



Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril

Cholinesterasic activity in brain and muscle of Corydoras paleatus (Pisces, Teleostei) exposed to carbaryl

Izonete Cristina Guiloski^[a], Eliz Guimarães da Silva^[b], Celise Mayumi Nishikawa^[c],
Helena Cristina da Silva de Assis^[d]

^[a] Bióloga, Mestre em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, email: guiloski@ig.com.br

^[b] Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, email: eliz.guimaraes@yahoo.com.br

^[c] Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, email: celise.mayuki@yahoo.com.br

^[d] Médica veterinária, Doutora em Ciências Naturais, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, email: helassis@ufpr.br

Resumo

Os inseticidas organofosforados e carbamatos são conhecidos como inibidores seletivos da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Essa enzima catalisa a hidrólise da acetilcolina, o mediador químico necessário para a transmissão do impulso nervoso. Quando esses inseticidas são liberados no ambiente, podem contaminar vários ecossistemas aquáticos. Este trabalho avaliou parâmetros cinéticos da enzima AChE em *Corydoras paleatus*, já que existem poucos estudos sobre essa espécie de peixe e o efeito inibitório do carbamato (carbaril) na sua atividade. Para os ensaios cinéticos, várias concentrações de substratos (iodeto de acetiltiocolina, propioniltiocolina e butiriltiocolina) foram testadas. Após este estudo, peixes foram expostos ao carbaril nas concentrações de 7,2 e 14,4 mg.L⁻¹ por 96 horas. Um ensaio de sete dias também foi realizado com a maior concentração de carbaril. A AChE presente no cérebro e no músculo de *C. paleatus* possui maior especificidade pelo substrato iodeto de acetiltiocolina, sendo ele utilizado nas análises da AChE após a exposição ao inseticida. Em 96 horas houve redução da AChE cerebral em 70% e da muscular em 53% na maior concentração. Na exposição ao carbaril por sete dias ocorreu mortalidade de 50% dos animais do grupo teste e redução da AChE muscular em 39% e da cerebral em 64%. A AChE cerebral mostrou-se mais sensível à inibição causada por carbaril em *C. paleatus*, porém, o tecido muscular também pode ser utilizado para análise da contaminação por esse inseticida. Apesar

de ser uma espécie resistente aos poluentes pode ser utilizada como bioindicador de poluição aquática a compostos anticolinesterásicos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Biomarcador. Carbaril. Cinética. Peixes.

Abstract

*The organophosphorus and carbamates insecticides are known as selective inhibitors of the acetylcholinesterase activity (AChE). This enzyme catalyze the acetylcholine hydrolyze, the chemical mediator necessary to the transmission of the nerve impulse. When these insecticides are released to the environment, they are able to contaminate some aquatic ecosystem. This work evaluated kinetics parameters of the enzyme AChE in *Corydoras paleatus* since there are few studies with this fish species, and the inhibitory effect of the carbamate (carbaryl) on its activity. For the kinetics studies some concentrations of substrates (acetylthiocholine, propionylthiocholine and butyrylthiocholine iodide) were tested. After this study fish were exposed to carbaryl at the concentrations of 7.2 and 14.4 mg.L⁻¹ during 96 hours. An experiment was carried out with the high concentration of carbaryl during 7 days. The brain and muscle AChE of *C. paleatus* has more affinity to the substrate acetylthiocholine iodide. This substrate was used in the AChE analysis after exposure to the insecticide. After 96 hours the brain acetylcholinesterase reduced in 70% and muscle in 53% at the high concentration. In the seven days exposure it was found mortality of 50% and muscle acetylcholinesterase inhibition in 39% and brain in 64%. The brain AChE showed more sensible to the carbaryl inhibition in *C. paleatus* but muscle tissue can be used to contamination analyze of this insecticide. Although this fish species are resistant to pollutants, it can be used as bioindicator of aquatic pollution to anticholinesterasics compounds.*

Keywords: Acetylcholinesterase. Biomarker. Carbaryl. Fish. Kinetics.

Introdução

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (CALDAS, 2000). A utilização desses compostos cresceu com a exploração agrícola intensiva, pois tais compostos melhoram a produção animal e vegetal em razão da eliminação dos parasitas que competem por alimentos ou causam doenças. Entretanto, os agrotóxicos podem trazer riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal por meio da intoxicação aguda ou dos efeitos crônicos difíceis de serem relacionados à exposição em baixas concentrações (COOPER et al., 1999).

