



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA
NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

EFEITOS ADVERSOS DO INSETICIDA MALATION SOBRE ANFÍBIOS

FELIPE ANDRÉ FUSIGER



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA
NATUREZA (ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

EFEITOS ADVERSOS DO INSETICIDA MALATION SOBRE ANFÍBIOS

FELIPE ANDRÉ FUSIGER

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientadora: Prof. Dra. Carla Vermeulen Carvalho
Grade

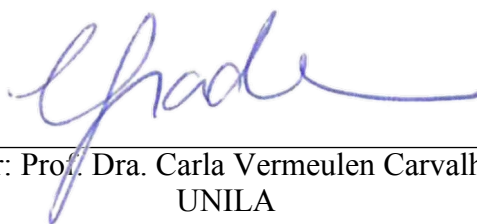
Foz do Iguaçu
2022

FELIPE ANDRÉ FUSIGER

EFEITOS ADVERSOS DO INSETICIDA MALATION SOBRE ANFÍBIOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade
UNILA



Prof. Dra. Ana Cláudia de Castro Marcato



Dra. Giseli Karenina Traesel
UNILA

Foz do Iguaçu, 28 de julho de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Felipe André Fusiger _____

Curso: Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade _____

| | | Tipo de Documento |
|---|--|-------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo | |
| <input type="checkbox"/> especialização | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso | |
| <input type="checkbox"/> mestrado | <input type="checkbox"/> monografia | |
| <input type="checkbox"/> doutorado | <input type="checkbox"/> dissertação | |
| | <input type="checkbox"/> tese | |
| | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais | |
| | <input type="checkbox"/> | |

Título do trabalho acadêmico: Efeitos adversos do inseticida malation sobre anfíbios _____

Nome do orientador(a): Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade _____

Data da Defesa: 28/07/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):


a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 28 de julho de 2022.



Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade, por ter aceitado entrar nessa jornada comigo, por toda orientação e ensinamentos passados, toda paciência, compreensão e apoio, por ter acreditado no meu potencial como pesquisador, pelos conselhos, puxões de orelha e amizade durante este período de pouco mais de um ano de orientação.

À Profa. Dra. Ana Claudia de Castro Marcato e à Dra. Giseli Karenina Traesel, por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste Trabalho de Conclusão de Curso, e pelas correções, dicas e ensinamentos passados durante a defesa.

À minha família, que sempre me apoiou e acompanhou cada passo da minha trajetória. Aos meus pais, que com muita atenção e carinho foram meu porto seguro nas dificuldades, e sempre me deram todo o suporte e incentivo para que eu pudesse vencer em todas as etapas da vida. Vocês são um exemplo de amor, carinho, determinação e trabalho duro, e não há palavras que descrevam o quão importantes são para mim. Não há palavras que descrevam meu amor por vocês e só tenho a agradecer por me amarem exatamente como sou. Ao meu irmão que cresceu ao meu lado e me acompanhou desde o momento em que pedi por um irmãozinho, assim como todos os seus amigos de escola tinham, que quando criança me perturbava a todo momento, e hoje é um irmão carinhoso e amoroso. A minha cunhada, pela companhia e cumplicidade, além das viagens que aliviaram os dias de estresse. À minha prima, bióloga e mestra em neurociências (e logo doutora), Jordana, pelas risadas, conselhos e auxílios em diversos momentos do curso, e por ser uma das maiores inspirações na minha vida. Ao meu primo Matheus, pelos diversos momentos compartilhados, incluindo as brincadeiras de criança. Aos meus queridos tios e tias que sempre fizeram parte das nostálgicas viagens de férias. À minha querida avó Olívia, a última que me resta, por todo carinho e amor. Ao meu querido e falecido avô Claudio, por seu carinho e ensinamentos. Sempre me lembrarei, todos os dias 12 de agosto, meu aniversário, das suas últimas palavras para mim, de como me ensinou a jogar canastra, e como ficava feliz quando chegávamos de surpresa de uma longa viagem.

Às minhas colegas Mariana Albuquerque e Helena Vieira, meu querido “trio”, pelos diversos momentos especiais compartilhados ao meu lado, pelas risadas, conselhos, amizade e companheirismo, em todos os momentos. Por todas as vezes que choramos juntos, que comemoramos juntos, e que nos divertimos juntos. Vocês são minha segunda família, são como irmãs que levarei para toda a vida.

Aos meus demais colegas de curso que estiveram sempre comigo, em especial à

Gabriela Alves, por sempre me ouvir nos momentos de dificuldade, sempre me apoiar e compartilhar diversos momentos preciosos comigo, por ouvir meus áudios gigantescos, e por sempre topar aquelas saidinhas de última hora. Ao Gabriel Lucas, por estar presente em todos os momentos, por me animar em dias de dificuldade, pela companhia e risadas, e por ser meu companheiro de jogos. Ao Allan Gabriel, por todos os conselhos e auxílios ao longo do curso, em especial nessa reta final, e por ser esse gênio incrível da biologia. Agradeço a todos os meus amigos que fizeram desta graduação uma experiência única e prazerosa.

À minha amiga Cleidiane, por sempre estar ao meu lado, por todo apoio, compreensão e carinho, por ouvir horas de áudio, por compartilhar os mais diversos dramas e conquistas da vida cotidiana e fazer dos meus dias mais alegres. À minha amiga Gabrielly Naomy, que há tantos anos me apoia e me ouve nos momentos baixos, me aconselha e partilha risadas. À Cristiane e Cristina, pelo companheirismo, fofocas e risadas durante meu primeiro estágio obrigatório. Aos demais amigos que já estavam comigo a muito tempo, e aos que a vida me trouxe, por todos os momentos divididos comigo: Thiago, Rafael, Isaque, Kathia, Gabriela Naomi, Gabriela Bonfim, Josiane, Stephanie, Ágatha, Alicia, Renata, Laura e Vinícius Fernandes.

À Méllanie e Maico, que me receberam juntamente da Profa. Dra. Evelise no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal da UFSC. Por todos os momentos que compartilharam comigo, as rotinas de laboratório, os cafezinhos, as saídas de sextas-feiras e sábados, e por todos os ensinamentos que ajudaram a construir ao longo do meu incrível estágio em Florianópolis.

À minha querida professora de piano Elisângela Dias Bezerra, por tantos anos acompanhando meus passos, pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos e conselhos, e por fazer da música a mais bela forma de arte aos meus olhos. Graças a você, a música e o piano são o toque mágico na minha vida, que me acalmam e me trazem paz.

À minha psicóloga Daniella, que tem me acompanhado ao longo desse ano de 2022 e me auxiliado com diversas questões pessoais, bem como com o próprio desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da graduação que fizeram parte desta trajetória e muito me ensinaram, em especial ao Hermes, que aceitou ser meu orientador de Iniciação científica e por dois anos me orientou, com muitos conselhos, dicas e companheirismo. À Carla, que além de incrível orientadora, me apresentou ao maravilhoso mundo da biologia do desenvolvimento. Ao Cleto, por sempre ser um “paizão” e auxiliar demais com diversas questões universitárias, além das incríveis aulas de algas, fungos e arquegoniadas. A Laura, pelas maravilhosas aulas de botânica, e por me acompanhar, juntamente de minhas colegas, na publicação do nosso primeiro artigo científico. Aos

professores Michel e Nuno, pelas fantásticas aulas de ecologia. À Elaine, pelas aulas inesquecíveis de zoologia e suas explicações didáticas com objetos diversos.

Por fim, agradeço ainda à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pela oportunidade de estudar a incrível e vasta área da Biologia, pelas viagens de campo que proporcionou ao curso e seus alunos, pela qualidade de ensino, e pelos ensinamentos que me trouxe.

RESUMO

Os pesticidas são compostos químicos amplamente utilizados no combate de organismos considerados pragas, principalmente na agricultura. O Brasil é um grande consumidor destes compostos e, entre os mais utilizados no país e no mundo está o malation. Este inseticida organofosforado é conhecido por atuar no sistema colinérgico e inibir colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase. Embora utilizado principalmente na agricultura, o malation também é empregado no controle de vetores, como o mosquito da dengue, através do fumacê. Diversos estudos vêm demonstrando que a exposição ao malation é responsável por causar uma série de efeitos adversos a outros animais como peixes, aves e anfíbios. Os anfíbios, em especial, apresentam um importante papel em ensaios de ecotoxicidade devido a sua sensibilidade a compostos químicos danosos, assumindo o papel de bioindicadores da qualidade do ambiente em que vivem, e como parâmetro para os potenciais riscos desses compostos ao ser humano. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo a realização de uma revisão da literatura acerca dos efeitos adversos do inseticida malation sobre anfíbios. Através da busca no *website* PUBMED, foi realizado um levantamento dos diferentes resultados encontrados. Foram extraídas informações de 50 estudos, datados de 1983 a 2020, descrevendo efeitos adversos causados pelo malation em 27 espécies de anfíbios. A partir da revisão, observou-se que a exposição ao malation pode gerar efeitos negativos sobre a taxa de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento, ocasionar alterações comportamentais, danos ao DNA, alterar parâmetros bioquímicos e fisiológicos, comprometer o sistema imune, inibir as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, e ainda levar a diversas malformações. Todas as informações obtidas foram sintetizadas em formato de tabela, facilitando a visualização das espécies afetadas e as implicações provocadas, assim como índices de toxicidade determinados nos estudos. A quantidade de estudos acerca dos efeitos da exposição aguda e crônica ao malation em anfíbios é menor do que a esperada, mas os artigos trazem informações importantes acerca dos extensos danos a esses animais, ainda que haja carência de estudos de genotoxicidade e bioacumulação.

Palavras-chave: organofosforado; toxicidade; colinesterases; pesticida.

RESUMEN

Los plaguicidas son compuestos químicos ampliamente utilizados para combatir organismos considerados plagas, principalmente en la agricultura. Brasil es un gran consumidor de estos compuestos y, entre los más utilizados en el país y en el mundo, está el malatión. Se sabe que este insecticida organofosforado actúa sobre el sistema colinérgico e inhibe las colinesterasas, principalmente la acetilcolinesterasa. Aunque se usa principalmente en la agricultura, el malatión también se usa para controlar vectores, como el mosquito del dengue, a través del humo. Varios estudios han demostrado que la exposición al malatión es responsable de causar una serie de efectos adversos a otros animales como peces, aves y anfibios. Los anfibios, en particular, juegan un papel importante en las pruebas de ecotoxicidad debido a su sensibilidad a los compuestos químicos nocivos, asumiendo el papel de bioindicadores de la calidad del medio ambiente en el que viven, y como parámetro de los riesgos potenciales de estos compuestos para los humanos. Así, el presente estudio tuvo como objetivo realizar una revisión de la literatura sobre los efectos adversos del insecticida malatión en anfibios. A través de la búsqueda en la página web de PUBMED se realizó un relevamiento de los diferentes resultados encontrados. Se extrajo información de 50 estudios, que datan de 1983 a 2020, que describen los efectos adversos causados por el malatión en 27 especies de anfibios. De la revisión se observó que la exposición al malatión puede generar efectos negativos en la tasa de supervivencia, crecimiento y desarrollo, provocar cambios de comportamiento, daño en el ADN, modificar parámetros bioquímicos y fisiológicos, comprometer el sistema inmunológico, inhibir las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, y todavía conducen a varias malformaciones. Toda la información obtenida se resumió en formato de tabla, facilitando la visualización de las especies afectadas y las implicaciones ocasionadas, así como los índices de toxicidad determinados en los estudios. El número de estudios sobre los efectos de la exposición aguda y crónica al malatión en anfibios es menor de lo esperado, pero aportan información importante sobre el extenso daño a estos animales, aunque faltan estudios sobre genotoxicidad y bioacumulación.

Palabras clave: organofosforado; toxicidad; colinesterasas; pesticida.

ABSTRACT

Pesticides are chemical compounds widely used to combat organisms considered pests, mainly in agriculture. Brazil is a major consumer of these compounds and, among the most used in the country and in the world, is malathion. This organophosphate insecticide is known to act on the cholinergic system and inhibit cholinesterases, mainly acetylcholinesterase. Although used mainly in agriculture, malathion is also used to control vectors, such as the dengue mosquito, through smoke. Several studies have shown that exposure to malathion is responsible for causing a series of adverse effects to other animals such as fish, birds and amphibians. Amphibians, in particular, play an important role in ecotoxicity tests due to their sensitivity to harmful chemical compounds, assuming the role of bioindicators of the quality of the environment in which they live, and as a parameter for the potential risks of these compounds to humans. Thus, the present study aimed to carry out a review of the literature on the adverse effects of malathion insecticide on amphibians. Through the search on the PUBMED website, a survey of the different results found was carried out. Information was extracted from 50 studies, dating from 1983 to 2020, describing adverse effects caused by malathion in 27 species of amphibians. From the review, it was observed that exposure to malathion can generate negative effects on the rate of survival, growth and development, cause behavioral changes, DNA damage, change biochemical and physiological parameters, compromise the immune system, inhibit acetylcholinesterase enzymes and butyrylcholinesterase, and lead to several malformations. All the information obtained was summarized in a table format, facilitating the visualization of the affected species and the implications caused, as well as the toxicity indices determined in the studies. The number of studies on the effects of acute and chronic exposure to malathion in amphibians is smaller than expected, but they bring important information about the extensive damage to these animals, although there is a lack of studies on genotoxicity and bioaccumulation.

