathion; Biomarcador; *Macrobrachium amazonicum*

ABSTRACT

Biota in aquatic ecosystems is usually exposed to various stress conditions, like natural environmental variations and anthropological disturbs including pollutant discharges into water resources. Malathion is an insecticide commonly used as an agricultural pesticide in crops around the world, and although it presents low toxicity to mammalian species, aquatic species may be sensitive even at small concentrations. Among the various aquatic organisms, crustaceans have distinguished themselves as sensitive organisms to evaluate the pollution of the aquatic ecosystem. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the effects of malathion on *Macrobrachium amazonicum* shrimps by obtaining LD50 and morphological analysis of the gills. For this, native prawns of the Rio Grande were captured and acclimated to the laboratory environment for the realization of bioassays. The shrimp were divided into groups of ten animals each and exposed to increasing concentrations of the malathion for 48 hours. Our findings showed that the LD50 was reached at 0.73 mg/L malathion, and that relevant changes in the architecture of the gills can be observed in shrimps exposed to concentrations of 1.25 and 1.5 mg/L of the insecticide. This is the first report demonstrating that even in the short term, malathion interferes in the microscopic structure of *Macrobrachium* shrimp gills, and contributes to a better understanding of the effects promoted by certain pesticides on aquatic organisms that are commonly exposed to these.

Key words: Malathion; Bioassay; *Macrobrachium amazonicum*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 BIOMONITORAMENTO	8
1.1.1 Agentes Poluentes	9
1.1.2 Modelos Biológicos	9
1.2 <i>Macrobachium amazonicum</i>	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	13
3.2 ACLIMATAÇÃO.....	14
3.3 BIOENSAIO	15
3.4 CALCULO DA DL ₅₀	15
3.5 MORFOMETRIA	16
3.5.1 Morfometria externa	16
3.5.2 Morfometria brânquial	16
3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS BRÂNQUIAS.....	17
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4 RESULTADOS	18
4.1 BIOENSAIO.....	18
4.2 CALCULO DA DL ₅₀	20
4.3 MORFOMETRIA.....	22
4.3.1 Morfometria externa	22
4.3.2 Morfometria brânquial	22

4.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS BRÂNQUIAS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONSIDRAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo trata-se de um bioensaio que busca avaliar efeitos bioindicadores de resistência ou toxicidade em uma espécie de camarão de água doce que são expostos ao inseticida malathion, visando apresentar dados que discutam sobre a influência dessas substâncias nos ecossistemas aquáticos, e assim apresentar e discutir dados que colaborem com estudos sobre a preservação do meio ambiente, que se apresenta atualmente ameaçada pela presença decorrente da utilização de organofosforados nos ecossistemas (ARIAS, 2007).

Essa contaminação ambiental pode ser demonstrada por meio de espécies consideradas bioindicadores ambientais, que podem também ser representados por populações, e que ocorrem em regiões onde há algum tipo de contaminação. Esses seres vivos permitem avaliar os efeitos causados pela contaminação e seus impactos em diferentes níveis ecológicos, pois podem expressar algum sinal estrutural, morfológico, fisiológico ou mesmo comportamental nos organismos (ARIAS, 2007).

1.1 BIOMONITORAMENTO

Os efeitos que podem ocorrer nos ambientes contaminados podem ser analisados por meio de estudos que demonstram a interação da biota de um ecossistema com as substâncias poluentes. Tais estudos, geralmente são conhecidos como biomonitoramentos ambientais.

Este estudo utiliza organismos vivos como marcadores ambientais, por exemplo, invertebrados bentônicos (que vivem no substrato do ecossistema aquático), crustáceos e peixes. Esses animais representam fatores sensíveis ou resistentes às variações ambientais. O biomonitoramento também é uma importante ferramenta aplicada para a hidroecologia, pois os seus dados demonstram diretamente as inter-relações dos seres vivos aquáticos com o seu hábitat (PINTO; LUCENA, 2014).

As alterações fisiológicas e as mudanças na composição química celular e tecidual são importantes dados analisados a partir desses estudos, pois eles podem demonstrar a variação nas condições da água em que essas espécies estão diretamente em contato (PINTO; LUCENA, 2014).

Esse tipo de estudo utiliza como agentes poluentes diversos tipos de metais tóxicos, oriundos de poluentes gerados ou utilizados em sistemas agrícolas, industriais, de mineração e

de esgotos, que atingem diversos ambientes aquáticos, entre oceânicos, dulcícolas e estuarinos (PINTO; LUCENA, 2014).

1.1.1 Agentes Poluentes

Os tipos de poluentes podem ser representados pelos inseticidas do grupo dos organofosforados, que são bastante utilizados em estudos de biomonitoramento, entre eles, um dos mais estudados atualmente é o malathion, pois ele apresenta larga utilização no Brasil, tanto em ambientes rurais como urbanos. (REDDY, 2016). A contaminação de um organismo por um organofosforado pode ocorrer por meio da absorção cutânea, da ingestão ou da exposição a vapores e aerossóis. Animais contaminados por organofosforados morrem por asfixia associada à constrição bronquial, pelo aumento de secreções nos órgãos respiratórios, ou, ainda pela paralisia de órgãos respiratórios (SANTOS, ET AL., 2004 et al., 2004). Os agrotóxicos organofosforados atuam promovendo a fosforilação que inibe a ação da Acetilcolinesterase (AchE), uma enzima do sistema nervoso central. Dessa forma, haverá o acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas, e esse processo promoverá a interrupção da propagação de impulsos elétricos, desencadeando um processo de paralisia, o que consequentemente acaba resultando na morte do organismo (BAKRY, HASHEESH, HANDI, 2011).

O malathion é um inseticida importante no combate de vetores de doenças como o *Aedes aegypti* e no combate de pragas agrícolas, sobretudo na região Sudeste do Brasil e no Triângulo Mineiro (ABE, 2012), podendo ser um potencial contaminante de rios e outros mananciais presentes nessas regiões. O malathion é um organofosforado do tipo alifático, que possui ação por contato e por ingestão, e seus principais alvos na agricultura são a mosca das frutas (*Anastrepha fraterculus*), pulgão verde (*Myzus persicae*) e broca pequena do fruto (*Neoleucinodes elegantalis*). Na saúde pública ele é muito utilizado por ser biodegradável, apresentar baixa eficiência na presença de luz solar e não se acumular em tecidos. Apesar disso, apresenta instabilidade química e apresenta maior toxicidade em vertebrados do que os agrotóxicos do grupo organoclorados, mesmo em doses mais baixas (PARANÁ, 2013).

1.1.2 Modelos Biológicos

O biomonitoramento também depende de outra ferramenta importante, que é o modelo biológico a ser utilizado. Este pode ser representado por espécies consideradas marcadoras

ambientais, que ao entrarem em contato com o agente tóxico passam a apresentar alterações fisiológicas e/ou morfológicas, chamadas de bioindicadores. Quando o biomonitoramento é dirigido em laboratório, com o objetivo de determinar uma taxa de mortalidade ou demais efeitos decorrentes da toxicidade, ele é chamado de bioensaio (BENEDETTI, *et al.*, 2015).

Muitas vezes os bioindicadores são representados por alterações morfológicas externas ou em tecidos de estruturas internas dos camarões, pois a toxicidade pode alterar a fisiologia de algum processo metabólico, ou mesmo lesionar os tecidos do animal. *Macrobrachium amazonicum* possui uma ampla distribuição geográfica, e seus ambientes naturais apresentam variações nos parâmetros da água. Sendo assim, sua hemolinfa apresenta uma forte capacidade de osmorregulação. Os gradientes osmóticos dessa espécie têm como característica se manterem hiper-regulados em água doce ($\sim 400 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), e em água salgada o valor aumenta para ($736 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) (FALEIROS, *et al.*, 2010).

A presença de mecanismos eficientes de controle osmo-iônico nos crustáceos é de grande importância devido a essa grande variabilidade de condições ambientais a que podem estar expostos (PÉQUEUX, 1995). Desta forma, o tecido branquial dos crustáceos desempenha um papel fundamental na osmorregulação e nas trocas gasosas (BÖTTCHER; SIEBERS, 1993; PÉQUEUX, 1995), assim como na regulação do equilíbrio ácido-base da hemolinfa (HENRY; WHEATLY, 1992). O tecido branquial atua como uma interface seletiva entre o animal e o seu meio ambiente e é considerado o sítio primário de captação ativa de sódio e cloreto de ambientes de baixa salinidade para a hemolinfa nos crustáceos hiperosmorreguladores (FREIRE *et al.*, 2008; SÁEZ *et al.*, 2009).