Os carbamatos (ésteres do ácido carbâmico) estão entre as classes de inseticidas mais utilizadas na agricultura e são reconhecidos por inibir a acetilcolinesterase (AChE), a qual desempenha uma função importante nas sinapses colinérgicas, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e acetato (KAVITHA; RAO, 2007). O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior carbamilação (MAXWELL et al., 2008).

Como os carbamatos são de difícil mensuração por análises químicas, em razão da sua curta meia-vida e baixa bioacumulação, vem sendo reforçado o papel da acetilcolinesterase em biomonitoramento, principalmente em regiões agrícolas onde esses agrotóxicos são aplicados em grandes quantidades e a biota aquática pode ser exposta (GRUBER; MUNN, 1998). A inibição da acetilcolinesterase pode ser perigosa para peixes, principalmente por atingir a atividade natatória, comprometendo a alimentação e a fuga de seus predadores (BÁLINT et al., 1995).

A dinâmica da interação da AChE e os compostos organofosforados e carbamatos depende da afinidade do inseticida pela enzima, o qual é comumente representado como constante de afinidade K_s (WANG; MURPHY, 1982). Silva Filho et al. (2004) relataram diferenças nos parâmetros cinéticos inibitórios da AChE entre várias espécies de peixes, um ponto importante a ser considerado na seleção de organismos sentinelas selecionados para programas de biomonitoramento. A relação entre a presença desses compostos no ambiente

aquático e a atividade tecidual da AchE tem sido bem estudada e utilizada como biomarcador em espécies de vertebrados e invertebrados aquáticos (BOCQUENÉ et al., 1990; STURM et al., 1999; DE LA TORRE et al., 2002; VARÓ et al., 2003). De fato, os efeitos dos inseticidas organofosforados e carbamatos têm mostrado uma grande variabilidade nas diferentes espécies de peixes (FERRARI et al., 2004; SILVA FILHO et al., 2004).

O inseticida testado neste trabalho foi o Sevin® (Bayer) cujo princípio ativo é o carbaril (1-naftil-n-metilcarbamato) e que é um inseticida carbamato pertencente à classe toxicológica II ou moderadamente tóxico (ANVISA, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2002).

A espécie *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) pertence à ordem Siluriformes e à família Callichthyidae. Popularmente é conhecida como diabinho, limpa fundo e cascudinho. Por conta da abundância e distribuição em rios e lagos da região da bacia do Rio Paraná e rios costeiros do Brasil e Uruguai, bem como no norte da Argentina (SANTOS, 1981), é de grande valia a verificação da viabilidade de sua utilização em estudos como bioindicador de exposição a compostos anticolinesterásicos no ambiente. Essa espécie é também pequena e fácil de manter em laboratório. Ativos durante o dia, *C. paleatus* são onívoros dando preferência a larvas de díptera e microcrustáceos não planctônicos, indicando que se alimentam próximos do sedimento (ARANHA et al., 1993; KRAMER; MCCLURE, 1981). Consequentemente, peixes como *C. paleatus* podem absorver os pesticidas não somente pela água, mas também pelo alimento.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da AchE como biomarcador de exposição e alguns parâmetros cinéticos da enzima^{??} em peixes da espécie *C. paleatus*.

Material e métodos

Os peixes ($4,0 \pm 1,5$ g) foram adquiridos de estabelecimentos comerciais. Os animais foram transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental sendo mantidos (30 peixes por aquário) por 30 dias em aquários-estoque de 120 L para aclimação, com fotoperíodo de 12 h, aeração constante, pH de $6,8 \pm 0,1$, temperatura da água de 23 ± 2 °C e alimentação diária com ração comercial. Tal experimento foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR sob o n. 216.

Para as análises de cinética enzimática, dez peixes foram eutanasiados por secção medular e foram retiradas amostras, do músculo axial e do cérebro, que foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Cinética e análise enzimática

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,5) em homogeneizador Potter-Elvehjem. Esses homogenados foram centrifugados por 20 min a $10.000 \times g$ a 4 °C. O sobrenadante foi separado para análise enzimática. Para determinar os parâmetros cinéticos como a afinidade pelo substrato (K_m) e a atividade máxima da colinesterase ($V_{m\acute{a}x}$) foram utilizadas diferentes concentrações de substratos, como a de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh), 0 a 20 mM; de propioniltiocolina (PrSCh), 0 a 40 mM; de butiriltiocolina (BuSCh) de 0 a 40,0 mM. O extrato tecidual foi diluído (1:5) e pipetado (50 µL) nas cavidades da microplaca (quatro repetições). O DTNB (5,5 – Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM foi adicionado (200 µL) a cada amostra. Foram adicionados (50 µL) de cada concentração de substrato à placa imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro de microplaca TECAN a 405 nm.