Key words: organophosphate; toxicity; cholinesterases; pesticide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AChE | Acetilcolinesterase |
| BChE | Butirilcolinesterase |
| CAT | Catalase |
| GR | Glutaciona Redutase |
| CSF | Fator Citostático |
| DDT | Dicloro-Difenil-Tricloroetano |
| EMI2 | <i>Early Mitotic Inhibitor 2</i> |
| GSH | Glutaciona Reduzida |
| GSSH | Glutaciona Oxidada |
| KLH | Hemocianina de Lapa |
| LC50 | Concentração Letal Mediana |
| LD50 | Dose Letal Mediana |
| NAD ⁺ | Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina |
| UE | União Europeia |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 ANFÍBIOS COMO BIOINDICADORES E ALVOS VULNERÁVEIS DA POLUIÇÃO AQUÁTICA..... | 14 |
| 1.2 O MALATION..... | 15 |
| 2 OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 17 |
| 3 METODOLOGIA..... | 18 |
| 4 RESULTADOS..... | 19 |
| 4.1 EFEITOS DO MALATION SOBRE A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA, LC50 E LD50 EM ANFÍBIOS..... | 19 |
| 4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS..... | 21 |
| 4.3 EFEITO SOBRE AACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE..... | 23 |
| 4.4 EFEITOS GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO..... | 25 |
| 4.5 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS..... | 25 |
| 4.6 ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE..... | 26 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 34 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são compostos químicos usados principalmente na agricultura para o controle de pragas, como insetos e ervas daninhas, ou doenças. São frequentemente utilizados também no controle de vetores transmissores de doenças (ALEWU; NOSIRI, 2011; WHO, 1990). Com seus primeiros registros datando de 3000 anos atrás, os pesticidas só passaram a ser amplamente utilizados no século XX, com os avanços da era industrial (HASSAAN; EL NEMR, 2020; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1969), principalmente em monoculturas (EL NEMR et al., 2013; EL NEMR; ABD-ALLAH, 2004; HASSAAN; EL NEMR, 2020; SALEM; KHALED; NEMR, 2013; USDA-NASS, 2020), a fim de garantir maior produção de alimentos para a população constantemente crescente (EL NEMR et al., 2013; EL NEMR; ABD-ALLAH, 2004; HASSAAN; EL NEMR, 2020; SALEM; KHALED; NEMR, 2013; USDA-NASS, 2020).

Segundo a Base de Dados de Pesticidas da União Europeia (UE), em 2022 há 1378 ingredientes ativos, 449 dos quais estão aprovados para uso, enquanto 934 estão banidos da União Europeia (EU, 2022). Neste cenário, o Brasil se destaca como um grande consumidor de pesticidas no mundo (PELAEZ et al., 2010). No país, diversos compostos utilizados são proibidos na UE. Entre os dez compostos mais usados, três não podem ser utilizados em território da UE, sendo eles o acefato, a atrazina e o paraquat (ANVISA, 2017; EU, 2022; PAN CONSOLIDATED, 2018).

Além dos banimentos de pesticidas praticados em diversos locais do mundo, na UE há ainda restrições na quantidade de agrotóxicos total existentes na água. No Brasil, contudo, a limitação máxima é feita por composto ativo e não para o total de agrotóxicos (IPEA, 2019). Essas restrições existem pois as formulações dos pesticidas costumam não ser específicas para espécies-alvo, sendo tóxicas para espécies não-alvo (MAHAJAN et al., 2018; PLAZA; MARTÍNEZ-LÓPEZ; LAMBERTUCCI, 2019; RUIZ-SUÁREZ et al., 2015; WAGNER et al., 2013), além de poderem ser persistentes no meio ambiente a longo prazo (FOSU et al., 2017; JÜRGENS et al., 2016; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1969), afetando diversos animais, como as abelhas (MULLIN, 2015), peixes (HOLDEN, 1973; FISCHER, 2021; WERNER et al., 2021), aves (FRY, 1995; UMAR; HUSSAIN; MALONEY, 2023), e também seres humanos. Esses químicos são responsáveis ainda por contaminar diversos ambientes, em especial os aquáticos, trazendo consequências de longo-prazo (ALLEVA et al., 2018; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1969; QUIJANO et al., 2016; WOODROW; GIBSON; SEIBER, 2019).

Para analisar os efeitos desses contaminantes agrícolas em ambientes aquáticos, é possível que sejam realizadas análises físico-químicas da água, cujos resultados fornecem dados

quantitativos a respeito dos níveis de poluição de um ambiente. Essas análises, contudo, falham em

fornecer dados sobre o estresse ambiental ao qual estão sujeitos os organismos ali presentes (OMAR, 2010). Além disso, essas análises costumam ter alto custo (DELAIRE et al., 2017). Nesse sentido, indicadores biológicos são muito úteis em medir os efeitos negativos de pesticidas, devido à especificidade da resposta de determinados organismos a certos impactos, fornecendo a informação direta sobre o impacto do poluente na biota aquática sob um relativo baixo custo.

1.1 ANFÍBIOS COMO BIOINDICADORES E ALVOS VULNERÁVEIS DA POLUIÇÃO AQUÁTICA

Os anfíbios são uma classe de vertebrados subdivididos em três ordens: os anuros, os urodelos, e as cecílias. Esses animais possuem um ciclo de vida em que ao menos os primeiros estágios larvais são obrigatoriamente aquáticos, o que os coloca em vulnerabilidade à poluição de corpos hídricos (DUELLMAN; TRUEB, 1986; KLOAS; LUTZ, 2006). O estágio embrionário é sensível aos diversos compostos presentes na água devido à ausência de uma casca impermeável que protege o ovo, como nos demais amniotos, possuindo apenas uma camada gelatinosa como proteção (STARCK; STEWART; BLACKBURN, 2021). Além disso, tanto a larva após sair do ovo quanto os adultos possuem uma pele muito permeável, necessária para o processo de respiração cutânea realizado por esses animais, o que implica na fácil absorção de poluentes, que pode levar à bioacumulação de produtos potencialmente perigosos no organismo (GIRLING, 2013; SHOEMAKER; NAGY, 1977; WAKE; VREDENBURG, 2008). Os jovens e adultos tendem a experimentar exposições diferentes a tais compostos devido à variedade de estilos de vida, dos obrigatoriamente aquáticos, aos estilos mais terrestres (KLOAS; LUTZ, 2006). Contudo essa sensibilidade ao ambiente e capacidade de bioacumulação tornam esses animais excelentes bioindicadores, capazes de fornecer dados importantes sobre os ambientes em que habitam, o nível e quais poluentes estão presentes (ANKLEY; JOHNSON, 2004; CUI et al., 2018; HOOVER et al., 2017; KLOAS; LUTZ, 2006).

Os anfíbios também possuem outras características consideradas essenciais para o uso em laboratório como organismos modelos. Eles produzem grandes quantidades de ovos e possuem um ciclo de vida relativamente rápido. Seus embriões são grandes, facilmente mantidos e manipuláveis em laboratório, sobrevivem a cirurgias complexas e delicadas, podem ser injetados com diversos materiais, e podem ser utilizados para estudos de diversos compostos bioquímicos (AKKERS et al., 2009; BURLIBAŞA; GAVRILĂ, 2011; GURDON; UEHLINGER, 1966; MCDIARMID; ALTIG, 1999; MOODY, 1987a, 1987b; PHILPOTT; YEW, 2005). Podem ainda ser utilizados em estudos de regeneração, devido à capacidade regenerativa das salamandras, ou em

estudos sobre o sistema imune, por sua capacidade de secretar substâncias protetivas em resposta aos estímulos externos (BROCKES, 1997; LIU et al., 2016).

1.2 O MALATION

Entre os pesticidas mais comuns estão os inseticidas, usados em larga escala em todo o mundo para o controle de insetos, principalmente em lavouras (KALYABINA et al., 2021; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1969). Entre esses compostos, o malation, também conhecido como malathion, malatião ou malationa, de fórmula molecular $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ (Figura 1), é um dos mais utilizados no Brasil e no mundo (GURUSHANKARA; VASUDEV; KRISHNAMURTHY, 2003; GRUBE et al., 2011). Esse inseticida organofosforado é comumente utilizado na agricultura, tendo substituído o DDT em seu uso para proteger milho em armazéns (GUEDES et al., 1995; SANTOS et al., 1986), bem como tornou-se comum em programas de combate ao mosquito da dengue, no Brasil, sendo utilizado nas pulverizações do fumacê, como é popularmente conhecida a técnica de liberação deste agrotóxico em emulsão aquosa (EA) a 44%, para o controle do *Aedes Aegypti* (HUCULECI et al., 2009; BRASIL, 2014). Também ganhou destaque em programas de controle de insetos em estados estadunidenses, como a Flórida, Texas e Califórnia. Seu uso se tornou extenso devido ao seu baixo grau de toxicidade aguda em comparação com outros inseticidas (DEPARTMENT OF HEALTH SERVICES, 1991).

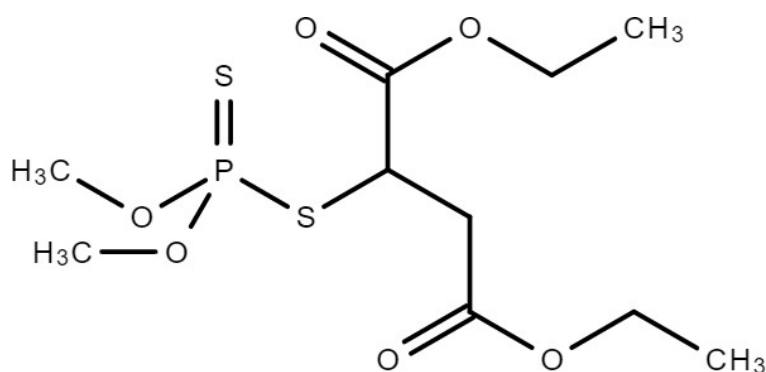


Figura 1. Fórmula estrutural do malation. Fonte: O autor.

Comercialmente, o malation costuma ser vendido em concentrações de 90-95%, sendo o restante impurezas, incluindo o malaoxon, o metabólito ativo resultado da oxidação do Malation (FLESSEL; QUINTANA; HOOPER, 1993). Ambos compostos são conhecidos pelo seu

efeito inibitório da acetilcolinesterase no sistema nervoso, músculos e outros tecidos (FLESSEL; QUINTANA; HOOPER, 1993; KRSTIC et al., 2008) o que ocasiona um acúmulo de acetilcolina, responsável por causar hiperestimulação e múltiplos impulsos pós-sinápticos, resultados de um único estímulo pré-sináptico (TAYLOR; WILLIAMS; MILLS, 1999). Esse efeito costuma ser mais severo em insetos do que em mamíferos, pois o baixo nível de esterases em insetos, quando em comparação com mamíferos, dificulta a rápida hidrólise do malation (FLESSEL; QUINTANA; HOOPER, 1993). As esterases são hidrolases que atuam principalmente na hidrólise de ésteres, os decompondo em um ácido e um álcool, afetando compostos como o malation, que possui éster em sua composição (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Além disso, por ser lipofílico, o malation é facilmente absorvido pela pele, sistema respiratório e/ou gastrointestinal (GUNTHER; WESTLAKE; JAGLAN, 1968), o que torna alguns organismos especialmente sensíveis a esse composto.

Devido ao seu uso, método de ação e toxicidade, diversos estudos foram realizados a fim de verificar os efeitos do malation em organismos vivos no ambiente e, embora seja tratado como um composto que dura pouco em ambientes aquáticos por Relyea e Diecks (2008), sabe-se de efeitos negativos provocados em algas (e.g. MOORE, 1970), dáfnídeos (SANDERS; COPE, 1966), peixes (e.g. BASHA; RAO; RAO, 1984; HERMANUTZ; AGENCY, 1978; PICKERING; HENDERSON; LEMKE, 1962) e aves (FELEMBAN; MUJALLID; AL-GEHANI, 2013; HOFFMAN; EASTIN JR., 1981; POURMIRZA, 2000). Em anfíbios, foram relatados diversas malformações, alterações comportamentais, aumento de mortalidade, imunossupressão, entre outros efeitos (e.g. DE LLAMAS; DE CASTRO; DE D'ANGELO, 1985; FORT et al., 2018; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2011; KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011; PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; ROSENBAUM et al., 1988; SNAWDER; CHAMBERS, 1989), conforme será discutido neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão bibliográfica sobre os efeitos do inseticida malation sobre anfíbios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar um levantamento bibliográfico da literatura disponível buscando artigos científicos que abordem os efeitos do malation sobre espécies de anfíbios.
- b) Analisar e categorizar os tipos de efeitos observados pelos autores dos trabalhos científicos.
- c) Elaborar uma tabela contendo um resumo das informações a respeito dos tipos de efeitos e índices de toxicidade sobre as diferentes espécies.