A regulação iônica e osmótica dos crustáceos, realizada por brânquias multifuncionais está associada a órgãos excretores. Em relação às trocas gasosas, as brânquias constituem atividades transepiteliais, como transporte iônico, uma atividade essencial para funções fisiológicas ligadas à osmorregulação, por exemplo, homeostase de cálcio, excreção de amônia e regulação do pH extracelular. (FREIRE, *et al.*, 2008). A exposição de camarões da espécie *Macrobrachium malcolmsonii* ao inseticida organoclorado endossulfan, demonstrou severas alterações histopatológicas em células das brânquias e do hepatopâncreas. As alterações observadas incluem infiltração de hematócitos nos seios intersticiais, espessamento das lâminas basais e necrose dos túbulos do hepatopâncreas. As brânquias se apresentaram tipicamente anormais, com características hiperplásticas e necróticas. Essas alterações interferem em funções fisiológicas vitais para esses organismos, como absorção, excreção, respiração, regulação osmótica e iônica (SARAVANA; GERALDINE, 2001).

Uma das maneiras que os bioindicadores podem captar informações quanto às condições ecológicas do meio ambiente é por meio da análise de alterações encontradas nos tecidos dos organismos aquáticos. O descobrimento de quais poluentes especificamente geram os danos nos tecidos, são possibilitados pela existência de enzimas específicas sensíveis a determinadas toxinas (MCLOUGHLIN et al., 2000). É essencial que durante o processo de avaliação ambiental vários modelos sejam utilizados como bioindicadores, no que diz respeito a número e variedade, de forma que as respostas encontradas possam apresentar maior probabilidade de valor significativo e próximo à realidade (FREIRE, M.M. et al, 2008).

Os camarões são bons modelos biológicos a serem utilizados em bioensaios, pois geralmente apresentam efeitos bioindicadores quando expostos a agentes poluentes, sendo muitas espécies consideradas marcadores ambientais. Um estudo realizado com camarões da espécie *Penaeus paulensis* expostos a sedimentos contaminados, demonstrou um aumento de excreção que pode ser consequência de uma alteração fisiológica em resposta a um contaminante, pois o animal aumenta a sua taxa de excreção no intuito de eliminar o composto tóxico ingerido ou absorvido (MORAES, 1999).

Entre os decápodes dulcícolas, os camarões da espécie *Macrobrachium amazonicum* são considerados importantes biomarcadores de qualidade de corpos d'água contaminados com herbicidas (COLER et al., 1999). E do ponto de vista ecológico, é importante em muitas cadeias alimentares, uma vez que são fontes preferenciais de predação por diversos peixes (ALMEIDA et., 1997; BOSCOLO et al., 2004).

1.2.1 *Macrobrachium amazonicum*

No Brasil, existem 117 espécies de decápodes de água doce (MAGALHÃES, 2000; MELO, 2003), que são importantes tanto ecologicamente quanto economicamente (MAGALHÃES et al. 1999; ALMEIDA et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2012).

Nesse grupo de animais existe a família monofilética Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) de camarões carídeos que apresentam uma ampla distribuição geográfica, com representantes nos cinco continentes e ocupando os mais diversos nichos ecológicos (HOLTHUIS, 1952; PEREIRA, 1997; SAMPAIO et al., 2009).

Macrobrachium amazonicum (HELLER, 1862) é popularmente conhecido como camarão canela e é uma das 26 espécies americanas do gênero *Macrobrachium* (GUEST, 1979; MAGALHÃES et al., 2005). Ele é endêmico da América do Sul e largamente distribuído nas regiões tropical e subtropical, desde a Venezuela até a Argentina

(MAGALHÃES, 2000; MELO, 2003; VALENCIA; CAMPOS, 2007). No Brasil, ocorre nas bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins, São Francisco, Paraná e Paraguai, bem como em outros rios menores da bacia do Atlântico Sul (COELHO; RAMOS-PORTO, 1985; RAMOS-PORTO; COELHO, 1990; LOPEZ; PEREIRA, 1996; PETTOVELLO, 1996; ALMEIDA et al., 1997; BIALETZKI et al., 1997; MAGALHÃES, 2000; MELO, 2003; VALENCIA; CAMPOS, 2007, ALMEIDA et al., 2008; BENTES et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2012; PILEGGI et al., 2013).

As populações de *M. amazonicum* na porção superior da bacia do Rio Paraná e no nordeste do Brasil são consideradas não naturais e resultam de uma dispersão antrópica (PINTO, 1977; TORLONI et al., 1993; MAGALHÃES et al., 2005).

Do ponto de vista ecológico, *M. amazonicum* é importante em muitas cadeias alimentares, uma vez que são fontes preferenciais de predação por diversos peixes. Além disso, *M. amazonicum* é considerado biomarcador para corpos d'água contaminados com nitrito (DUTRA, et al., 2015). Levando em consideração esses dados, essa espécie pode representar um modelo biológico a ser estudado no Brasil (SILVA, 2010).

M. amazonicum é considerado como biomarcador da qualidade de corpos d'água contaminados com herbicidas (COLER et al., 1999), e do ponto de vista ecológico, é importante em muitas cadeias alimentares, uma vez que são fontes preferenciais de predação por diversos peixes (ALMEIDA et al., 1997; BOSCOLO et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do malathion sobre camarões *M. amazonicum* por meio da obtenção da DL_{50} (dosagem de malathion letal a 50% do grupo amostral) e da análise morfológica de suas brânquias, com a finalidade de avaliar esta espécie como possível bioindicador da qualidade das águas de uma determinada região do rio grande.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar uma concentração que represente a DL_{50} de malathion para *M. amazonicum* por meio de bioensaio;

- b) Analisar a morfologia das brânquias de *M. amazonicum* expostos ou não ao malathion por meio da medida dos filamentos branquiais;
- c) Analisar a histologia das brânquias de *M. amazonicum* por microscopia.

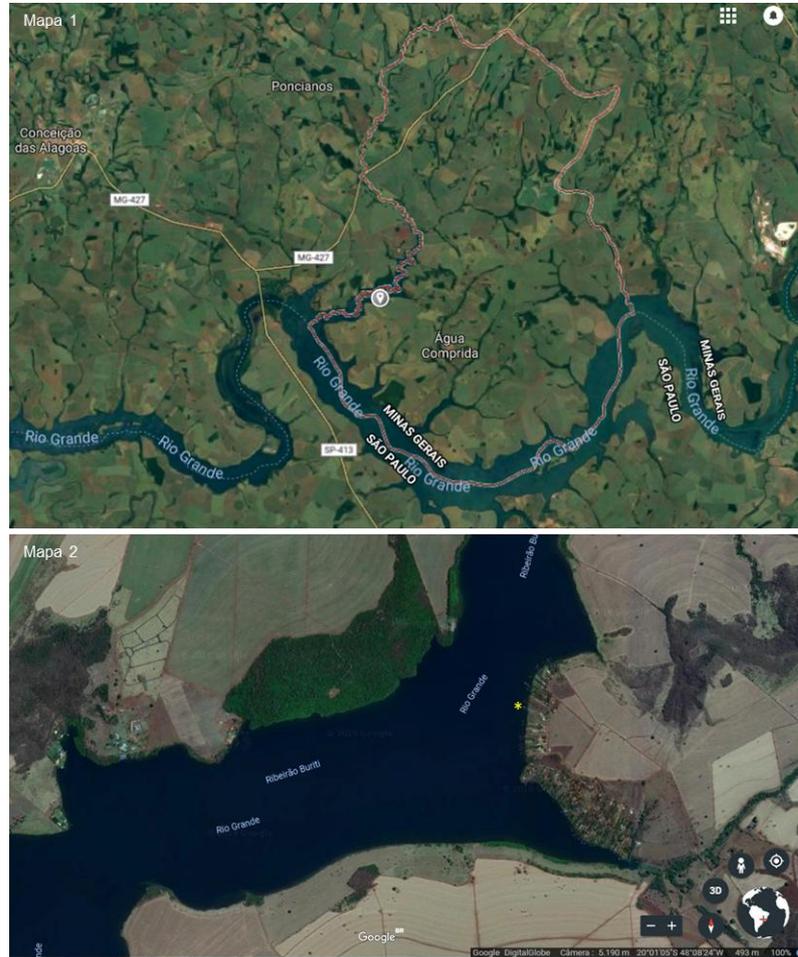
3. MATERIAIS E MÉTODOS

O modelo biológico *Macrobrachium amazonicum* utilizado nessa pesquisa é classificado como filo Arthropoda, subfilo Decapoda, e considerado um animal invertebrado. Sendo assim, de acordo com a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, decretada pelo Congresso Nacional, que considera as condições para a utilização de animais em pesquisas científicas, está descrito em seu artigo 2º que as disposições desta lei, aplica-se apenas a espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata. No entanto, essa legislação não se aplica a espécie utilizada no presente trabalho (BRASIL, 2008).