A análise da atividade acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), e expressa em nmol de substrato hidrolisado por min^{-1} . mg proteína⁻¹. Para cada ensaio, um branco sem amostra foi realizado em paralelo para estimar a razão de hidrólise espontânea do substrato. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) foi avaliada por uma curva de regressão não linear, mostrando variação na velocidade inicial para as concentrações de substratos. Para a obtenção da constante (K_m) e da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da acetilcolinesterase foi utilizado o programa GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A constante de especificidade (k_s) foi obtida pela razão entre $V_{m\acute{a}x}$ e K_m .

Exposição ao carbaril

Um ensaio de 96 horas foi realizado com três grupos, formados aleatoriamente, de dez peixes cada, sendo dois grupos teste e um grupo controle. Os grupos teste foram expostos a 12 e 24 μL do produto comercial Sevin® (Bayer) por litro de água do aquário (equivalente a 7,2 e 14,4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbaril, respectivamente). Essas concentrações foram baseadas em experimentos prévios realizados no laboratório com o peixe *Astyanax* sp. (lambari) e *C. paleatus*. Um ensaio de sete dias também foi realizado com dois grupos, sendo um grupo teste (equivalente a 14,4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbaril) e um grupo controle utilizando peixes *C. paleatus*. A concentração mais alta foi escolhida para se observar se o efeito se manteria após sete dias de uma única exposição, baseado na ocorrência de degradação do produto durante o período. Os ensaios biológicos foram conduzidos observando-se o comportamento e mortalidade dos peixes. Os experimentos finalizaram com a eutanásia dos animais por secção medular. Todos os animais foram pesados e medidos. Imediatamente foram retiradas amostras do músculo axial e do cérebro para a análise da atividade acetilcolinesterásica descrita anteriormente.

A concentração de proteína nas amostras utilizadas nas análises foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para tanto, o extrato tecidual foi diluído (1:20) e pipetado (10 μL) nas cavidades da microplaca (quatro repetições). O reagente de Bradford (BioRad) foi adicionado (250 μL) a cada amostra. Uma curva-padrão utilizando soro de albumina bovina foi realizada e a leitura feita em leitora de microplaca Tecan a 620 nm.

Análise estatística

Os resultados estão expressos em média \pm erro-padrão da média. Os dados do experimento de 96 horas foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguida de prova de Bonferroni e os do experimento de sete dias por teste t de Student para medidas não pareadas, utilizando o programa GraphPad Prism 3.0.

Resultados

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) mostraram-se diferentes com os substratos testados. Tanto no cérebro como no músculo de *C. paleatus* foram encontrados os maiores valores de K_s para o substrato iodeto de acetiltiocolina, sugerindo uma maior afinidade da enzima por esse substrato (Tabela 1).

Para cérebro, a maior $V_{\text{máx}}$ e o menor K_m foram obtidos com a AcSCh como substrato. Para músculo, a maior $V_{\text{máx}}$ foi obtida com o AcSCh, mas o menor K_m foi obtido com o BuSCh. Considerando o K_m como uma avaliação da afinidade da enzima pelo substrato, pelo fato de o K_m ser a concentração de substrato necessária para alcançar a metade da velocidade máxima, pode-se verificar que em cérebros e músculos, a acetilcolinesterase apresenta maior afinidade para AcSCh que para PrSCh.

No experimento de 96 horas não houve mortalidade dos animais, porém, os peixes apresentaram alguns sinais de intoxicação como menor atividade geral em relação ao grupo controle; perda do equilíbrio; natação irregular; e menor movimentação em certos locais, geralmente no nível médio de água, por períodos prolongados. Houve inibição somente da acetilcolinesterase cerebral (46%) na exposição à concentração de 7,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbaril (Figura 1-B). Entretanto, na maior concentração houve inibição da enzima tanto no músculo (Figura 1A) – em 54% – como no cérebro (Figura 1B) – em 67% – em relação ao controle.

Na exposição ao carbaril por sete dias, os animais apresentaram os mesmos sinais de intoxicação descritos para o experimento de 96 horas. Ocorreu mortalidade de 50% dos animais do grupo teste e houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo teste e o controle nos experimentos com músculo e cérebro (Figura 2). Houve redução da acetilcolinesterase muscular em 39%, em relação ao controle, e da acetilcolinesterase cerebral em 64%.