3 METODOLOGIA

Para este trabalho, foi realizado um levantamento de artigos através do *website* “PubMed” (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) em novembro de 2021. Na ferramenta de pesquisa, foi utilizado o termo “malathion”, seguido do conectivo de adição “AND” e as palavras “frog”, “amphibian”, “tadpole”, “axolotl” ou “xenopus”. Todos os artigos científicos contendo as palavras chaves no título e/ou resumo encontrados nos resultados dessas pesquisas, sem limites impostos sobre o ano de publicação, foram avaliados quanto aos objetivos do presente estudo.

Os artigos foram então organizados por ordem cronológica de publicação, e identificados pelo autor e ano de publicação. A leitura dos artigos foi realizada em ordem cronológica, extraindo dados principalmente dos métodos e resultados a respeito dos efeitos adversos do malation, e adicionando-os a uma tabela com as espécies, os dados referentes a cada uma delas, e os autores de cada estudo, de forma a facilitar a busca por espécies de interesse. A partir dos dados coletados, foi proposta então uma classificação dos efeitos observados, conforme apresentado nos resultados do presente trabalho.

4 RESULTADOS

Foram identificados 50 artigos científicos que abordam os efeitos do malation em 26 espécies de anfíbios. Esses trabalhos são datados de 1983 até 2020, e os principais resultados observados são apresentados a seguir. Para facilitar a busca por espécies de interesse, foi elaborada uma tabela (Tabela 1), onde pode-se consultar os resultados encontrados para cada espécie, bem como os autores dos trabalhos, para consulta.

4.1 EFEITOS DO MALATION SOBRE A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA, LC50 E LD50 EM ANFÍBIOS

Um dos principais efeitos registrados nos estudos com malation em anfíbios é sobre a taxa de sobrevivência. Esse inseticida é conhecido por causar a morte das larvas em desenvolvimento (PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; RELYEA, 2004a, 2004b; BOONE, 2008; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2010; HOSKINS; BOONE, 2017; EGEE-SERRANO; SOLÉ, 2016, STOLER et al., 2017). Contudo, a depender da concentração e outros fatores em análise, o malation nem sempre resulta em alteração na taxa de sobrevivência (RELYEA, 2004a, 2004b; ROHR et al., 2008; RELYEA et al., 2008; SMITH et al., 2010; BROGAN; RELYEA, 2015; LEWIS et al., 2020) e, em um caso único, a espécie *Hyla chrysoscelis* apresentou menor mortalidade quando exposta ao pesticida em relação ao controle (MACKEY; BOONE, 2009).

Devido ao conhecido efeito sobre a sobrevivência, é comum alguns estudos avaliarem a concentração letal média (LC50) nos indivíduos de seus experimentos. Esse número é o valor que representa a concentração de um determinado composto capaz de matar cinquenta por cento (50%) da amostra em um determinado período, geralmente de 24 horas, 48 horas e 96 horas em ensaios de toxicidade aguda (SNAWDER; CHAMBERS, 1989; VENTURINO et al., 1992; YU et al., 2013). Existem ainda os ensaios de toxicidade crônica, cujas análises são conduzidas por um período muito maior de tempo, geralmente de alguns meses. Esses estudos, entretanto, são menos comuns.

Estudos de toxicidade com anfíbios revelaram valores de LC50 para as espécies (para detalhes, ver Tabela 1): *Bufo arenarum* (VENTURINO et al., 1992), *Xenopus laevis* (SNAWDER; CHAMBERS, 1989; YU et al., 2013), *Fejervarya limnocharis* (GURUSHANKARA; VASUDEV; KRISHNAMURTHY, 2003; NATARAJ; KRISHNAMURTHY, 2020), *Euflictis cyanophlyctis* (GIRI et al., 2012), *Rana boylei* (SPARLING; FELLERS, 2007) e *Rana palustris* (BUDISCHAK; BELDEN; HOPKINS, 2008a). A variação encontrada é bastante significativa, com valores de 2,137 mg/L para *Rana boylei*, até $19,2 \pm 2.4$ mg/L para *Bufo arenarum*. Embora não haja

muitos trabalhos com valores de LC50 para uma mesma espécie, é possível verificar, por exemplo, através dos resultados de SNAWDER; CHAMBERS (1989) e YU et al. (2013), que mesmo dentro de uma mesma espécie (*X. laevis*), a variação pode ser significativa, com uma diferença encontrada de 5,504 mg/L. Essa variação, contudo, pode ser decorrente das diferentes metodologias utilizadas pelos dois autores.

Há ainda um estudo que calculou a dose letal média (LD50) oral aguda da espécie *Lithobates catesbeianus*, ou seja, a dose de um composto que, quando administrado uma única vez, é capaz de causar a morte de cinquenta por cento (50%) da amostra em estudo (FORT et al., 2018). Os valores foram apresentados para indivíduos do sexo masculino e feminino de forma separada, com variação de 1,480 a 2,259 mg/kg do peso corporal para machos, e 1,280 a 2,183 mg/kg do peso corporal para fêmeas, sendo a LD50 média de 1,672 a 1,829 mg/kg do peso corporal.

Outros índices e valores de toxicidade também foram calculados e fornecidos, indicando, por exemplo, a dose letal, doses capazes de causar a morte de 10% dos indivíduos em estudo, doses capazes de afetar o funcionamento da musculatura e doses que causam determinadas deformidades (DE LLAMAS; DE CASTRO; DE D'ANGELO, 1985; FORT et al., 2018; GIRI et al., 2012; HOSKINS; BOONE, 2017; KOWSALYA; PRASADA RAO; RAO, 1987; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2011; KUNDU; ROYCHOUDHURY, 2009; KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011; NATARAJ; KRISHNAMURTHY, 2012; PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; ROSENBAUM et al., 1988; SNAWDER; CHAMBERS, 1989; TAYLOR; WILLIAMS; MILLS, 1999).

Um fator importante a ser considerado são as variações existentes entre estudos, tanto para os valores de LC50 e LD50, quanto para as taxas de sobrevivência. Há variações mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (SNAWDER; CHAMBERS, 1989; YU et al., 2013) e, entre espécies distintas, a diferença nos valores tende a ser ainda mais expressiva (SNAWDER; CHAMBERS, 1989; VENTURINO et al., 1992). Um exemplo interessante é o estudo de RELYEA (2004a), que demonstra a sensibilidade das rãs da espécie *Rana sylvatica* a concentrações muito baixas de malation, de apenas 0,1 mg/L, que ocasionam mortalidade considerável, enquanto esta mesma concentração afeta muito pouco a espécie *Rana catesbeiana*, e não apresenta efeitos na taxa de sobrevivência das espécies *Rana pipiens* e *Rana clamitans* (RELYEA, 2004a, 2004b).

RELYEA (2004a) ainda sugere que estudos de LC50 sejam feitos não apenas da forma tradicional, com os tempos de um até quatro dias, mas também experimentem testes de dezesseis dias. Esses ensaios mais longos são capazes de fornecer informações diferentes e novas perspectivas sobre a toxicidade do malation, pois uma mesma concentração impacta de formas diferentes na taxa de sobrevivência dos embriões e larvas, sendo que a longa exposição tende a

apresentar efeitos mais severos.

4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Os efeitos adversos do malation se estendem ainda a alterações morfológicas, muitas vezes causando diversas deformidades, principalmente na etapa larval dos anfíbios, já que poucos estudos analisam os efeitos sobre adultos, a exemplo de TAYLOR et al. (1999). As malformações afetam esses animais de diferentes formas, dependendo da sua gravidade e tipo (DE LLAMAS; DE CASTRO; DE D'ANGELO, 1985; FORT et al., 2018; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2010; KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011; PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; SNAWDER; CHAMBERS, 1989; YU et al., 2013, 2014).

As deformidades mais recorrentes observadas foram inchaço do corpo (edema) e corpo em formato de diamante, enrijecimento e dobramentos da cauda (Figura 2-A), e a perda e/ou alteração da pigmentação (BONFANTI et al., 2004; BUDISCHAK; BELDEN; HOPKINS, 2008b; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2010; PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; ROSENBAUM et al., 1988; YU et al., 2013, 2015). Além destas, foram observadas também malformações axiais, dobramentos axiais e caudais, caudas duplas, anormalidades craniofaciais, ventralização (cabeça, tronco, notocorda e cauda pouco desenvolvidos), microcefalia, bolhas (geralmente na região da cabeça, às vezes com acúmulo de fluidos, como observado na Figura 2-B), e inchaço abdominal na região posterior do tronco devido ao acúmulo de fluido visceral (BUDISCHAK; BELDEN; HOPKINS, 2008b; PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; SNAWDER; CHAMBERS, 1989, 1990).

As malformações, em alguns casos, são acompanhadas de alterações comportamentais, como redução da atividade e da alimentação, tremores, paralisia, espasmos e problemas para nadar (FORT et al., 2018; KRISHNAMURTHY; SMITH, 2011; YU et al., 2013, 2014).

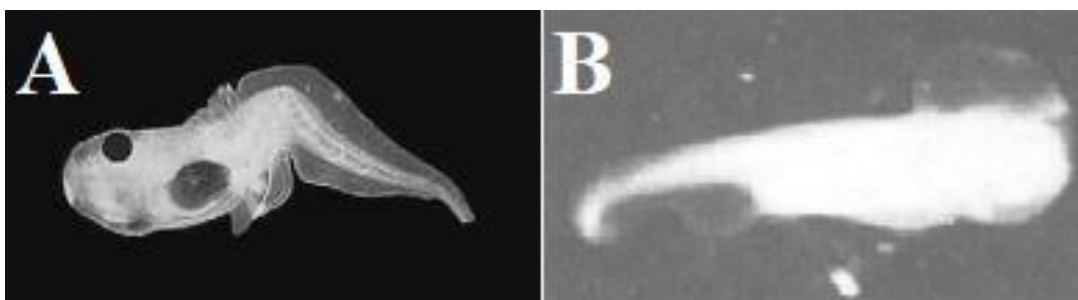


Figura 2. A - Larva de *X. laevis*, em vista lateral, apresentando dobramentos anormais da cauda e desenvolvimento anômalo do intestino. Fonte: Bonfanti et al., 2004. B - Bolhas com acúmulo de fluido no corpo e cabeça de uma larva de *Microhyla ornata*. Fonte: Pawar et al., 1983.

Foram observadas também malformações no esqueleto (SNAWDER; CHAMBERS, 1989), vasculares e no sistema digestivo, com ocorrência de vasos sanguíneos desorganizados, e aorta e átrio, bem como intestino e fígado (hepatomegalia) distendidos e alargados (BONFANTI et al., 2004; FORT et al., 2018; KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011; SNAWDER; CHAMBERS, 1989, 1990; TAYLOR; WILLIAMS; MILLS, 1999; YU et al., 2013). No sistema digestivo, foram registrados ainda necrose da porção inferior do esôfago e superior do estômago, bem como lesões no fígado e atrofia da camada muscular e submucosa do intestino de rãs juvenis (FORT et al., 2018). Os sinais de necrose foram observados também nas vilosidades intestinais, juntamente com a desintegração das camadas serosa e muscular do intestino, prejudicando a formação do órgão (KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011). Algumas dessas deformidades observadas podem estar relacionadas entre si, visto que Kundu et al. (2011) cita a presença de vasos sanguíneos esparsos no intestino, o que poderia levar à má distribuição de nutrientes e oxigênio para as células e tecidos intestinais, ocasionando a morte celular ou necrose. Outros problemas vasculares envolvem a má circulação sanguínea na cauda e batimentos cardíacos reduzidos (PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983).

Foram encontrados ainda efeitos relacionados à epiderme de rãs. Em alguns casos, o extrato externo da epiderme do dorso desses animais se tornou mais grosso do que a epiderme do ventre, com aumento da presença de glândulas mucosas e serosas na derme, prejudicando a capacidade de absorção da pele (WILLENS et al., 2006). Em alguns casos, a epiderme se dissolveu e levou ao surgimento de um agrupamento de células vacuolizadas (KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011). Essas deformidades ocasionaram problemas na permeabilidade, difusividade e fluxo diferencial entre a pele do dorso e a pele do ventre, o que pode interferir, por exemplo, no sistema respiratório dos anfíbios (BURGGREN; INFANTINO, 1994; GIRLING, 2013; WILLENS et al., 2006).

A formação incompleta de órgãos, como relatado acima, os torna disfuncionais, ou seja, incapazes de realizar suas funções de forma adequada, afetando diretamente a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Como exemplo, De Llamas et al. (1985) constataram o aparecimento de brânquias anormais em seu experimento. A malformação de brânquias é um caso único, observado apenas neste estudo, o que demonstra a falta de informações a respeito do malation sobre este órgão tão importante, responsável pela respiração das larvas de anfíbios e, em alguns casos, de seus adultos também (BURGGREN; INFANTINO, 1994; GIRLING, 2013).