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

A coleta dos camarões foi realizada no rio Grande, município de Água Comprida, Minas Gerais (20°01'05"S; 48°08'24"O) (figura 1). As coletas foram realizadas no período noturno, utilizando armadilhas contendo como isca, milho e pedaços de pão. Os animais foram coletados na manhã do dia seguinte. Após a coleta, os animais foram levados diretamente para o laboratório de zoologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Figura 1 – Local de Coleta



Região da coleta dos camarões. Os mapas 1 e 2 mostram a região de onde foram realizadas as coletas. Fonte: Google Earth, 2018.

A identificação da espécie foi realizada utilizando como parâmetro morfológico o tamanho do rostro, que para a espécie *Macrobrachium amazonicum* apresenta uma curvatura para cima na região distal, apresenta de 7 a 8 dentes proximais formando uma crista superior a órbita e possui um comprimento mais longo que a extremidade distal do escafocerito. Porém como é constatada nas chaves de identificação utilizadas, essa característica pode sofrer variações entre os indivíduos, como nos adultos, ao decorrer do desenvolvimento a extremidade distal do escafocerito pode ultrapassar a extremidade distal do rostro. Sendo assim foram utilizados, também, outros fatores para a identificação da espécie como, por exemplo, o segundo par de pereiópodos, que são semelhantes e possuem espinhos em todos os seus artículos; O telso possui forma cuneiforme e se estreita gradualmente na direção distal,

não apresentando diferenças entre as extremidades esquerdas e direitas, e apresentando dois pares de espinhos látero-posteriores que, no adulto, não ultrapassam a extremidade distal do telso; E por ultimo foi caracterizado o abdome e carapaça, que nessa espécie, se apresentam lisos (DÁVILA; MAGALHÃES, 2003).

É importante destacar, que entre as estruturas analisadas para a identificação as que menos apresentaram variações foram o telso e o segundo par de pereiópodos. E que também para a região do Rio Grande em que os camarões foram coletados, a espécie *M. amazonicum* ocorre com maior frequência seguida da espécie *Macrobachium jelskii*, este ultimo não foi capturado durante as coletas (DÁVILA; MAGALHÃES, 2003; JEKEN, 2009).

3.2 ACLIMATAÇÃO

No laboratório, os animais foram divididos em cinco grupos amostrais, contendo 10 indivíduos por grupo, em baldes contendo 5L de água, o que corresponde a aproximadamente 500 mL de água por camarão. A água utilizada foi previamente tratada com um inativador de cloro da marca Labcon. Os baldes foram cobertos com telas mosquiteiras verdes (Royal Máquinas) para evitar a fuga dos camarões. A aclimatação foi realizada por 5 dias.

Cada balde recebeu aeração constante, e fornecimento de diário de ração Alcon Botton Fish (Alcon) indicada para peixes e crustáceos aquáticos.

O controle de pH foi realizado utilizando o kit de testes Labcon – LabconTest diariamente, juntamente com controle de luminosidade sendo 12h claro e 12h escuro. A troca parcial da água foi realizada de acordo com a tabela:

Tabela 1 – Troca parcial de Água

Dias	1°	2°	3°	4°	5°
Troca de água	0%	20%	20%	30%	30%

Troca parcial da água durante o período de aclimatação. Fonte: Do autor, 2018.

3.3 BIOENSAIO

O bioensaio foi montado no laboratório de Zoologia da UFTM no campus da Univerdisidade, assim como é ilustrado na figura 2:

Figura 2 - Bioensaio



Imagem do modelo utilizado para o bioensaio.
Fonte: Do autor, 2018.

Para isso os camarões foram divididos em seis grupos de acordo com as concentrações de malathion utilizadas, sendo G_0 para 0,0 mg/L (controle); $G_{0,5}$ para 0,5 mg/L; $G_{0,625}$ para 0,625 mg/L; $G_{1,0}$ para 1,0 mg/L; $G_{1,25}$ para 1,25 mg/L e $G_{1,5}$ para 1,5 mg/L de malathion. Os bioensaios foram repetidos cinco vezes ao longo do período experimental e o período de exposição ao inseticida foi de 48 horas. A taxa de mortalidade foi calculada para cada grupo de acordo com o número de camarões mortos ao longo do período experimental.

3.4 CÁLCULO DA DL_{50}

A DL_{50} , ou dose letal mediana, corresponde à dose/concentração de malathion capaz de matar 50% dos camarões. Para saber a DL_{50} com maior precisão, foram calculadas as DL_{50} para cada bioensaio ($N=5$). Para isso, cada bioensaio foi plotado no programa Excel (versão 2010). A partir de cada gráfico foram calculados o efeito máximo (E_{MAX}), que no nosso caso corresponde ao maior número de mortes observadas ao longo do bioensaio. Em seguida, foi calculado o 50% de efeito, que representa à metade do efeito máximo. A partir disso, foi calculada a concentração de malathion que corresponde ao valor de 50% de efeito. Para isso, os dados contidos em cada gráfico foram selecionados e foi traçada uma linha de tendência linear para cada bioensaio/gráfico. Posteriormente, foi obtida a equação da reta que pode ser utilizada para calcular a DL_{50} através da substituição dos valores de y da equação pelo valor do 50% de efeito obtido para cada bioensaio. Outra maneira utilizada foi o cálculo da tendência, onde foi realizado cálculo dos valores de x relacionado aos valores de y, levando em conta o valor de y conhecido, que no nosso caso representa o 50% de efeito. Os valores de

DL₅₀ obtidos para cada bioensaio foram submetidos a uma média com a finalidade de definir a DL₅₀ final.

Após as 48h de bioensaio os camarões foram eutanasiados com banho de gelo, para serem realizados os demais procedimentos experimentais.

3.5 MORFOMETRIA

3.5.1 Morfometria Externa

A morfometria foi realizada mensurando individualmente o comprimento total (do rostro ao telso), comprimento padrão (da extremidade anterior do cefalotórax ao telso), comprimento padrão sem telso (extremidade anterior do cefalotórax ao início do telso), telso, cefalotórax e largura do olho.

3.5.2 Morfometria branquial

Além da morfometria externa foi realizada a medida da área de um dos filamentos branquiais de cada indivíduo, retirados da quarta brânquia do arco branquial. Os filamentos foram corados com violeta genciana (Rioquímica), adicionados sobre um suporte de 5mm² que foi utilizado como parâmetro para realizar a medida da área das estruturas avaliadas. As imagens foram obtidas com a uma câmera digital SAMSUNG modelo SM-G610M/DS acoplada a uma lupa óptica. As medições foram realizadas com o auxílio do software AutoCAD 2007.

3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS BRÂNQUIAS

Após o período experimental os camarões que estavam vivos foram eutanasiados com banho de gelo e, imediatamente fixados numa solução de formalina 10% em água. As brânquias foram retiradas com auxílio de pinças e de uma lupa para então serem processadas histologicamente. As brânquias passaram por desidratação em série crescente de etanol, organizados da seguinte forma: álcool 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, por nove minutos cada e em potência de 20 no micro-ondas. Posteriormente seguiu para a etapa de diafanização em Xilol (álcool xilol, xilol I, II e III), 25 minutos cada.