O malation ainda afetou o crescimento negativamente, reduzindo a taxa de crescimento (GURUSHANKARA; VASUDEV; KRISHNAMURTHY, 2003; RELYEA, 2004a, 2004b; GURUSHANKARA; KRISHNAMURTHY; VASUDEV, 2006; WISE; RUMSCHLAG;

BOONE, 2014; STOLER et al., 2017). Na maioria dos casos, o pesticida causa atraso no desenvolvimento da larva e redução na massa corporal (PAWAR; GHATE; KATDARE, 1983; SNAWDER; CHAMBERS, 1989; RELYEA, 2004a, 2004b; STOLER et al., 2017) até que atinja o período de metamorfose e, em outros, acelera o desenvolvimento (MACKEY; BOONE, 2009) e aumenta a massa corporal (MACKEY; BOONE, 2009, SMITH et al., 2010). Também foram reportados aumento no tamanho do indivíduo adulto (BENDIS; RELYEA, 2016). No caso de embriões recentemente fertilizados, a exposição a concentrações de 20 ppm de malation ocasiona atraso para atingir o estágio de gástrula (ANGUIANO; DE CASTRO; PECHEN DE D'ANGELO, 2001).

4.3 EFEITO SOBRE A ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE

Alguns dos efeitos mencionados acima podem ser resultado dos efeitos do malation sobre a acetilcolinesterase (AChE) (SNAWDER; CHAMBERS, 1989). A ausência dessa enzima leva ao acúmulo de acetilcolina, um neurotransmissor de ação rápida, capaz de ativar diversas respostas pré e pós-sinápticas (BROWN et al., 2012; KARZMAR, 1979) em sistemas sinápticos colinérgicos (CAMPANELLA et al., 1991). A membrana pós-sináptica fica incapacitada de retornar ao seu estado original, impedindo o funcionamento normal do sistema nervoso (CAMPANELLA et al., 1991 apud ETO, 1974).

Estudos demonstraram que a AChE tem papel importante na formação de órgãos, em movimentos morfogênicos, na regulação do desenvolvimento embrionário e, quando a AChE se encontra presente na membrana citoplasmática, pode estar associada ao sistema colinérgico envolvido no funcionamento e regulação de membranas durante a morfogênese (DREWS; KUSSÄTHER; USADEL, 1967; FALUGI; RAINERI, 1985; SCHRÖDER, 1980).

Os efeitos observados em anfíbios podem ainda ter relação com a butirilcolinesterase (BChE). Essa enzima é conhecida por ser pouco específica quando em comparação a AChE (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989; EKHOLM, 2001), catalisando a hidrólise de ésteres de colina, e tendo efeito tanto sobre a acetilcolina quanto em outros componentes, como por exemplo a succinilcolina, um agente bloqueador neuromuscular despolarizante, utilizado como relaxante muscular, mas capaz de causar apneia devido à incapacidade de alguns organismos de metabolizar completamente o composto (ALVARELLOS et al., 2015; DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003 apud SILVER, 1974; KALOW; DAVIES, 1958; KALOW; STARON, 1957; LEHMANN; RYAN, 1956).

A BChE é expressa em algumas populações distintas de neurônios (MASSOULIÉ;

BON, 1982; MASSOULIÉ; TOUTANT, 1988; MCTIERNAN et al., 1987; PRODY et al., 1987; SIKORAV et al., 1985) possuindo função na regulação de sistemas colinérgicos (BRIMIJOIN; MINTZ; ALLEY, 1983; MASSOULIÉ; BON, 1982; TOUTANT; MASSOULIÉ, 1988). Estudos preliminares indicam a possibilidade de esta enzima estar envolvida ainda em parte do desenvolvimento do sistema nervoso (BROWN et al., 1981; DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003; ROSENBERRY, 1975; SILMAN; FUTERMAN, 1987), bem como participar do desenvolvimento embrionário (LAYER, 1983).

Em estudos com anfíbios, a ação do malation como inibidor da AChE e também da BChE foi demonstrada por diversos autores (DE LLAMAS et al., 1985; SNAWDER; CHAMBERS, 1989; ROSENBAUM et al., 1988; DE CASTRO; ROSENBAUM; PECHEN DE D'ANGELO, 1991; VENTURINO et al., 1992; TAYLOR et al., 1999; SPARLING; FELLERS, 2007). Devido à ampla quantidade de funções e vias bioquímicas das quais essas duas enzimas participam, bem como o fato de que o conhecimento sobre a BChE ainda apresenta algumas lacunas, como sua função na morfogênese (LAYER, 1983), e em doenças neurodegenerativas (DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003), pode-se hipotetizar que haja diversas consequências para distúrbios causados nessas colinesterases que ainda não foram relatadas em estudos com anfíbios. Além disso, os trabalhos na área não trazem informações a fundo sobre os possíveis efeitos da redução da AChE e BChE em seus experimentos, normalmente relatando apenas o efeito observado diretamente sobre as enzimas (DE CASTRO; ROSENBAUM; PECHEN DE D'ANGELO, 1991; DE LLAMAS; DE CASTRO; DE D'ANGELO, 1985; ROSENBAUM et al., 1988; SPARLING; FELLERS, 2007; TAYLOR; WILLIAMS; MILLS, 1999; VENTURINO et al., 1992).

De Castro et al. (1991) demonstraram que em anfíbios, contudo, algumas proteínas como a AChE e BChE são capazes de recuperar a atividade após um período de aproximadamente 72 a 120 horas desde a primeira exposição a uma concentração de 44 ppm de malation. Os autores observaram ainda que há uma diferença sazonal na velocidade de recuperação de algumas enzimas testadas, como por exemplo a BChE, que se recuperou mais rápido durante o inverno. Ainda assim, os níveis de inibição da atividade enzimática são superiores durante o inverno, alcançando até 40% de inibição, contra os 7% durante o verão e, embora sejam capazes de recuperar a atividade, os níveis atingidos nunca alcançam aqueles demonstrados pelo controle.

Adicionalmente, o malation pode ter seus efeitos amplificados em anfíbios quando na presença de espermidina, uma poliamina que ocasiona a decomposição do malation em malaaxon. O aumento da razão malaaxon/malation aumenta o efeito inibitório da AChE em larvas de *Bufo arenarum* (VENTURINO, 2001a).

4.4 EFEITOS GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO

O malation também foi responsável por causar danos ao DNA de anfíbios, com formação de micronúcleos em eritrócitos (GIRI et al., 2012), sendo comum o relato deste tipo de efeito em estudos com pesticidas, que frequentemente afetam o DNA dos organismos-alvo (GUILHERME et al., 2014; KANDIEL et al., 2014; SCALON et al., 2010), embora relatado em um único estudo com anfíbios. Compostos químicos capazes de danificar a estrutura cromossomal ou do DNA são chamados de genotoxinas, e podem ocasionar mutações somáticas, capazes de levar à formação de cânceres, ou alterar traços hereditários em células germinativas (PHILLIPS; ARLT, 2009).

Por outro lado, o malation não se acumulou em duas espécies de anfíbios, a *Rana draytonii* e a *Ambystoma californiense*, principalmente porque suas presas, animais invertebrados encontrados em corpos de água, não costumam sofrer com efeitos crônicos à exposição ao malation, sendo classificados como de “risco intermediário” para os efeitos agudos e crônicos do malation, normalmente se recuperando de exposição ao pesticida, o que impede que o composto seja passado aos níveis superiores da cadeia trófica (CLEMOW et al., 2017). A bioacumulação para outras espécies não foi analisada por nenhum autor e, portanto, segue sem informações para além das duas espécies acima.

4.5 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Os estudos de SNAWDER et al. (1989) e SNAWDER et al. (1990) observaram pela primeira vez reduções de até 50% nos níveis de NAD⁺ no embrião como um todo, em comparação ao controle, em embriões de *Xenopus laevis*. Os autores propuseram que esta alteração poderia causar danos no desenvolvimento de anfíbios, considerando a função da coenzima no metabolismo animal. Contudo, observaram que a incidência e severidade dos efeitos do malation e os níveis de NAD⁺ registrados não estão correlacionados. Em testes, mesmo quando os níveis de NAD⁺ foram elevados ao nível controle, os demais efeitos do malation ainda apareceram em mesma frequência e severidade. Assim, imagina-se que as reduções dos níveis de NAD⁺ sejam um sintoma de estresse e não um causador de deformações.

O malation, em concentração de 20 ppm, foi capaz ainda de reduzir os níveis de glutathiona reduzida (GSH), em embriões e larvas, além de aumentar a atividade de GSH S-transferase durante o tratamento (ANGUIANO; DE CASTRO; PECHEN DE D'ANGELO, 2001). A enzima GSH S-transferase auxilia a GSH a remover compostos do malation que levariam a efeitos tóxicos

no organismo, atuando como antioxidantes. Assim, é possível que a relativa resistência da espécie *Bufo arenarum* a ambientes poluídos com pesticidas seja dependente de níveis adequados de GSH e GSH S-transferase (ANGUIANO; DE CASTRO; PECHEN DE D'ANGELO, 2001).

Complementarmente, outro estudo observou ainda que o malation reduziu a quantidade total de tióis, em ambos os tratamentos de 24 e 48 horas. Entretanto, proporção de tiol reduzido para tiol total não alterou, sugerindo que o GSH foi consumido pelo processo de detoxificação do malation sem oxidação para glutathiona oxidada (GSSG) (VENTURINO et al. 2001b).

Em concentrações subletais, o malation é capaz ainda de causar redução, em larvas de *Bufo arenarum*, de até 40% da atividade da catalase (CAT), e de 15% da glutathiona redutase (GR), enzimas de atividade antioxidante, cuja redução sinaliza a ocorrência de estresse oxidativo nos embriões analisados. Contudo, em uma concentração de 20 mg/L, aplicada em embriões recentemente fertilizados, o malation apresenta efeito contrário, aumentando a atividade da CAT em até 10%, enquanto não afeta a GR (FERRARI et al. 2008).

A exposição ao malation causa ainda reduções nos níveis de Ácido Ascórbico, do aminoácido não essencial hidroxiprolina, e de fibras de colágeno na região da notocorda, esta última, porém, sem reduzir a quantidade total de fibras colágeno nos embriões de *X. laevis* (SNAWDER; CHAMBERS, 1990). Foi observada ainda uma redução da lisil oxidase, uma enzima relacionada à formação de *cross-links* de fibras colágenas, propondo uma possível relação entre as diversas malformações observadas na espécie e a redução desta enzima (SNAWDER; CHAMBERS, 1993).

Adicionalmente, foi reportada uma redução do EMI 2 (*Early Mitotic Inhibitor 2*), um fator da divisão celular que deve estar presente em altas quantidades durante a maturação do oócito, na metáfase da meiose II, para garantir que o CSF (*Cytostatic Factor*) realize a parada do oócito nesta etapa da divisão celular até que esteja pronto para a fertilização. Uma vez fertilizado, o oócito poderá dar sequência na meiose paralisada. A redução do EMI 2 não causou alterações na taxa de fertilização, mas levou oócitos a maturarem mais cedo, além de levar células embrionárias a apresentarem divisão anormal e alta mortalidade durante o estágio 9 do desenvolvimento embrionário de *X. laevis* (JI et al. 2016).

Foi observado também que o malation é capaz de causar efeitos miotóxicos dose-dependentes, afetando a amplitude e latência da contração muscular (KOWSALYA et al. 1987). Esses efeitos são possivelmente relacionados à fadiga muscular, ou ao declínio da atividade da AChE no organismo de anfíbios.

4.6 ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE

O malation também é capaz de suprimir a ativação de neutrófilos no organismo, bem como reduzir ou até eliminar a produção de anticorpos hemocianina de lapa (KLH) específicos (GILBERTSON et al. 2003). Neste sentido, a espécie *Bufo woodhousi* aparenta ser mais sensível a infecções pela bactéria *Aeromonas hydrophila* quando tratados com malation (TAYLOR et al. 1999). Da mesma maneira, o sapo americano (*Anaxyrus americanus*) se torna mais sensível à infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* quando exposto ao malation (WISE; RUMSCHLAG; BOONE, 2014). Entretanto, a espécie *Pseudacris regilla* não foi afetada da mesma maneira, apresentando-se resistente a infecções pelo *B. dendrobatidis* mesmo após exposição crônica ao malation ((RUMSCHLAG; BOONE; FELLERS, 2014).

Adicionalmente, estudos demonstraram que a exposição ao malation elevou a quantidade total de leucócitos até 96 horas após a exposição, seguida por uma redução após 240 horas. Na contagem específica, os linfócitos e eosinófilos aumentaram até 96 horas, enquanto neutrófilos reduziram significativamente (KUNDU; ROYCHOUDHURY, 2009; KUNDU; ROYCHOUDHURY; CAPCAROVA, 2011).

Tabela 1 – Efeitos do malation em anfíbios. Espécies afetadas negativamente pela exposição ao malation, efeitos observados, índices de toxicidade e autores.

| Espécie | Efeitos | Índice de toxicidade | Autores |
|--------------------------------|--|--|---|
| <i>Acris Blanchardi</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência | Dose única de 0.16 mg/L até 1 mg/L ocasionam letalidade | Hoskins, 2016 |
| <i>Ambystoma californiense</i> | Aparente ausência de bioacumulação | - | Clemow, 2017 |
| <i>Anaxyrus americanus</i> | Metamorfos com menor massa; Sensibilidade aumentada a infecções pelo fungo <i>B. dendrobatidis</i> ; Redução no crescimento | - | Wise, 2014 |
| <i>Bufo americanus</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência e do crescimento da larva; Alteração no tempo da metamorfose e massa corporal; Corpo em formato de diamante; Metamorfos menores; Menor massa | - | Relyea, 2004a and b; Boone, 2008; Krishnamurthy, 2010; Smith, 2010; |
| <i>Bufo arenarum</i> | Mortalidade; Malformação (perda de pigmentação e surgimento vesículas hidropecicas no quarto dia); Desenvolvimento anormal de brânquias; Curvatura da região posterior, dobramento caudal e corpo contorcido; Redução de aliesterase; Redução de AChE, BChE e carboxilesterase; Redução do conteúdo proteico e tiols; Retardamento da formação de gástrula; Redução de GSH e aumento de GSH S-transferase; Movimentos anormais do corpo; Aumento ou redução (dose-dependente) de CAT | 47,3 mg/L de malation produzio 100% de mortalidade em 5 dias de exposição em embriões recentemente fertilizados; 67% de mortalidade com 44 mg/L após 5 dias de exposição; LC50 = 19,2 (+-2,4) mg/L | De Llamas et al., 1985; Rosenbaum et al., 1988; Castro et al 1991; Venturino 1992; Venturino et al 2001a; Venturino et al 2001b; Anguiano et al 2001; Ferrari, 2008 |

| | | | |
|--------------------------------|---|---|--|
| <i>Bufo marinus</i> | Ausência de fluxo diferencial, permeabilidade e difusidade entre a pele ventral e dorsal; | - | Willens, 2006 |
| <i>Bufo woodhousii</i> | Mortalidade; Redução da atividade de colinesterases; Susceptibilidade a infecções; Hepatomegalia | Dose letal = 0,110 mg de malation por grama quando aplicado na pele do ventre; Letal em doses acima de 0,112 mg de malation por grama; Letal quando infectado por <i>A. hydrophila</i> | Taylor et al., 1999 |
| <i>Dryophytes versicolor</i> | Redução no crescimento e desenvolvimento | - | Stoler, 2017 |
| <i>Euflictis cyanophlyctis</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência; Formação de micronúcleo em eritrócitos | 4,0 e 8,0 mg/L ocasionou morte; LC50: 3,588 mg/L (96 h); LC50: 3,523 mg/L (presença de predador); LC50: 2,452 mg/L (15 dias) | Giri, 2012 |
| <i>Fejervarya limnocharis*</i> | Dissolução da camada epidérmica; Vacuolização e degeneração; Células vacuolizadas; Desintegração da camada serosa e muscular; Vasos sanguíneos dispersos e com sinais de necrose; Atrofia da camada muscular e submucosa do intestino; Atraso na metamorfose; Redução no número de girinos que passaram pela etapa de metamorfose; Diminuição da taxa de sobrevivência e de metamorfos; Diminuição de neutrófilos; Aumento de eosinófilos e linfócitos; Redução do comprimento; | 0,006 ppm de malation (24-240 h) ocasionou deformidades; 0,110 mg/g do peso corporal ocasionou morte; 250 µg/L reduziu a sobrevivencia de larvas para uma média de 95,94 ± 1,86%; 500 µg malation/L alterou a sobrevivencia para uma média de 96,25 ± 3,273%; LC50: 5,3 mg/l; EC50: 0,006 ppm de malation | kundo, 2009; Kundo, 2011; Nataraj, 2012; Nataraj, 2019 |

| | | | |
|----------------------------------|--|---|---|
| <i>Hyla chrysoscelis</i> | Maior taxa de sobrevivência; Aumento da massa; Desenvolvimento mais rápido | - | Mackey, 2009 |
| <i>Hyla versicolor</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência | - | Relyea, 2004a and b; Brogan, 2015 |
| <i>Limnonectes limnocharis</i> * | Diminuição da taxa de sobrevivência e do crescimento da larva; Diminuição do peso e comprimento; Diminuição do consumo de alimentos; | LC50: 13,27, 8,73, 6,3 e 5,37 ppm para larvas e 17,514, 12,859, 11,123 e 9,43 ppm para adultos em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, respectivamente | Gurushankara et al 2003; Gurushankara et al 2006 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> | Redução no consumo de alimentos; Letargia; Inchaços abdominais; Acúmulo de fluido visceral; Pouca movimentação; Lesões no fígado; Necrose do esôfago inferior e estômago superior; Intestino alargado (dose-dependente) | - | Fort, 2018 |
| <i>Lithobates pipiens</i> | Aumento do tamanho de sapos | - | Bendis, 2016 |
| <i>Microhyla ornata</i> | Diminuição na taxa de sobrevivência; Retardo no desenvolvimento; Microcefalia; Malformações como bolhas na cabeça e dobramentos caudais; Comportamento anormal (perda de equilíbrio, nado em círculos e movimentos anormais da cauda ao nadar); Redução ou ausência de pigmentação; Atraso na eclosão da larva; Redução da taxa de batimento cardíaco e circulação da cauda; má formação de órgãos | 10 ppm ou superior é altamente embriotóxico; 15 ppm ou superior (24 - 48 h) ocasiona aproximadamente 100% de mortalidade | Pawar et al., 1983 |

| | | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|--|
| <i>Phyllodytes luteolus</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência | - | Egea-Serrano, 2016 |
| <i>Pseudacris regilla</i> | Resistência contra infecções pelo fungo <i>B. dendrobatidis</i> | - | Rumschlag, 2014 |
| <i>Rana boylei</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência; Redução da atividade de colinesterases | LC50: 2.137 mg/L (96 h) | Sparling, 2007 |
| <i>Rana catesbeiana</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência e do crescimento da larva; Diminuição da absorção na pele do dorso de rãs; Aumento da grossura do extrato externo da pele do dorso de rãs, em comparação com a pele do ventre; Aumento da presença de glândulas mucosas e serosas na derme do dorso de rãs | - | Relyea, 2004a and b; Willens, 2006 |
| <i>Rana clamitans</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência e do crescimento da larva; Sobrevivência de rãs-de-árvore-cinza até a metamorfose significativamente aumentada em 51%; Maior massa; Metamorfose antecipada (ocorrendo em período menor do que esperado) | - | Relyea, 2004a and b; Boone, 2008; Rohr, 2008; Mackey, 2009; Stoler, 2017 |
| <i>Rana draytonii</i> ; | Aparente ausência de bioacumulação | - | Clemow, 2017 |
| <i>Rana hexadactyla</i> | Ação miotóxica com redução da amplitude da contração muscular e latência | 10 - 30 ppm possui efeito miotóxico | Kowsalya et al., 1987 |

| | | | |
|-----------------------|--|--|--|
| <i>Rana palustris</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência; Frequência de malformações aumentada; Eclosão e viabilidade de larvas reduzida; Edema; Cauda dupla, anormalidades craniofaciais; Enrijecimento da cauda; Ventralização | LC50: 15,2–17,7 mg/L | budischak, 2008 (1); budischak, 2008 (2); |
| <i>Rana pipiens</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência e do crescimento da larva; Imunossupressão; Redução da massa corporal de larvas; Redução de sobrevivência quando combinado com alta densidade de larvas | - | Gilbertson et al. 2003; Relyea, 2004a, 2004b; Lewis, 2020 |
| <i>Rana sylvatica</i> | Diminuição da taxa de sobrevivência; Corpo inchado; Corpo em formato de diamante; Cauda enrijecida; Larvas menos ativas em relação à alimentação; Redução na massa corporal; Alteração no comprimento total; Ausência de efeitos em <i>R. sylvatica</i> ; Metamorfose atrasada; Metamorfos maiores e com maior massa corporal | 250 µg L-1 ocasiona morte de aproximadamente 10% das larvas (período de 14 dias); 500 µg L-1 e 1000 µg L-1 ocasiona morte de aproximadamente 30% das larvas (14 dias) | Relyea, 2004a and b; Relyea, 2008; Smith, 2010; Krishnamurthy, 2011 |
| <i>Xenopus laevis</i> | Mortalidade; Malformações; Atrasos no desenvolvimento; Redução nos níveis de NAD ⁺ ; Comportamento anormal; Flexões da cauda; Espasmos; Tremores; Paralisia; Alterações na notocorda; Redução da AChE; Pigmentação anormal; Anormalidades no esqueleto e intestino; Redução no comprimento; Alterações vasculares; Redução de Ácido Ascórbico, hidroxiprolina, fibras colágenas na notocorda e lisil oxidase; Atraso no crescimento e desenvolvimento; Malformações caudais e axiais; | LC50: 10,9 mg/L; TC50: 2394,01 µg/L; Mortalidade em altas concentrações (2000 µg/L, 4000 µg/L e 8000 µg/L) ocorrem, em grande parte, nas últimas 24 horas de exposição; LC50: 5396 µg/L (96 h) em embrião; LC50: 6756 µg/L em larva; | Snawder; Chambers, 1989; Snawder; Chambers, 1990; Snawder; Chambers, 1993; Bonfanti et al., 2004; Yu, 2013; Yu, 2014; Yu, 2015; Ji, 2016 |

| | |
|--|--|
| Nado anormal; Crescimento inibido ou reduzido; Dobramentos axiais; Processo de maturação de oócitos encurtado; Menor quantidade de EMI2 durante a parada por CSF; Divisão anormal de células embrionárias e alta mortalidade de embriões durante o Estágio 9 do desenvolvimento embrionário. | |
|--|--|

* Sinônimos de uma mesma espécie.

5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, observa-se a existência de estudos com um número significativo de espécies de anfíbios para os quais se tem registros de efeitos negativos ocasionados pela exposição ao malation. Das 26 espécies estudadas, 25 delas se concentram nos Estados Unidos, Argentina e Índia. Essa concentração de estudos em poucos locais dificulta a análise completa dos efeitos do malation em diversos ambientes com recursos e condições diferentes. Além disso, há baixa número ou completa inexistência de estudos vindos de importantes países agricultores, bem como países de clima tropical, que não somente costumam ser importantes hotspots de biodiversidade (MYERS, 1988), como também sofrem com doenças comumente encontradas nesses lugares, como a dengue (GUZMAN; HARRIS, 2015).

O Brasil é um importante exemplo que se encaixa em ambos os critérios, sendo um país agricultor e impactado pela dengue (MYERS, 1988; GUZMAN; HARRIS, 2015; FERREIRA et al., 2019), utilizando-se do malation para múltiplos propósitos. Em vista desses fatores, observa-se uma imensa falta de dados sobre os impactos do malation na diversidade de anfíbios do país, apesar de ser um dos maiores consumidores deste pesticida (HUCULECI et al., 2009; BRASIL, 2014; FERREIRA et al., 2019).

É importante notar que praticamente todas as espécies estudadas, com uma única exceção, pertencem ao grupo dos Anura, ou seja, são espécies de rãs, sapos e pererecas. A única espécie não pertencente aos Anura é a salamandra *Ambystoma californiense*, um Urodela (CLEMOW et al., 2017). Este fato implica no total desconhecimento dos impactos do malation em espécies pertencentes aos anfíbios não anuros, os Urodela e os Gymnophiona (também chamados de Apoda). Seja pela praticidade do organismo modelo, da sua manipulação, ou da capacidade de obtenção dos indivíduos para experimento, os Anura são o foco de quase todos os trabalhos encontrados e, desta forma, não é possível determinar se os efeitos observados neste grupo se repetiriam nos outros dois grupos.

Para além das espécies estudadas, em número de estudos, os anfíbios ainda ficam para trás quando comparado ao número de trabalhos com peixes (FISCHER, 2021) e mamíferos (BADR, 2020). Essa diferença, em relação aos trabalhos com peixe, pode ser devido a quantidade de espécies que cada grupo possui. Até fevereiro de 2022 foram descritas 34.800 espécies de peixe (FROESE; PAULY, 2022), pouco mais de quatro vezes o número de espécies descritas de anfíbios, que conta com 8477 espécies até julho de 2022 (FROST, 2022). Outro fator que pode estar influenciando é a facilidade de manter e manipular peixes em laboratório, sendo necessário um único aquário com água onde as espécies passaram do ovo ao adulto. Já anfíbios requerem aquários

separados para o estágio embrionário e larval, e o estágio adulto, sendo as primeiras em ambiente aquático e os adultos comumente de ambiente terrestre e úmido (COSSINS; CRAWFORD, 2005; DENARDO, 1995; KOCHER, 2004, POWERS, 1989).

Já a atenção dada aos mamíferos, por sua vez, pode ser devido a aplicação desses estudos. Considerando a proximidade com os seres humanos, resultados encontrados de diversas espécies de mamíferos podem, muitas vezes, serem extrapolados e utilizados como parâmetro para prever os efeitos de um mesmo objeto de estudo no ser humano (CELANDER et al., 2011; RALL, 1969).