As brânquias foram submetidas a banho de parafina em estufa a 60 °C, por 2 horas. Após, as brânquias foram incluídas em parafina, obtendo-se o bloco de parafina. Foram realizados 10 cortes seriados com 5µm de espessura, com o auxílio do micrótomo (Leica). Os cortes foram colocados em banho maria aproximadamente a 40 °C e, posteriormente, foram “pescados” 2 cortes com uma lâmina identificando as informações dos camarões. Levou-se a lâmina para platina aquecedora a 40 °C por aproximadamente 1 hora para fixação do corte à lâmina. Na coloração de Hematoxilina e Eosina a parafina foi eliminada com banhos sucessivos de xilol I, II, III e, em seguida, hidratados com série de etanol de diluição decrescente ABS (absoluto) I, II, III e álcool 95%, até a água corrente por 5 minutos cada banho. Cada lâmina foi corada com hematoxilina (50 segundos), lavada em água corrente por 5 minutos e corada com Eosina (50 segundos). Após foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada, seguido de três banhos de xilol também por 5 minutos. Ao final foram adicionadas lamínulas sobre o material utilizando Entelan como “cola” (Sigma). Após a montagem, e secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz (ZEISS, BERLIN, ALEMANHA, modelo AXIOSKOT) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital Axion Cam. As barras de escala, assim com eventuais medidas foram feitas utilizando o software Axion Vision Rel 4.8.2.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

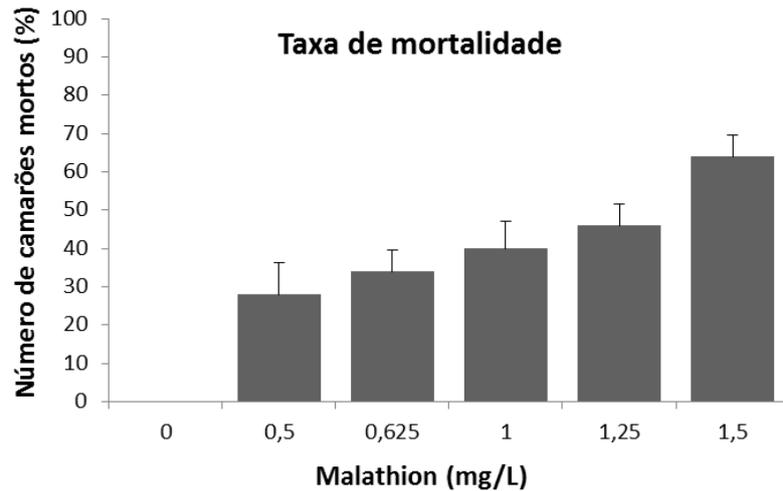
Para as análises estatísticas foi realizada a conversão alométrica, relacionando a área do filamento branquial e o comprimento padrão de cada indivíduo, com o objetivo de descartar os parâmetros da variação de tamanho individual de cada grupo. Para analisar a normalidade do conjunto de dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-smirnov, que é indicado quando o número de indivíduos em cada grupo é maior que 50, e para analisar a influência das concentrações de malathion utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, que é um teste recomendado para a estatística de conjunto dados não paramétricos, em que o N em cada variável é relativamente baixo. Os testes estatísticos visavam comparar o tamanho do filamento branquial de cada indivíduo com o comprimento padrão, e então tentar observar variações significativas que possam estar relacionadas com cada diluição do bioensaio. Todos os valores dos parâmetros morfométricos foram organizados no software Excel e analisados usando softwares Estatística e Biostat 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 BIOENSAIO

Os resultados obtidos após 48h de exposição ao malathion demonstraram que a mortalidade ocorre em todas as concentrações testadas do inseticida (tabela 2). As taxas de mortalidade foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração de malathion entre os grupos testados (0,0% para G₀; 28% para G_{0,5}; 34% para G_{0,625}; 40% para G_{1,0}; 46% para G_{1,25}, e 64% para G_{1,5}). O gráfico 1 mostra a média das taxas de mortalidade obtidas após cinco repetições do bioensaio.

Gráfico 1 – Média da taxa de mortalidade



Taxa de mortalidade de *M. amazonicum* expostos a diferentes concentrações de malathion. Os dados foram obtidos após cinco repetições do bioensaio e representam a média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

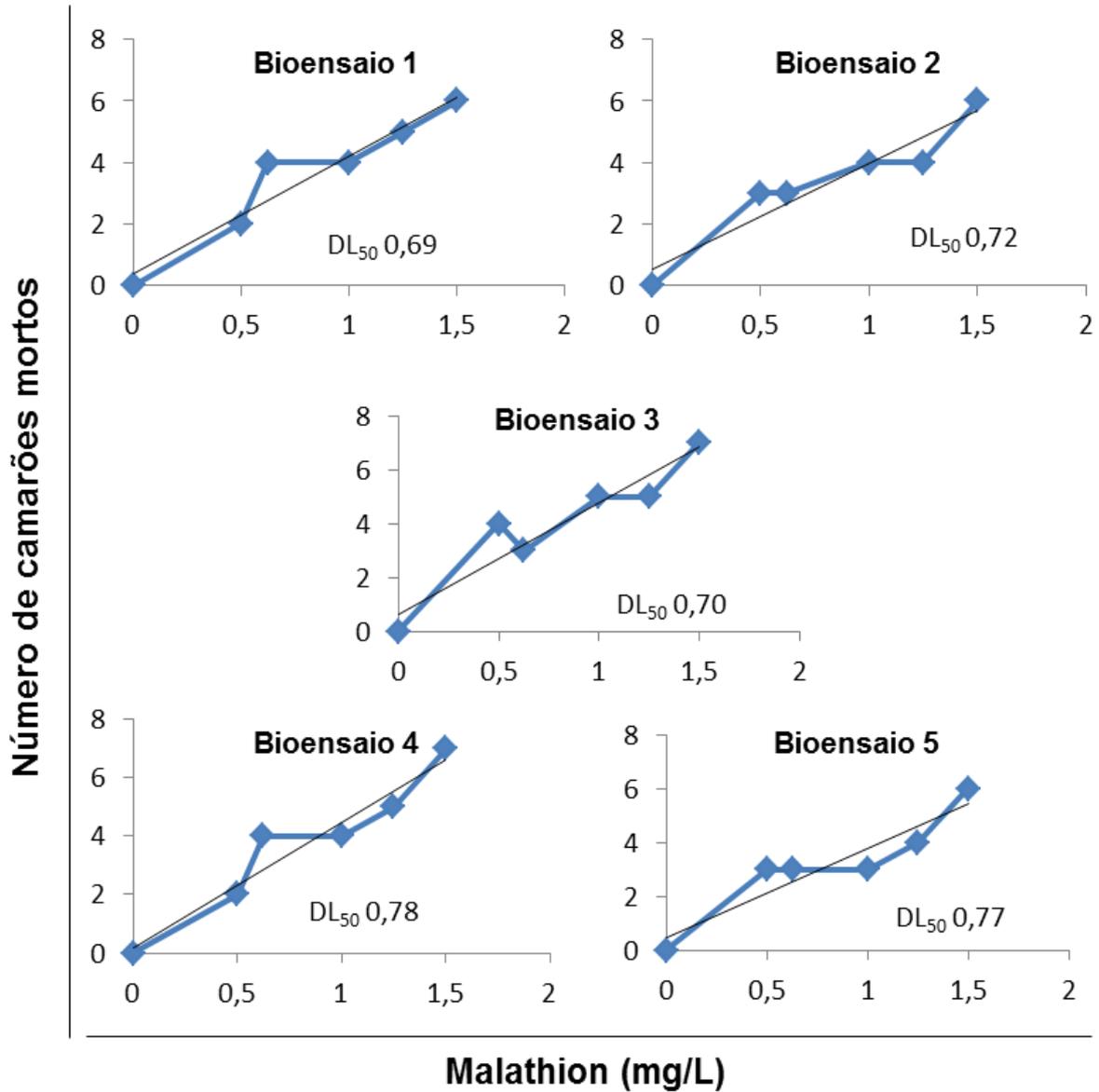
Tabela 2 – Mortalidade em cada bioensaio.