De forma geral, os efeitos observados nas diversas espécies tendem a ser similares, frequentemente apresentando aumento de mortalidade, inibição da atividade de AChE e BChE, e surgimento de alterações morfológicas como enrijecimento do corpo, dobramentos caudais e outras deformidades. Em alguns casos, porém, foram reportados efeitos opostos ou mesmo ausência de efeitos tipicamente observados em estudos com malation. A exemplo, alguns estudos não observaram alterações na taxa de sobrevivência, o que poderia ser explicado pela concentração utilizada em cada estudo, diferenças nas condições dos experimentos, ou ainda por uma possível resistência natural da espécie, visto que a sensibilidade pode variar significativamente entre espécies mesmo quando expostas a uma mesma concentração de malation (RELYEA, 2004a, 2004b). Em outro caso, a taxa de sobrevivência foi maior do que a do controle, o que pode ser explicado por um efeito em cascata trófica, onde o malation afetou negativamente o zooplâncton, aumentando a quantidade de algas normalmente consumidas por eles e, por consequência, aumentando a disponibilidade de recursos para as larvas de *Hyla chrysoscelis* (MACKEY; BOONE, 2009).

Ainda sobre a taxa de sobrevivência, os cálculos de LC50 e LD50 apresentaram diferentes resultados, tanto entre indivíduos de uma mesma espécie, quanto entre espécies diferentes. Os autores, entretanto, costumam apenas atribuir as diferenças à sensibilidade de cada espécie. Em estudos com peixes, discussões a respeito das diferenças de LC50 apontam alguns fatores que podem interferir nos resultados obtidos, como a taxa de absorção, acumulação e metabolização de peixes, além de condições ambientais como temperatura, pH e taxa de oxigênio (MAGALHÃES; FILHO, 2008; BHARTI; RASOOL, 2021). Pode-se especular que as variações de condições apontadas como influenciadores da sensibilidade ao malation em peixes podem estar se repetindo em estudos com anfíbios.

O malation ainda é responsável por causar uma gama de efeitos menos estudados em anfíbios. Além das alterações negativas observadas em diversas vias bioquímicas importantes, no sistema imune e brânquias, o malation ainda é um importante composto genotóxico e bioacumulador como observado em diversas espécies de peixes (FISCHER, 2021). Esses efeitos pouco relatados em

anfíbios merecem atenção, especialmente pela sua natureza, com grande capacidade de impactar negativamente na sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de anfíbios.

Devido às consequências ocasionadas por compostos genotóxicos, estudos de genotoxicidade têm sido realizados principalmente com peixes, que buscam compreender os mecanismos envolvidos na ação carcinogênica e os riscos para humanos (KANDIEL et al., 2014; KUMAR et al., 2010; PHILLIPS; ARLT, 2009). Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (2009), a maioria dos genotóxicos que contaminam o meio ambiente são potencialmente carcinogênicos em humanos. Neste sentido, ambientes aquáticos são ótimos para avaliar o impacto de compostos genotóxicos, que permitem a detecção de contaminação mesmo que causada por uma concentração muito baixa do contaminante (SCALON et al., 2010). Algumas das técnicas mais utilizadas em avaliações desse tipo são os testes de micronúcleo e o ensaio cometa. Esses testes já vêm sendo realizados com outros compostos que possam representar riscos para anfíbios, relatando o surgimento de danos ao DNA desses animais (FENG et al., 2004; HEREK et al., 2020; LOWCOCK et al., 1997). Danos ao DNA, quando presente em células germinativas, podem ser passados às próximas gerações, ocasionando problemas diversos, bem como reduzir a taxa de fertilidade dos indivíduos afetados. Além disso, esses danos podem afetar os padrões de metilação do DNA (AITKEN; DE IULIIS, 2007; DUTHIE; 2010), levando a supressão ou expressão anormal de genes que podem ocasionar malformações, doenças ou ainda serem incompatíveis com a vida.

Para além dos efeitos genotóxicos, é comum ainda a realização de testes de bioacumulação e biomagnificação, principalmente com peixes (BENDER, 1969; COOK; MOORE, 1976) com objetivo de avaliar efeitos de longo prazo de substâncias tóxicas que se acumulam em organismos vivos. A bioacumulação e biomagnificação são processos importantes pelo seu potencial de ocasionar riscos à saúde humana. Uma das principais rotas destes processos em humanos se dá através do consumo de outros organismos da cadeia trófica. Como topo de cadeia, os seres humanos recebem substâncias nocivas de diversas fontes de alimento diferentes, entre elas, dos peixes, muito consumidos no mundo todo. Esses animais, por sua vez, são considerados o topo da cadeia alimentar em ambientes aquáticos, se relacionando diretamente com todos os níveis inferiores, incluindo anfíbios em suas fases larvais, consumidos por diversos peixes. Embora o estudo com duas espécies de anfíbios não tenha demonstrado bioacumulação, as informações sobre o tema permanecem escassas e, como parte da dieta de peixes, organismos bioacumuladores que, por sua vez, são consumidos pelos seres humanos, os anfíbios são potencialmente parte de uma das possíveis rotas de bioacumulação e biomagnificação, sendo necessária atenção aos riscos dos pesticidas para a saúde pública (ISLA, 2016; LINS et al., 2010; ZHOU et al., 2008).

Apesar da importância destas análises, apenas um estudo analisou os efeitos

genotóxicos do malation em anfíbios, apresentando resultados significativos para o teste de micronúcleo realizado (GIRI et al., 2012), e apenas um estudo avaliou a bioacumulação (CLEMOW et al., 2017). Assim, os relatos a respeito da genotoxicidade e bioacumulação de malation em anfíbios permanecem escassos, deixando uma lacuna no conhecimento a ser preenchida.

No Brasil, o uso do malation está relacionado principalmente à agricultura e ao controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor transmissor do vírus da dengue, através do fumacê (HUCULECI et al., 2009; BRASIL, 2014; COLEONE; PAGANINI, 2014). Apesar do uso no país, devido à recomendação do Ministério da Saúde, o mosquito parece apresentar resistência à concentração de malation atualmente utilizada no fumacê (LEANDRO et al., 2020). Assim, deve-se buscar alternativas para combater o mosquito, a fim de reduzir a utilização de um composto químico potencialmente danoso à saúde pública e à biodiversidade.

Algumas alternativas já vêm sendo estudadas e utilizadas. A primeira delas é a criação de campanhas educacionais, que sejam capazes de atrair a atenção das comunidades afetadas pela presença do mosquito, envolvendo-as em um trabalho social de limpeza de quintais e terrenos baldios, garantindo a eliminação de locais que podem se tornar depósitos de água, em especial aqueles que são temporários, como pneus, garrafas de água e suas tampas, e outros. Neste sentido, estudos já demonstraram que esta ferramenta tem potencial de reduzir o número de mosquitos adultos no ambiente e larvas em desenvolvimento (ESPINOZA-GÓMEZ; HERNÁNDEZ-SUÁREZ; COLL- CÁRDENAS, 2002).

Outra alternativa é a utilização de óleos essenciais de plantas, como o limoneno e o ρ -cimeno da espécie *Aristolochia trilobata*, que aparentam não serem tóxicos para seres humanos e outras espécies não alvo, enquanto possuem ação letal em fungos, bactérias e insetos considerados pragas (CAMPORESE et al., 2003; FENNER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2017; QUINTANS et al., 2017; SILVA et al., 2018). Esses compostos foram testados em *A. aegypti* e demonstraram potencial no controle populacional do mosquito (SILVA et al., 2018). Neste mesmo sentido, outro trabalho utilizou o extrato da alga marinha vermelha *Champia parvula* como bioinseticida, obtendo resultados satisfatórios (YOGARAJALAKSHMI et al., 2020)

A utilização de peixes predadores das larvas do mosquito também já foi testada no Brasil. Esses animais deveriam se reproduzir e consumir as larvas em ambientes aquáticos. Contudo, esses animais são exóticos e podem ocasionar um desequilíbrio no ambiente onde são inseridos, tornando-se espécies invasoras (AZEVEDO-SANTOS et al., 2016).

Adicionalmente, a liberação de mosquitos transgênicos vem sendo testada como técnica de controle populacional. Os machos possuem uma alteração em seu DNA, que passa a conter um gene codificante da proteína tTAV. Um alto nível dessa proteína possui efeito tóxico que ocasiona

a morte da prole dos machos transgênicos soltos na natureza e que se acasalam com fêmeas selvagens (CARVALHO, 2016; EMBRAPA, 2017).

Outro estudo propõe ainda a utilização de armadilhas contendo esporos do fungo *Beauveria bassiana* misturados com piriproxifeno, além de água em seu interior. As fêmeas são atraídas pelo odor do piriproxifeno e depositam seus ovos na armadilha. No processo de oviposição, as fêmeas são contaminadas pela mistura preparada e carregam-na para outros pontos de oviposição, contaminando diversos locais até morrerem devido ao fungo. As larvas nos locais contaminados pelo piriproxifeno apresentam alta mortalidade, incluindo aquelas ovipositadas na armadilha. A armadilha ainda é feita de polietileno, um material barato que permite produção em larga escala. Desta forma, armadilhas como esta podem se tornar essenciais no combate ao mosquito da dengue (SNETSELAAR et al., 2014).

Há ainda estudos promissores utilizando-se da bactéria *Wolbachia* para controle populacional do *A. aegypti*. A bactéria afeta diretamente a reprodução do mosquito, causando incompatibilidade reprodutiva entre o macho infectado e a fêmea selvagem, ocasionando a morte da prole e redução na incidência das doenças das quais o mosquito é o vetor (MCMENIMAN et al., 2009; PINTO et al., 2021).

Todos esses estudos demonstram que alternativas ao uso do malation existem e são eficazes. Devido a importância da dengue para a saúde pública, mais estudos devem surgir e apresentar soluções novas ao inseticida atualmente tão utilizado. Assim, as novas possibilidades devem ser postas em práticas para garantir a preservação da biodiversidade, bem como garantir o bem-estar do ser humano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão bibliográfica realizada, verificou-se uma quantidade moderada de trabalhos relatando os efeitos da exposição ao malation em anfíbios. Esses estudos demonstraram que o inseticida é capaz de causar uma variedade de alterações morfológicas como dobramentos caudais, surgimento de bolhas, ventralização, caudas duplas, entre outros, além de afetar diversas vias bioquímicas, como da AChE e BChE, do NAD⁺, e outros.

A elaboração da tabela foi essencial para a visualização dos efeitos observados em cada espécie, facilitando ainda a busca de informações e autores específicos, sempre que necessário.

Adicionalmente, a ausência de estudos com espécies do grupo dos Urodela e Gymnophiona, bem como informações divergentes entre autores, e efeitos pouco relatados e abordados, abre uma janela de oportunidades para que novas pesquisas sejam realizadas, que potencialmente trarão informações valiosas a respeito dos efeitos do malation em anfíbios.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 727–733, 2007.
- AKKERS, R. C. et al. Resource A Hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 Acquisition in Spatial Gene Regulation in *Xenopus* Embryos. **Developmental Cell**, v. 17, p. 425–434, 2009.
- ALEWU, B.; NOSIRI, C. Pesticides and Human Health. In: STOYTICHEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the Modern World**. [s.l.] InTech Publisher, 2011. p. 205-.
- ALLEVA, R. et al. Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 476–487, 2018.
- ALVARELLOS, M. L. et al. PharmGKB Summary: Succinylcholine Pathway, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics. **Pharmacogenet Genomics**, v. 25, n. 12, p. 622–630, 2015.
- ANGUIANO, O. L.; CABALLERO DE CASTRO, A.; PECHEN DE D'ANGELO, A. M. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 35–43, 2001.
- ANKLEY, G. T.; JOHNSON, R. D. Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. **Har Journal**, v. 45, n. 4, p. 469–483, 2004.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil. Anvisa, 20 jan. 2017. Disponível em: <<https://bit.ly/2WD8grj>>.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R. S.; PELICICE, F. M.; GARCÍABERTHOU, E.; SIMBERLOFF, D. Nonnative Fish to Control Aedes Mosquitoes: A Controversial, Harmful Tool. **BioScience**, v. 67, n. 1, p. 84–90, 2016.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949–968, 2013.
- BADR, A. M. Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 21, p. 26036– 26057, 2020.
- BASHA, S. M.; RAO, K. S. P.; RAO, K. R. S. S. Respiratory Potentials of the Fish (*Tilapia mossambica*) Under Malathion, Carbaryl and Lindane Intoxication. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 570–574, 1984.
- BENDER, M. E. Uptake and Retention of Malathion by the Carp. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 31, n. 3, p. 155–159, 1969.
- BENDIS, R. J.; RELYEA, R. A. If you see one, have you seen them all?: Community-wide effects of insecticide cross-resistance in zooplankton populations near and far from agriculture.

Environmental Pollution, v. 215, p. 234–246, 2016.

BHARTI, S.; RASOOL, F. Analysis of the biochemical and histopathological impact of a mild dose of commercial malathion on *Channa punctatus* (Bloch) fish. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 443–455, 2021.