Grupos	Número de repetições					Média \pm DP
	0	30	40	50	60	
G ₀	0	0	0	0	0	0 \pm 0
G _{0,5}	20	30	40	20	30	22 \pm 8,4
G _{0,625}	40	30	30	40	30	34 \pm 5,5
G _{1,0}	40	40	50	40	30	40 \pm 7,1
G _{1,25}	50	40	50	50	40	46 \pm 5,5
G _{1,5}	60	60	70	70	60	64 \pm 5,5

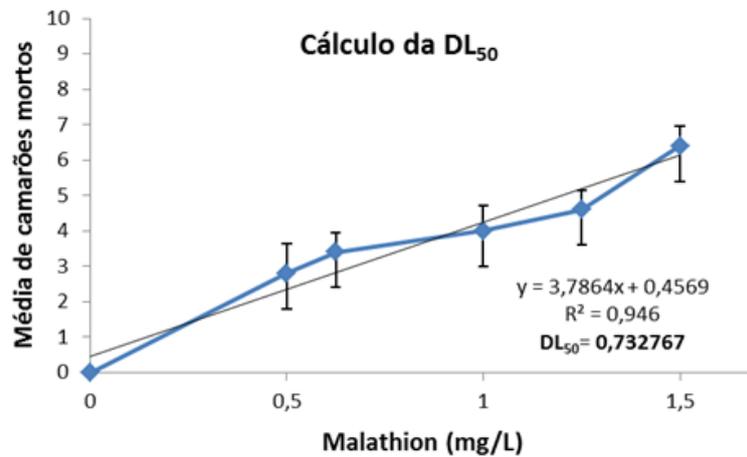
Representação das taxas de mortalidade expressas em porcentagem entre as concentrações de malathion em cada grupo amostral. Os grupos, os números de repetições e as médias \pm DP (desvio padrão) estão representados na tabela. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.2 CÁLCULO DA DL₅₀

A figura 3 mostra o conjunto de gráficos contendo os dados dos bioensaios para a obtenção das DL₅₀. Os bioensaio de 1 a 5 apresentaram valores de DL₅₀ de 0,69 mg/L, 0,72 mg/L, 0,70 mg/L, 0,78 mg/L e 0,77 mg/L de malathion, respectivamente. A partir das DL₅₀ obtidas foi calculado a DL₅₀ final de 0,73 mg/L de malathion. O gráfico 2 representa as médias das taxas de mortalidade e das DL₅₀ obtidos para cada bioensaio.

Figura 3 – DL₅₀Figura 3 - DL₅₀

Representação da DL₅₀ obtida para cada bioensaio. As taxas de mortalidade obtidas para cada experimento foram expressas graficamente para a obtenção das DL₅₀. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 2 – Cálculo DL₅₀

Cálculo da DL₅₀ final. O gráfico mostra a relação direta entre as concentrações crescentes de malathion e taxas de mortalidade para *M. amazonicum*. A distribuição dos valores é acompanhada pela linha de tendência linear e pela equação da reta, que possibilita o cálculo da DL₅₀. Os dados representam cinco repetições do bioensaio e está expresso em valores de média ± desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.3 MORFOMETRIA

4.3.1 Morfometria externa

Por meio das medidas morfométricas foi possível definir individualmente as características do material biológico, por exemplo, o comprimento padrão (da extremidade anterior do cefalotórax até o início do telso), comprimento do cefalotórax, comprimento do telso e largura do olho, com a finalidade de gerar parâmetros individuais para relacionar o tamanho dos filamentos branquiais com outras estruturas corporais. A característica utilizada para essa relação foi comprimento padrão dos camarões com o tamanho máximo de 43,03 mm no bioensaio 1; 42,21 mm no bioensaio 2; 39,89 mm no bioensaio 3; 38,48 mm no bioensaio 4 e 38,76 mm no bioensaio 5.

4.3.2 Morfometria Branquial

As medidas morfométricas realizadas por meio da conversão alométrica entre a área dos filamentos branquiais e o comprimento padrão não foram suficientes para demonstrar alterações em relação ao tratamento com malathion, porém foram importantes para

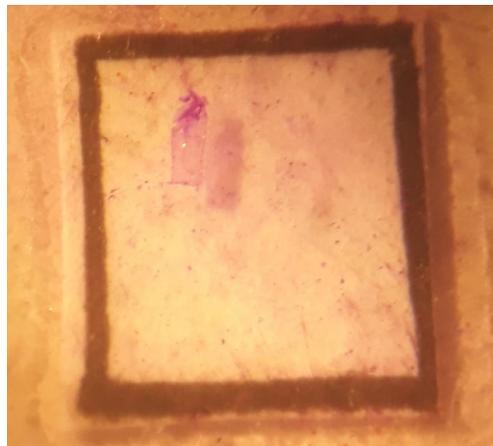
caracterizar variações estruturais entre os indivíduos de cada grupo. As figuras 4 e 5 demonstram a morfologia macroscópica de uma brânquia e de um de seus filamentos, respectivamente.

Figura 4 – Brânquia



Brânquia de *M. amazonicum* corada com violeta genciana e delimitado por um quadrado com área de 25 mm². Fonte: Do autor, 2018.

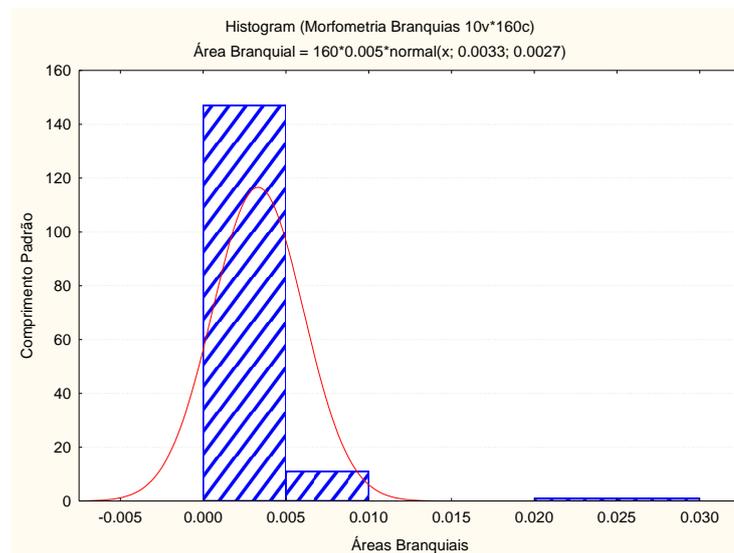
Figura 5 – Filamento branquial



Filamento branquial de *M. amazonicum* corado com violeta genciana e delimitado por um quadrado com área de 25 mm². Fonte: Do autor, 2018.

A análise estatística realizada para analisar as variações dos filamentos branquiais demonstrou um conjunto de dados não paramétricos, e como o “n” de indivíduos é consideravelmente pequeno dentro de cada tratamento, foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, onde o valor de p, a partir de múltiplas comparações se apresentou alto sendo $p=0,2023$. Esse valor representa que não há alterações branquiais consideráveis em relação às quantidades de malathion utilizadas no bioensaio. A média da proporção da área do filamento branquial em relação ao comprimento padrão de cada indivíduo foi de 0,024 (2,4%), assim como ilustra o gráfico 3.

Gráfico 3 – Relação entre área do filamento e comprimento padrão



Relação área do filamento branquial e comprimento padrão do indivíduo. Os dados mostram a relação entre o comprimento padrão e a área branquial de cada camarão, realizado pelo teste de Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

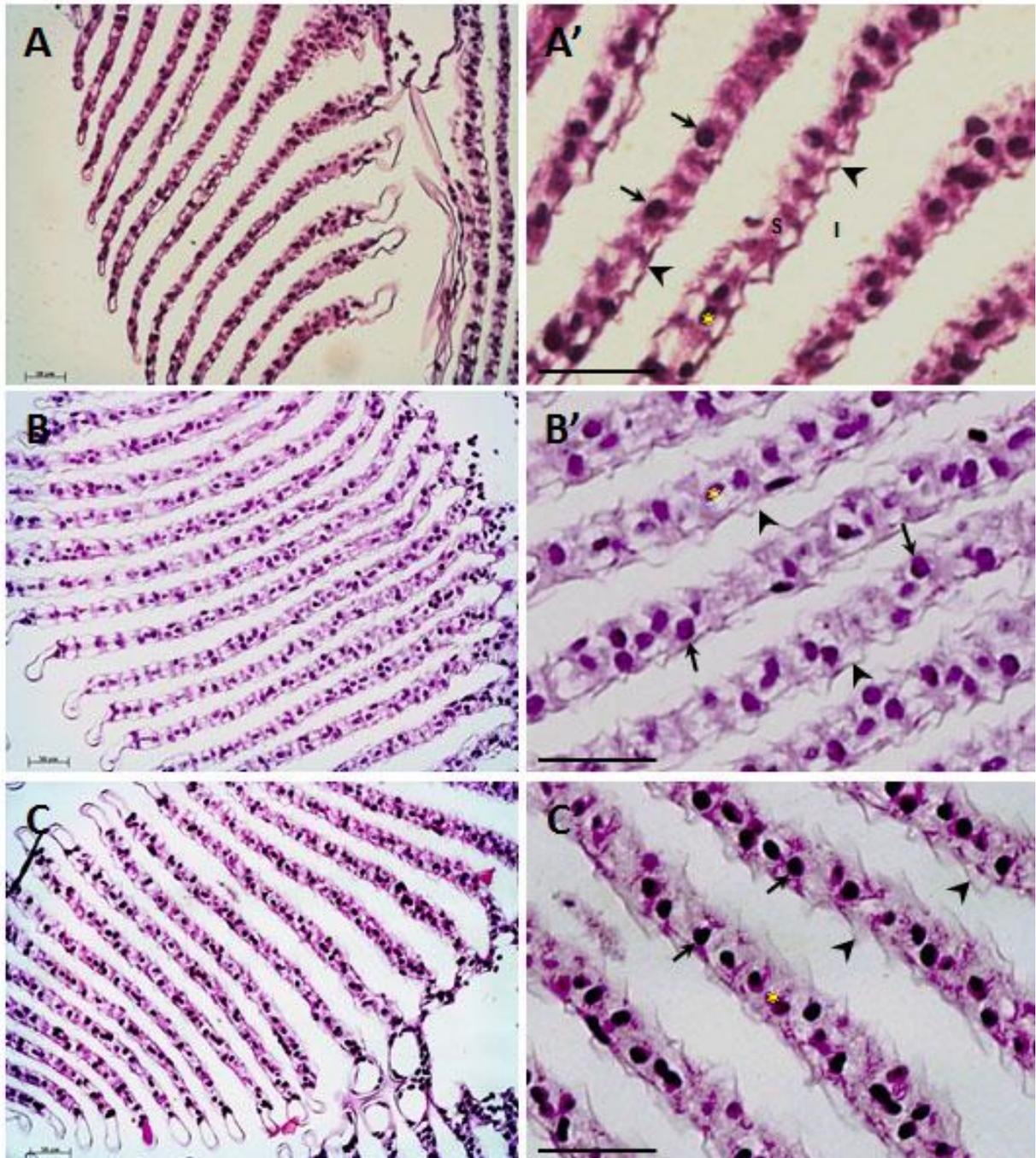
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS

As análises histológicas das brânquias de *M. amazonicum* expostos por 48h ao malathion foram realizadas em dois dos cinco bioensaios, e demonstraram que as concentrações de 0,5 mg/L (grupo $G_{0,5}$) e 0,625 mg/L (grupo $G_{0,625}$) aparentemente não afetam o arranjo das estruturas que compõem as brânquias comparado ao grupo controle (0,0 mg/L G_0). Neste caso, foram visualizadas estruturas comumente observadas em brânquias de *M. amazonicum* com as células pilares, células intraseptais, septo intralamelar e cutícula. O espaço interlamelar permaneceu disposto de maneira uniforme (figura 6A-A', 6B-B' e 6C-

C'). Em 50% dos camarões vivos expostos a 1 mg/mL de malathion foram observados irregularidades ao longo das cutículas, sugerindo um descolamento inicial da mesma; além de uma pequena diminuição no diâmetro das lamelas (fig. 7A e 7A').

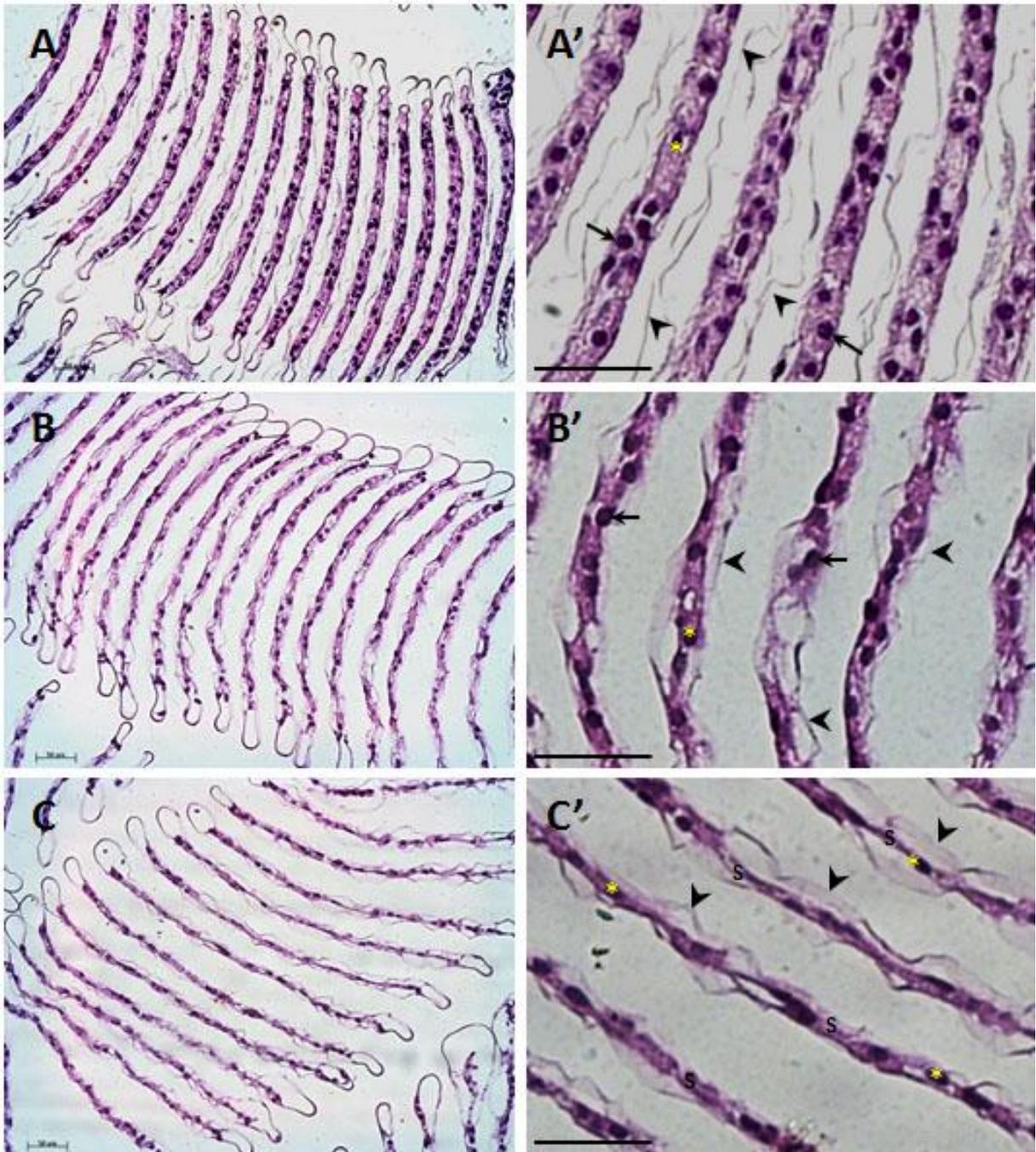
A exposição dos camarões a 1,25 mg/mL de malathion promoveu uma maior diminuição no diâmetro das lamelas e do número de células que compõem a estrutura das mesmas em aproximadamente 55% dos animais, e embora foram observados núcleos de células pilares, existem regiões desprovidas destas células, as quais são responsáveis pela manutenção da estrutura lamelar (fig. 7B e 7B'). Na concentração de 1,5 mg/L de malathion, que corresponde a aproximadamente 2 vezes a DL_{50} , as lamelas começaram a entrar em colapso mediante a expressiva diminuição do número de células pilares em aproximadamente 70% dos camarões avaliados (fig. 7C e 7C').

Figura 6 – Histologia das Brânquias



Histologia de brânquias de *M. amazonicum* expostos ao malathion. **A**, **B** e **C** representam a arquitetura branquial de camarões dos grupos G_0 (controle), $G_{0,5}$ e $G_{0,625}$, respectivamente. As imagens **A'**, **B'** e **C'** correspondem a campos das imagens anteriores ampliados cerca de 3 vezes. As setas indicam os núcleos das células pilares; as cabeças de seta indicam a cutícula; asterisco está sobre o núcleo de células intraseptais; S corresponde ao septo intralamelar e I ao espaço interlamelar. As imagens foram obtidas com objetiva de 20x. Escala de 50 μ m. Coloração HE. Fonte: Do autor, 2018.