BLUM, M.; OTT, T. *Xenopus*: An undervalued model organism to study and model human genetic disease. **Cells Tissues Organs**, v. 205, n. 5–6, p. 303–312, 2018.

BONFANTI, P. et al. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 189–200, 2004.

BOONE, M. Examining the Single and Interactive Effects of Three Insecticides on Amphibian Metamorphosis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. preprint, n. 2008, p. 1, 2008.

BORODINSKY, L. N. *Xenopus laevis* as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, n. November, p. 1–9, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações sobre o uso de Malathion Emulsão Aquosa - EA 44% para o controle de *Aedes aegypti* em aplicações espaciais a Ultra Baixo Volume (UBV). MS, 2014.

BRIMIJOIN, S.; MINTZ, K. P.; ALLEY, M. C. Production and Characterization of Separate Monoclonal Antibodies to Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Molecular Pharmacology**, v. 24, p. 513–520, 1983.

BROCKES, J. P. Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 81–87, 1997.

BROGAN, W. R.; RELYEA, R. A. Submerged macrophytes mitigate direct and indirect insecticide effects in freshwater communities. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

BROWN, R. E. et al. CONTROL OF SLEEP AND WAKEFULNESS. **Physiological reviews**, v. 92, n. 3, p. 1087–187, 2012.

BROWN, S. S. et al. THE PLASMA CHOLINESTERASES: A NEW PERSPECTIVE. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 22, 1981.

BUDISCHAK, S. A.; BELDEN, L. K.; HOPKINS, W. A. Relative toxicity of malathion to trematode-infected and noninfected *Rana palustris* tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 123–128, 2008a.

BUDISCHAK, S. A.; BELDEN, L. K.; HOPKINS, W. A. Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2496–2500, 2008b.

BURGGREN, W. W.; INFANTINO, R. L. The respiratory transition from water to air breathing during amphibian metamorphosis. **Integrative and Comparative Biology**, v. 34, n. 2, p. 238–246, 1994.

BURLIBAŞA, L.; GAVRILĂ, L. AMPHIBIANS AS MODEL ORGANISMS FOR STUDY ENVIRONMENTAL GENOTOXICITY. **APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2011.

CAMPANELLA, L. et al. Butyrylcholine enzyme sensor for determining organophosphorus inhibitors. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 26, n. 2, p. 237–249, 1991.

CAMPORESE, A. et al. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **J Ethnopharmacol**, v. 87, p. 103–107, 2003.

CANIZARES, E. M. P. N.; ZINI, C. A. As implicações da convenção de estocolmo para a indústria de celulose e papel. p. 51, 2007.

CANNATELLA, D. C.; DE SA, R. O. *Xenopus laevis* as a model organism. **Systematic Biology**, v. 42, n. 4, p. 426–507, 1993.

CARVALHO, D. O. **Obtenção e caracterização de linhagem transgênica de *Aedes aegypti* machos geneticamente estéreis**. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

CELANDER, M. C. et al. Species extrapolation for the 21st century. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 52–63, 2011.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, n. 3, p. 625–634, 1989.

CLEMOW, Y. H. et al. A refined ecological risk assessment for California red-legged frog, Delta smelt, and California tiger salamander exposed to malathion. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, n. 2, p. 224–239, 2017.

COLEONE, A. C.; PAGANINI, W. da. S. **Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

COOK, G. H.; MOORE, J. C. Determination of malathion, malaoxon, and monoand dicarboxylic acids of malathion in fish, oyster, and shrimp tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 631–634, 1976.

CORREIA, J. E. et al. Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to phisicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**, v. 173, p. 494–501, 2017.

COSSINS, A. R.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 4, p. 324–333, 2005.

CUI, Q. et al. Occurrence and Tissue Distribution of Novel Perfluoroether Carboxylic and Sulfonic Acids and Legacy Per/Polyfluoroalkyl Substances in Black-Spotted Frog (*Pelophylax nigromaculatus*). **Environmental Science and Technology Letters**, v. 52, n. 3, p. 982–990, 2018.

DA ROCHA, M. L. C. Avaliação da capacidade de bioacumulação e da toxicidade do ácido abiético

em microalgas (*Scenedesmus subspicatus*) e em microcrustáceos. 2015.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 131–138, 2003.

DAWID, I. B.; SARGENT, T. D. *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. **Science**, v. 240, n. 4858, p. 1443–1448, 1988.

DE CASTRO, A. C.; ROSENBAUM, E. A.; PECHEN DE D'ANGELO, A. M. Effect of malathion on *Bufo arenarum* hensel development-I. Esterase inhibition and recovery. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 4, p. 491–495, 1991.

DE LLAMAS, M. C.; DE CASTRO, A. C.; DE D'ANGELO, A. M. P. Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 161–166, 1985.

DELAIRE, C. et al. How Much Will It Cost To Monitor Microbial Drinking Water Quality in Sub-Saharan Africa? **Environmental Science and Technology**, v. 51, p. 5869–5878, 2017.

DENARDO, D. Amphibians as Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 37, n. 4, p. 173–181, 1995.

DEPARTMENT OF HEALTH SERVICES. **Health Risk Assessment of Aerial Application of Malathion-Bait Summary Report**. 1991.

DREWS, U.; KUSSÄTHER, E.; USADEL, K. H. HISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER CHOLINESTERASE IN DER FRÜHENTWICKLUNG DER HÜHNERKEIMSCHLEIHE. **Histochemie**, v. 8, p. 65–89, 1967.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. 1994. ed. Baltimore e Londres: The Johns Hopkins University Press, 1986.

DUTHIE, S. J. Folate and cancer: How DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 1, p. 101–109, 2011.

EGEA-SERRANO, A.; SOLÉ, M. Effects of insecticides on a phytotelmata-breeding amphibian. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 422–428, 2017.

EKHOLM, M. Predicting relative binding free energies of substrates and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 572, n. 1–3, p. 25–34, 2001.

EL NEMR, A. et al. Levels, distribution, and risk assessment of organochlorines in surficial sediments of the Red Sea coast, Egypt. **Springer**, v. 185, p. 4835–4853, 2013.

EL NEMR, A.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. **Elsevier**, v. 54, p. 1401–1406, 2004.

ESPINOZA-GÓMEZ, F.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, C. M.; COLL-CÁRDENAS, R. Educational campaign versus malathion spraying for the control of *Aedes aegypti* in Colima, Mexico. **J Epidemiol Community Health**, v. 56, p. 148–152, 2002.

GILBERTSON, M.-K. et al. Immunosuppression in the Northern Leopard Frog (*Rana Pipiens*) Induced By Pesticide Exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 101, 2003.

GIRI, A. et al. Effect of predator stress and malathion on tadpoles of Indian skittering frog. **Aquatic Toxicology**, v. 106–107, p. 157–163, 2012.

GIRLING, S. J. Part III Reptiles and Amphibians - Chapter 17 Basic Reptile and Amphibian Classification. **Veterinary Nursing of Exotic Pets: Second Edition**, p. 245–265, 2013.

GRUBE, A.; DONALDSON, D.; KIELY, T; LA, W. 2011. Pesticides industry sales and usage, 2006–2007 market estimates. **Annual Report**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2011.

GUEDES, R. N. C. et al. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 2, p. 145–150, 1995.

GUILHERME, S. et al. Genotoxicity Evaluation of the Herbicide Garlon VR and Its Active Ingredient (Triclopyr) in Fish (*Anguilla anguilla* L.) Using the Comet Assay. **Wiley Online Library**, v. 30, n. 9, p. 1073–1081, 2014.

GUNTHER, F. A.; WESTLAKE, W. E.; JAGLAN, P. S. Reported solubilities of 738 pesticide chemicals in water. **Residue Reviews**, p. 1–148, 1968.

GURDON, J. B.; UEHLINGER, V. “Fertile” Intestine Nuclei. **Nature**, v. 210, n. 5042, p. 1240–1241, 1966.

GURUSHANKARA, H. P.; KRISHNAMURTHY, S. V.; VASUDEV, V. Effect of malathion on survival, growth, and food consumption of indian cricket frog (*Limnonectes limnocharis*) tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 251–256, 2006.

GURUSHANKARA, H. P.; VASUDEV, V.; KRISHNAMURTHY, S. V. Estimation of acute toxicity of malathion insecticide on tadpoles and adults of *Rana (Limnonectes) limnocharis*. **Indian J Comp Anim Physiol**, v. 21, n. January 2003, p. 48–54, 2003.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

HEREK, J. S. et al. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, 2021.

HASSAAN, M. A.; EL NEMR, A. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 3, p. 207– 220, 2020.

HERMANUTZ, R. O.; AGENCY, U. S. E. P. Endrin and Malathion Toxicity to Flagfish (*Jordanella floridae*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 159–168, 1978.

HOFFMAN, D. J.; EASTIN JR., W. C. Effects of Malathion, Diazinon, and Parathion Mallard Embryo Development and Cholinesterase Activity on at the rate of 100. **Environmental Research**,

v. 26, p. 472–485, 1981.

HOLDEN, A. V. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. In: **Environmental Pollution by Pesticides**. Boston, MA. v. 3p. 213–253. 1973.

HOOVER, G. M. et al. Uptake and Depuration of Four Per/Polyfluoroalkyl Substances (PFASS) in Northern Leopard Frog *Rana pipiens* Tadpoles. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 4, n. 10, p. 399–403, 2017.

HOSKINS, T. D.; BOONE, M. D. Variation in malathion sensitivity among populations of Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) and implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1917–1923, 2017.

HUCULECI, R. et al. Malathion-Induced Alteration of the Antioxidant Defence System in Kidney, Gill, and Intestine of *Carassius auratus gibelio*. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 523–530, 2009.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Agents Reviewed by the IARC Monographs. Volumes 1-100. 2009. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr>>.

IPEA. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. **Ipea**, p. 76, 2019.

ISLA, L. A. S. **O uso de peixes em estudos experimentais ecotoxicológicos "in situ", avaliando os efeitos da poluição aquática urbana em reservatórios. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Belo Horizonte, 2016.

JI, Q. et al. Atrazine and malathion shorten the maturation process of *Xenopus laevis* oocytes and have an adverse effect on early embryo development. **Toxicology in Vitro**, v. 32, p. 63–69, 2016.

JÜRGENS, M. D. et al. The long shadow of our chemical past - High DDT concentrations in fish near a former agrochemicals factory in England. **Chemosphere**, v. 162, p. 333–344, 2016.

KALOW, W.; DAVIES, R. O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 183–192, 1958.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 35, n. 12, p. 1305–1320, 1957.

KALYABINA, V. P. et al. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1179–1192, 2021.

KANDIEL, M. M. M. et al. Modulation of genotoxicity and endocrine disruptive effects of malathion by dietary honeybee pollen and propolis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Advanced Research**, v. 5, n. 6, p. 671–684, 2014.

KARCZMAR, A. G. BRAIN ACETYLCHOLINE AND ANIMAL ELECTROPHYSIOLOGY.

Plenum Press, p. 265–310, 1979.

KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. **Journal of Chromatography A**, v. 1130, n. 1 SPEC. ISS., p. 16–27, 2006.

KOCHER, T. D. Adaptive evolution and explosive speciation: The cichlid fish model. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 4, p. 288–298, 2004.

KOWSALYA; PRASADA RAO, K. S.; RAO. EFFECT OF MALATHION ON SOME KINESIOLOGICAL PARAMETERS OF THE GASTROCNEMIUS MUSCLE OF FROG, *Rana hexadactyla* (LESSON) AND THE ANTAGONISTIC ACTION OF ATROPINE. **Toxicology Letters**, v. 39, p. 215–221, 1987.

KRISHNAMURTHY, S. V.; SMITH, G. R. Growth, abnormalities, and mortality of tadpoles of American toad exposed to combinations of malathion and nitrate. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2777–2782, 2010.

KRISHNAMURTHY, S. V.; SMITH, G. R. Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1361–1367, 2011.

KRSTIC, D. Z. et al. Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 562–573, 2008.

KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K.; LAKRA, W. S. Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 123–130, 2010.

KUNDU, C. R.; ROYCHOUDHURY, S. Malathion-induced sublethal toxicity on the hematology of cricket frog (*Fejervarya limnocharis*). **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 44, n. 7, p. 673–680, 2009.

KUNDU, C. R.; ROYCHOUDHURY, S.; CAPCAROVA, M. Malathion-induced sublethal toxicity on the intestine of cricket frog (*Fejervarya limnocharis*). **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 46, n. 8, p. 691–696, 2011.

LAYER, P. G. Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain. v. 80, n. October, p. 6413–6417, 1983.

LEANDRO, A. DE S.; RIOS, J. A.; BRITTO, A. DA S.; GALVÃO, S. R.; LOPES, R. D.; RIVAS, A. V.; MARTINS, C. A.; DA SILVA, I.; DELAI, R. M.; GONÇALVES, D. D.; DA SILVA, M. A. M.; PALACIO-CORTÈS, A. M.; SCHUARTZ, V.; SIBIM, A. C.; DE CASTRO, W. A. C. Malathion insecticide resistance in *Aedes aegypti*: laboratory conditions and in situ experimental approach through adult entomological surveillance. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 10, p. 1271–1282, 2020.