Figura 7 – Histologia das Brânquias



Histologia de brânquias de *M. amazonicum* expostos ao malathion. As imagens **A**, **B** e **C** representam a arquitetura branquial de camarões dos grupos $G_{1,0}$, $G_{1,25}$ e $G_{1,5}$, respectivamente. As imagens **A'**, **B'** e **C'** correspondem a campos das imagens anteriores ampliados cerca de 3 vezes. As setas indicam os núcleos das células pilares; as cabeças de seta indicam a cutícula; asterisco está sobre o núcleo de células intraseptais; S corresponde ao septo intralamelar. As imagens foram obtidas com objetiva de 20x. Escala de 50 μ m. Coloração HE. Fonte: Do autor, 2018.

5. DISCUSSÃO

O malathion é um inseticida comumente utilizado como defensivo agrícola em culturas ao redor do mundo e, embora este organosfosforado apresente baixa toxicidade para espécies de mamíferos, espécies aquáticas podem ser sensíveis mesmo a pequenas concentrações deste composto (JOHNSON; FINLEY, 1980; KIDD; JAMES, 1991; TIETZE et al., 1991; SHAO-NAN; DE-FANG, 1996).

No presente estudo, nós mostramos que o camarão *Macrobrachium amazonicum* presente numa dada região do rio Grande apresenta em curto prazo uma menor sensibilidade ao malathion comparado à maioria dos crustáceos aquáticos já estudados, e que acima da DL₅₀ este inseticida começa a afetar a histologia de suas brânquias.

De acordo com FORGET et al., (1998), a toxicidade para crustáceos aquáticos expostos por 96h ao malathion pode variar de 0,001 a 0,28 mg/L dependendo do modelo de estudo. Para crustáceos marinhos como *Homarus americanus* a DL₅₀ pode ser atingida numa concentração de 0,038 mg/L de malathion, para o copepode *Tigriopus brevicornis* a DL₅₀ chega a 0,024 mg/L, enquanto que para o camarão adulto *Palaemonetes pugio* a DL₅₀ foi estimada em 0,038 mg/L (DE GUISE et al., 2004; FORGET et al., 1998; KEY et al., 1998).

Nossos dados mostraram que após 48h de exposição ao malathion, o camarão dulcícola *M. amazonicum* apresentou uma DL₅₀ de aproximadamente 0,73 mg/L. Este achado indica que *M. amazonicum* possui uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do malathion quando comparado a uma gama variada de organismos aquáticos como crustáceos marinhos e microcrustáceos de água doce (DL₅₀ máxima de 0,28 mg/L), e algumas espécies de peixes como o *Sander vitreus* (DL₅₀ 0,06 mg/L) (Forget et al., 1998; Li and Fan, 1996). Entretanto, peixes como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a *Pseudorasbora parva* apresentam valores de DL₅₀ superiores ao do *M. amazonicum* após 96h, sendo 4,6 mg/L e 14,5 mg/L, respectivamente (LI; FAN, 1996).

O valor de DL₅₀ obtido para *M. amazonicum*, embora distante das concentrações apresentadas por crustáceos marinhos, corroboram com estudos que utilizaram com modelo camarões do gênero *Macrobrachium* (YUAN et al., 2004; RICO et al., 2011). Os dados mostraram que após 48h de exposição ao malathion, camarões da espécie *M. nipponense* apresentaram uma DL₅₀ de 0,92 mg/L, enquanto que para os camarões *M. ferreirai* a DL₅₀ foi de aproximadamente 0,4 mg/L após 96h (YUAN et al., 2004; RICO et al., 2011). Tais diferenças entre as DL₅₀ não descartam *M. amazonicum* como bioindicador, e embora existam estudos com a família Palaemonidae, poucos utilizaram como modelo camarões do gênero

Macrobrachium, que representam camarões de grande interesse comercial e amplamente explorados na carcinicultura.

A sensibilidade ou resistência a determinados compostos considerados tóxicos está diretamente ligada ao acesso deste às células dos animais expostos. As brânquias são estruturas compartilhadas por diversos organismos aquáticos, possuindo locais que proporcionam trocas gasosas e iônicas, o que é de fundamental importância para a sobrevivência, especialmente de crustáceos, em diferentes ambientes aquáticos (FREIRE et al., 2008; MENSAH, MÜLLER, PALMER, 2011; LEONE et al., 2017).

Embora as brânquias contribuam como barreira seletiva para moléculas orgânicas e inorgânicas, sua proximidade com a água possibilita a ação de agentes tóxicos, que podem causar danos na sua estrutura e, conseqüentemente comprometer suas funções (HENRY et al., 2012; SARAVANA; GERALDINE, 2000).

Assim, quando as brânquias são expostas a certas concentrações de um composto tóxico por um determinado tempo (dias ou horas), lesões como respostas inflamatórias podem caracterizar uma reação de defesa básica (WERNER, 2010; VEGAD, 2015) diminuindo as áreas de superfície vulnerável e/ou aumentando a difusão do contaminante (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

Estudos em peixe mosquito *Gambusia affinis* mostraram que a partir de 10 dias de exposição a concentrações subletais de malathion (0,01 – 0,02 mg/L), foram observadas alterações nas estruturas das brânquias como necrose, hipertrofia e descamação do epitélio das lamelas (CENGIZ, ÜNLÜ, 2003). Além disso, recente estudo tem mostrado que a combinação de inseticidas como Clorpirifós (organofosforado) e Cipermetrina (piretróide) promove alterações nas estruturas branquiais do caranguejo *Parathelphusa jacquemontii* após 28 dias de exposição. As alterações comumente observadas foram edema, necrose e fusão lamelar (MAHARAJAN et al., 2015). Para o gênero *Macrobrachium*, a exposição do camarão *Macrobrachium malcolmsonii* durante 21 dias ao inseticida Endosulfan, promoveu alterações nas lamelas como necrose, edema, hiperplasia e fusão lamelar (SARAVANA; GERALDINE, 2000).

Os resultados obtidos para *M. amazonicum* demonstraram que em curto prazo (48h) o malathion não promove alterações macroscópicas nas brânquias. A correção alométrica foi utilizada para descartar as variáveis naturais que podem ocorrer individualmente na espécie *M. amazonicum*, mantendo apenas a variável desejada. Nossos dados mostraram que os tamanhos dos filamentos branquiais mantiveram-se em torno de 2,4% do comprimento padrão de cada indivíduo em todos os tratamentos do bioensaio. Dessa forma, as medidas não

demonstraram uma relação entre o tamanho da brânquia e a concentração de malathion. Assim, sugerimos que este tipo de análise não seja utilizado como parâmetro de bioindicação.

As análises histológicas das brânquias de *M. amazonicum* expostos por 48h ao malathion foram realizadas em dois dos cinco bioensaios, e demonstraram que as concentrações de 0,5 mg/L (grupo G_{0,5}) e 0,625 mg/L (grupo G_{0,625}) aparentemente não afetam o arranjo das estruturas que compõem as brânquias comparado ao grupo controle (0,0 mg/L G₀). Neste caso, foram visualizadas estruturas comumente observadas em brânquias de *M. amazonicum* com as células pilares, células intraseptais, septo intralamelar e cutícula. O espaço interlamelar permaneceu disposto de maneira uniforme (figs. 6A-6A', 6B-6B', 6C-6C'). Em 50% dos camarões vivos expostos a 1 mg/mL de malathion foram observados irregularidades ao longo das cutículas, sugerindo um descolamento inicial da mesma; além de uma pequena diminuição no diâmetro das lamelas (fig. 7A e 7A').

A exposição dos camarões a 1,25 mg/mL de malathion promoveu uma maior diminuição no diâmetro das lamelas e do número de células que compõem a estrutura das mesmas em aproximadamente 55% dos animais, e embora foram observados núcleos de células pilares, existem regiões desprovidas destas células, as quais são responsáveis pela manutenção da estrutura lamelar (fig. 7B e 7B'). Na concentração de 1,5 mg/L de malathion, que corresponde a aproximadamente 2 vezes a DL₅₀, as lamelas começaram a entrar em colapso mediante a expressiva diminuição do número de células pilares em aproximadamente 70% dos camarões avaliados (fig. 7C e 7C'). Estes mostraram que mesmo em curto prazo, concentrações superiores a DL₅₀ foram capazes de iniciar um processo de desestruturação das lamelas, e embora não tenham levado os camarões analisados histologicamente à morte, corroboraram com a crescente taxa de mortalidade observada entre os grupos (0,0% para G₀; 28% para G_{0,5}; 34% para G_{0,625}; 40% para G_{1,0}; 46% para G_{1,25}, e 64% para G_{1,5}).

Estudos que demonstram alterações morfológicas em brânquias de camarões de *Macrobrachium amazonicum* expostas a inseticidas por um curto período de tempo são escassos na literatura. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que mesmo por um breve período, a exposição de organismos aquáticos a um agente tóxico pode promover alterações fisiológicas que venham comprometer seu crescimento, reprodução, etc. No peixe *Corydoras punctatus*, por exemplo, o malathion causou danos significativos nos glóbulos vermelhos mesmo a uma concentração considerada baixa (0,05 mg/L) e após 5 dias de exposição (SAWHNEY; JOHAL, 2000).

Nossos dados mostraram que mesmo resistindo a valores de DL₅₀ superiores ao da maioria dos demais crustáceos aquáticos e marinhos, *M. amazonicum* não passa ileso ao

malathion. Este é o primeiro estudo demonstrando que mesmo em curto prazo, o malathion interfere na estrutura microscópica das brânquias de camarões do gênero *Macrobrachium*, e vem contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos causados por defensivos agrícolas sobre os organismos aquáticos que, comumente ficam expostos a estes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo assim é possível considerar que o uso de espécies nativas como bioindicadores apresenta-se como uma forma interessante e eficiente para monitorar a qualidade da água em diferentes regiões e, embora os organismos mais utilizados sejam peixes e bivalves, os crustáceos vêm provando serem organismos sensíveis para avaliar a poluição do ecossistema aquático. O investimento no conhecimento científico é importante para avaliar os riscos e danos provocados por inseticidas e agrotóxicos ao meio ambiente, possibilitando o desenvolvimento de métodos de prevenção à poluição e conservação ambiental mais preciso. Assim, o presente estudo traz como opção para o biomonitoramento o uso de camarões da espécie *M. amazonicum*, mediante os efeitos bioindicadores apresentados por esta espécie após exposição ao malathion.

REFERÊNCIAS

ABE, F. R. Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle de larva de *Aedes aegypti* e peixes *Daphnia magna*, *Lemna minor*. p. 130, 2012.

SAMPAIO, S. R; NAGATA J. K; LOPES, O. L; MASUNARI, S. Freshwater shrimps (Crustacea , Caridea) from the eastern Atlantic Basin with a tabular identification key. **Acta Biológica Paranaense**, v. 38, p. 11–34, 2009.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

BAKRY, F. A.; HASHEESH, W. S.; HAMDY, S. A. H. Biological, biochemical, and molecular parameters of *Helisoma duryi* snails exposed to the pesticides Malathion and Deltamethrin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 86–92, 2011.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08.10.2008. **Inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais**. Brasília, DF, 2008.

CENGIZ, E. I.; ÜNLÜ, E. Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion. **Journal of Environmental Science and Health, part B**, v. 38, 581-589, 2003.

SANTOS, P. C. G; COSTABILE, D; BENEVIDES, F. B; BATISTA, J. C; SAROBA, L; SEGURA, R; MANTOVANI, T. M. Intoxicação por organofosforados. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n. 03, 2004.

COLER, R. A. et al. A preliminary report on the application of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Decapoda: Palaemonidae) as a biomarker. **Hydrobiologia**, v. 412, p. 119–121, 1999.

DÁVILA GARCIA, C. R.; MAGALHÃES, C. Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana, **Acta Amazonica**, 2003.

DUTRA, F. M. et al. Acute Toxicity of Nitrite to Various Life Stages of the Amazon River Prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 5, p. 619–625, 2016.

DE GUISE, S.; MARATEA, J.; PERKINS, C. Malathion immunotoxicity in the American lobster (*Homarus americanus*) upon experimental exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 4, p. 419–425, 2004.

ERKMEN, B., KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bull Environ Contam Toxicol** 64, 418-425, 2000.

FALEIROS, R. O. et al. Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺- and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 22, p. 3894–3905, 2010.

FORGET, J., PAVILLON, J.F., MENANSRIA, M.R., BOCQUENE, G., Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. **Ecotoxicol Environ Saf**, 40, 239-244, 1998.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J. C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 272–304, 2008.

HENRY, R.P., LUCU, C., ONKEN, H., WEIHRAUCH, D., Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Front Physiol** v.3, n. 431, 2012.

ISLAM, M. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 7–8, p. 624–649, 2004.

JONHSON, W.W., FINLEY, M.T. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication 137. **US Department of Interior, Fish and Wildlife Service**, Washington, DC, 1980

KEY, P.B., FULTON, M.H., SCOTT, G.I., LAYMAN, S.L., WIRTH, E.F., Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Aquatic Toxicology** n. 40, p. 311-322, 1998.

KIDD, H., JAMES, D.R., The Agrochemicals Handbook, third ed. **Royal Society of Chemistry Information Services**, Cambridge, UK, 1991.

LEONE, F.A., LUCENA, M.N., GARÇON, D.P., PINTO, M.R., MCNAMARA, J.C., Gill Ion Transport ATPases and Ammonia Excretion in Aquatic Crustaceans, **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates Mechanisms and Strategies in Various Invertebrate Groups with Considerations of Challenges Caused by Ocean Acidification**, p. 61-107, 2017.

LI, S.N., FAN, D.F., Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion, **J. Toxicol Environ Health**. n. 48, p. 413-418, 1996.

MALATHION, E. Malathion 500 e. p. 1–12, [s.d.].

MAHARAJAN, A., NARAYANASAMY, Y., GANAPIRIYA, V., SHANMUGAVEL, K., Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). **The Journal of Basic & Applied Zoology** n. 72, p. 104-112, 2015.

- MENSAH, P. K.; MULLER, W. J.; PALMER, C. G. Acute toxicity of Roundup® herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 36, n. 14–15, p. 905–909, 2011.
- MORAES, R. B. C. et al. Efeito de sedimentos contaminados sobre a excreção de nitrogênio do camarão *Penaeus paulensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 4, p. 0–0, 1999.
- PINTO, M. R; LUCENA, M. N. Qualidade da água: metais poluentes, monitoramento, biomarcadores e métodos de identificação. In: HAYASHI, C. **Tópicos de atualização em ciências aquáticas**. Uberaba: UFTM, 2014.
- REDDY, D. S. Neurosteroids for the potential protection of humans against organophosphate toxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1378, n. 1, p. 25–32, 2016.
- RICO, A., WAICHMAN, A.V., GEBER-CORREA, R., VAN DEN BRINK, P.J., 2011. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. **Ecotoxicology**, n. 20, p. 625-634.
- SARAVANA B, P., GERALDINE, P., Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquat Toxicol**, n. 50, p. 331-339, 2000.
- SARAVANA, B, P.; GERALDINE, P. Biochemical Stress Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 1, p. 27–41, 2001.
- SAWHNEY, A.K., JOHAL, M.S. Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). **Bull Environ Contam Toxicol**, 64, 398-405, 2000.
- SHAO-NAN, L., DE-FANG, F., 1996. Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. **J. Toxicol. Environ. Health** n. 48, p. 413–418.
- SILVA, J. C. D. Biologia e ecologia dos camarões de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Helle 1862) e *Macrobrachium jelskii* (Miers 1778) (Crustacea: Caridea: Palaemonidae) no Rio Grande, Região de Planura, MG. **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu**, p. 85, 2010.
- TIETZE, N.S., HESTER, P.G., HALLMON, C.F., OLSON, M.A., SHAFFER, K.R., 1991. Acute toxicity of mosquitocidal compounds to young mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Am. Mosq. Control Assoc.** n.7, p. 290–293.
- VEGAD, J.L., A Textbook of Veterinary General Pathology. **Cbs Publishers & Distributors, New Delhi**, p 589, 2015.
- WERNER, P.R., Patologia Geral Veterinária Aplicada. **Genroca**, São Paulo, p 233-243, 2010.
- WILKINSON, K. J.; REINHARDT, A. **Kevin J. Wilkinson and Alain Reinhardt**, 2005.

YUAN, C. Y.; CHEN, C. H.; K. YUAN, Y., Sublethal Effects of Paraquat and Malathion on the Freshwater Shrimp, *Macrobrachium nipponense*, **Acta Zoologica Taiwanica**, 2004.

ZHANG, F. et al. Differential Expression of Hemolymph Proteins Between Susceptible and Insecticide-Resistant *Blattella germanica* (Blattodea : Blattellidae). **Molecular Ecology and Evolution**, v. 43, p. 1117–1123, 2014.