LEHMANN, H.; RYAN, E. the Familial Incidence of Low Pseudocholinesterase Level. **The Lancet**, v. 268, n. 6934, p. 124, 1956.

LEWIS, J. L. et al. Cascading effects of insecticides and road salt on wetland communities. **Environmental Pollution**, v. 272, p. 116006, 2020.

LIMA, E. **Mosquito modificado geneticamente é nova arma de combate ao Aedes**. EMBRAPA, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30525791/mosquito-modificado-geneticamente-e-nova-arma-de-combate-ao-aedes>>.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469, 2010.

LIU, L. S. et al. Research proceedings on amphibian model organisms. **Dong wu xue yan jiu = Zoological research**, v. 37, n. 4, p. 237–245, 2016.

LOWCOCK, L. A. et al. Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamitans*). **Aquatic Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 241–255, 1997.

MACKEY, M. J.; BOONE, M. D. Single and interactive effects of malathion, overwintered green frog tadpoles, and cyanobacteria on gray treefrog tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 637–643, 2009.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia. Brasiliensis.**, v.12, n.3, p.355- 381, 2008.

MAHAJAN, L. et al. Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: Oxidative stress in rat liver. **Sage Journals: Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 10, 2018.

MASSOULIÉ, J.; BON, S. THE MOLECULAR FORMS OF CHOLINESTERASE AND ACETYLCHOLINESTERASE IN VERTEBRATES. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 57–106, 1982.

MASSOULIÉ, J.; TOUTANT, J.-P. Vertebrate Cholinesterases: Structure and Types. In: WHITTAKER, V. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin-Heidelberg, 1988 p. 225–265.

MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tadpoles - THE BIOLOGY OF ANURAN LARVAE**. Chicago e Londres: The University of Chicago Press, 1999.

MCMENIMAN, C. J.; LANE, R. V.; CASS, B. N.; FONG, A. W. C.; SIDHU, M.; WANG, Y.; O'NEILL, S. L. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 141–144, 2009.

MCTIERNAN, C. et al. Brain cDNA clone for human cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. October, p. 6682–6686, 1987.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.

MOODY, S. Fates of the Blastomeres of the 16-Cell Stage *Xenopus* Embryo. **Developmental**

Biology, v. 119, n. 2, p. 560–578, 1987a.

MOODY, S. Fates of the Blastomeres of the 32-Cell-Stage *Xenopus* Embryo. **Developmental Biology**, v. 122, n. 2, p. 300–319, 1987b.

MOORE, R. B. Effects of Pesticides on Growth and Survival of *Euglena gracilis* Z. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 226–230, 1970.

MULLIN, C. A. Effects of “inactive” ingredients on bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 194–200, 2015.

MYERS, N. Threatened biotas: “hot spots” in tropical forests. **Environmentalist**, v. 8, n. 3, p. 187–208, 1988.

NATARAJ, M. B.; KRISHNAMURTHY, S. V. Effects of combinations of malathion and cypermethrin on survivability and time of metamorphosis of tadpoles of Indian cricket frog (*Fejervarya limnocharis*). **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 47, n. 2, p. 67–73, 2012.

NATARAJ, M. B. R.; KRISHNAMURTHY, S. V. B. Individual and combined effects of organophosphate and carbamate pesticides on the cricket frog *Fejervarya limnocharis*. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 42, n. 6, p. 1767–1774, 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Insect-Pest Management and Control**. Washington, DC: The National Academies Press, 1969.

OLIVEIRA, B. M. S. et al. Essential oil of *Aristolochia trilobata*: Synthesis, routes of exposure, acute toxicity, binary mixtures and behavioral effects on leaf-cutting ants. **Molecules**, v. 22, p. 335, 2017.

OMAR, Wan Maznah Wan. Perspectives on the use of algae as biological indicators for monitoring and protecting aquatic environments, with special reference to Malaysian freshwater ecosystems.

Tropical life sciences research, v. 21, n. 2, p. 51, 2010.

PAN CONSOLIDATED list of banned pesticides. Pesticide Action Network International, 2018. Disponível em: <<https://bit.ly/2g5P1Tu>>.

PAWAR, K. R.; GHATE, H. V.; KATDARE, M. Effect of malathion on embryonic development of the frog *Microhyla ornata* (Dumeril and bibron). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 170–176, 1983.

PELAEZ, V. et al. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27–48, 2010.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, v. 1, p. 87–110, 2009.

PHILPOTT, A.; YEW, P. R. The *Xenopus* Cell Cycle. **Cell Cycle Control**, p. 95–112, 2005.

PICKERING, Q. H.; HENDERSON, C.; LEMKE, A. E. Transactions of the American Fisheries Society The Toxicity of Organic Phosphorus Insecticides to Different Species of Warmwater Fishes.

Transactions of the American Fisheries Society, v. 91, n. 2, p. 175–184, 1962.

PINTO, S. B.; RIBACK, T. I. S.; SYLVESTRE, G.; COSTA, G.; PEIXOTO, J.; DIAS, F. B. S.; TANAMAS, S. K.; SIMMONS, S. P.; DUFAULT, S. M.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L.; MUZZI, F. C.; KUTCHER, S.; MONTGOMERY, J.; GREEN, B. R.; SMITHYMAN, R.; EPPINGHAUS, A.; SARACENI, V.; DUROVNI, B.; ANDERS, K. L.; MOREIRA, L. A. Effectiveness of Wolbachia-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other Aedes-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009556, 2021.

PLAZA, P. I.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E.; LAMBERTUCCI, S. A. The perfect threat: Pesticides and vultures. **Elservier**, v. 687, p. 1207–1218, 2019.

POURMIRZA, A. A. Toxic Effects of Malathion and Endosulfan on Chick Embryo. **J. Agr. Sci. Tech.**, v. 2, p. 161–166, 2000.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352–358, 1989.

PRODY, C. A. et al. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. June, p. 3555–3559, 1987.

QUIJANO, L. et al. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 39–46, 2016.

QUINTANS, J. D. S. S. et al. Antinociceptive effect of Aristolochia trilobata stem essential oil and 6-methyl-5-hepten-2-yl acetate, its main compound, in rodents. **Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci**, v. 72, p. 93–97, 2017.

RALL, D. P. Difficulties in extrapolating the results of toxicity studies in laboratory animals to man. **Environmental Research**, v. 2, n. 5–6, p. 360–367, 1969.

RELYEA, R. A. SYNERGISTIC IMPACTS OF MALATHION AND PREDATORY STRESS ON SIX SPECIES OF NORTH AMERICAN TADPOLES. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 351–357, 2004a.

RELYEA, R. A. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1737–1742, 2004b.

RELYEA, R. A.; DIECKS, N. An unforeseen chain of events: Lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. **Ecological Applications**, v. 18, n. 7, p. 1728–1742, 2008.

ROHR, J. R. et al. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. **Ecological Applications**, v. 18, n. 7, p. 1743–1753, 2008.

ROSENBAUM, E. A. et al. Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 17, n. 6, p. 831–835, 1988.

ROSENBERRY, T. L. Catalysis by acetylcholinesterase: Evidence that the rate-limiting step
for

acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 10, p. 3834–3838, 1975.

RUIZ-SUÁREZ, N. et al. Continued implication of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). **Elsevier**, v. 505, p. 1093–1099, 2015.

RUMSCHLAG, S. L.; BOONE, M. D.; FELLERS, G. The effects of the amphibian chytrid fungus, insecticide exposure, and temperature on larval anuran development and survival. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2545–2550, 2014.

SALEM, D. M. S. A.; KHALED, A.; NEMR, A. EL. Assessment of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments of the Egyptian Mediterranean Coast. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 3, p. 141–152, 2013.

SANDERS, H. O.; COPE, O. B. Toxicities of Several Pesticides to Two Species of Cladocerans. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 95, n. 2, p. 165–169, 1966.

SANTOS, J. P. et al. DETERMINAÇÃO DE PERDAS POR INSETOS NO MILHO ARMAZENADO EM PEQUENAS PROPRIEDADES DO ESTADO DO PARANÁ. 1986.

SCALON, M. C. S. et al. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4 SUPPL., p. 1217–1222, 2010.

SCHRÖDER, C. Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis. **Histochemistry**, v. 69, n. 3, p. 243–253, 1980.

SHOEMAKER, V. H.; NAGY, K. A. OSMOREGULATION IN AMPHIBIANS AND REPTILES. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 39, p. 449–471, 1977.

SIKORAV, J. L. et al. Isolation of a cDNA clone for a catalytic subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. **FEBS Letters**, v. 193, n. 2, p. 159–163, 1985.

SILMAN, I.; FUTERMAN, A. H. Posttranslational Modification as a Means of Anchoring Acetylcholinesterase to the Cell Surface. **Biopolymers**, v. 26, 1987.

SILVA, I. M. A. et al. Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpene bioinsecticides. **Pest Management Science**, v. 74, n. 4, p. 1001–1012, 2018.

SMITH, G. R. et al. Differential effects of malathion and nitrate exposure on American toad and wood frog tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 327–335, 2010.

SNAWDER, J. E.; CHAMBERS, J. E. Toxic And Developmental Effects Of Organophosphorus Insecticides In Embryos Of The South African Clawed Frog. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 24, n. 3, p. 205–218, 1989.

SNAWDER, J. E.; CHAMBERS, J. E. CRITICAL TIME PERIODS AND THE EFFECT OF TRYPTOPHAN IN MALATHION-INDUCED DEVELOPMENTAL DEFECTS IN *Xenopus*

EMBRYOS. **Life Sciences**, v. 46, p. 1635–1642, 1990.

SNAWDER, J. E.; CHAMBERS, J. E. Osteolathyrogenic Effects of Malathion in *Xenopus* Emrbyos. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 121, p. 2010–2016, 1993.

SNETSELAAR, J. et al. Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, n. 3, p. 535–539, 2007.

STARCK, J. M.; STEWART, J. R.; BLACKBURN, D. G. Phylogeny and evolutionary history of the amniote egg. **Journal of Morphology**, v. 282, p. 1080–1122, 2021.

STOLER, A. B. et al. Effects of a common insecticide on wetland communities with varying quality of leaf litter inputs. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 452–462, 2017.

TAYLOR, S. K.; WILLIAMS, E. S.; MILLS, K. W. Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 3, p. 536–541, 1999.

TOUTANT, J.-P.; MASSOULIÉ, J. Cholinesterases: Tissue and Cellular Distribution of Molecular Forms and Their Physiological Regulation. In: WHITTAKER, V. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin-Heidelberg, 1988. p. 225–265.

UMAR, M.; HUSSAIN, M.; MALONEY, S. K. Assessment of Cholinesterase inhibition activity of birds inhabiting pesticide exposed croplands and protected area in hot semi-arid region of Pakistan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. 1–8, 2023.

USDA-NASS, 2020. United States Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service. Chemical Use Team, 1400 Independence Ave, SW, South Building – Room 6055, Washington, D.C. 20250-2052. 2020. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Chemical_Use/>.

VENTURINO, A. et al. Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 135–139, 1992.

VENTURINO, A. et al. Toxicokinetics of malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel): Effect of exogenous spermidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 3, p. 142–150, 2001a.

VENTURINO, A. et al. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 130, n. 2, p. 191–198, 2001b.

WAGNER, N. et al. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2013.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, v. 105, p. 11466–11473, 2008.

WERNER, I. et al. Environmental Risk of Pesticides for Fish in Small- and Medium-Sized Streams of Switzerland. **Toxics**, v. 9, n. 79, 2021.

WILLENS, S. et al. Percutaneous malathion absorption by anuran skin in flow-through diffusion cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 255–262, 2006.

WISE, R. S.; RUMSCHLAG, S. L.; BOONE, M. D. Effects of amphibian chytrid fungus exposure on American toads in the presence of an insecticide. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2541–2544, 2014.

WOODROW, J. E.; GIBSON, K. A.; SEIBER, J. N. Pesticides and Related Toxicants in the Atmosphere American Conference of Governmental Industrial Hygienists. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 247, p. 147–196, 2019.

World Health Organization. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. England: World Health Organization (1990).

YOGARAJALAKSHMI, P.; VENUGOPAL POONGUZHALI, T.; GANESAN, R.; KARTHI, S. SENTHIL-NATHAN, S.; KRUTMUANG, P.; RADHAKRISHNAN, N.; MOHAMMAD, F.; KIM, T.; VASANTHA-SRINIVASAN, P. Toxicological screening of marine red algae *Champia parvula* (C. Agardh) against the dengue mosquito vector *Aedes aegypti* (Linn.) and its non-toxicity against three beneficial aquatic predators. **Aquatic Toxicology**, v. 222, p. 105474, 2020.

YU, S. et al. Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of *Xenopus laevis* and comparison with other amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 2056–2064, 2013.

YU, S. et al. The effects of pesticide exposure on ultraviolet-B radiation avoidance behavior in tadpoles. **Science of the Total Environment**, v. 481, n. 1, p. 75–80, 2014.

YU, S. et al. Joint effects of pesticides and ultraviolet-B radiation on amphibian larvae. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 248–255, 2015.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–150, 2008.