Tabela 1 - Cinética enzimática de cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* com os substratos AcSch,¹ BuSch² e PrSch³

Substrato	Tecido	K _m (mM)	V _{máx} μmol · min ⁻¹ · mg proteína ⁻¹	K _s μmol · min ⁻¹ · mg proteína ⁻¹ · mM ⁻¹
AcSch	Músculo	2,02	73,39	36,33
AcSch	Cérebro	1,47	44,15	30,03
PrSch	Músculo	16,33	99,60	6,10
PrSch	Cérebro	43,00	137,60	3,20
BuSch	Músculo	355,80	15,31	0,04
BuSch	Cérebro	64,09	37,06	0,58

Nota: ¹ iodeto de acetilcolina; ² iodeto de butiriltiocolina; ³ iodeto de propioniltiocolina.

Fonte: Dados da pesquisa.

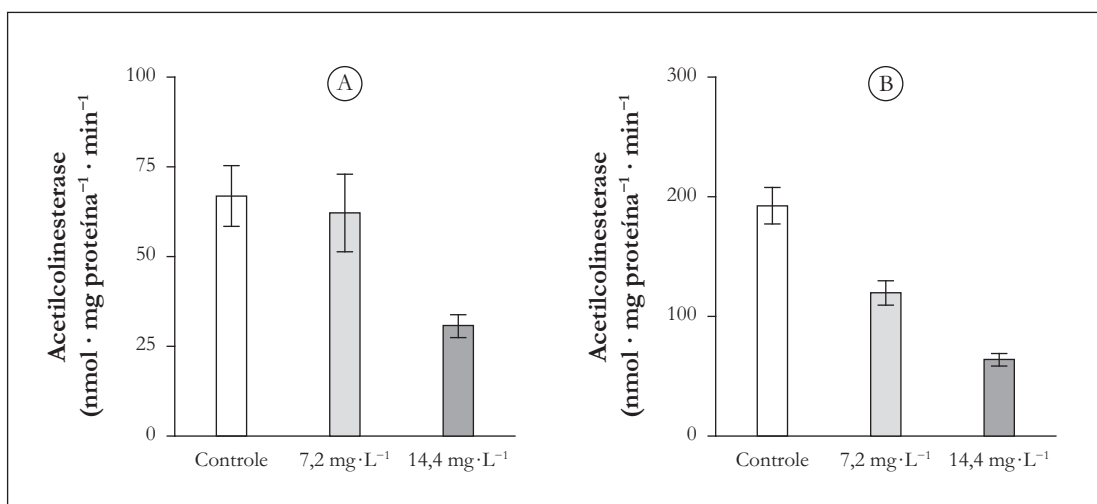


Figura 1 - Efeitos do carbaril na atividade da acetilcolinesterase muscular (A) e cerebral (B) de *Corydoras paleatus* após exposição por 96 horas

Nota: As barras expressam a média ± erro-padrão. n = 8. * Indica diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05);

** indica diferença significativa em relação à concentração de 7,2 mg · L⁻¹ (p < 0,05), ANOVA – Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Discussão

Como reconhecido recentemente pelas agências ambientais como Environmental Protection Agency (EPA) e International Council for Exploration of the Sea (ICES), o risco estimado de contaminação não pode basear-se somente na análise química das amostras ambientais, pois essa abordagem não indica os efeitos deletérios dos contaminantes na biota. Com o objetivo de detectar e estimar os efeitos de contaminantes nos organismos são utilizados alguns biomarcadores de exposição e efeito como a atividade da acetilcolinesterase (LIONETTO et al., 2003). Os resultados de cinética enzimática deste trabalho demonstraram que a

acetilcolinesterase de *C. paleatus* tem maior especificidade pelo substrato iodeto de acetiltiocolina, pois para esse substrato foram encontrados os maiores valores de K_s , indicando que, caso fossem colocados juntos os três substratos: acetiltiocolina, propioniltiocolina e butiriltiocolina, nas mesmas concentrações, a velocidade inicial de consumo do substrato pela enzima seria maior para o iodeto de acetiltiocolina.

Quanto à atividade da enzima, foi observado que a AchE cerebral foi mais sensível ao carbaril que a muscular, pois ela foi inibida em ambas as concentrações testadas. O músculo oferece a vantagem da fácil obtenção de uma grande quantidade de material. No entanto, ele não possui somente AchE, mas também butirilcolinesterase. Essa enzima possui, em média, 50% de homologia com a acetilcolinesterase e considera-se que atua preservando a acetilcolinesterase dos agentes anticolinesterásicos (STURM, 1999; KIRBY et al., 2000). Chandrasekara e Pathiratne (2005) observaram que a acetilcolinesterase cerebral de *Cyprinus carpio* exposto ao Trichlorfon (organofosforado) por 24 horas reduziu de 55% a 57% quando comparado ao controle, e a atividade da enzima foi restaurada somente após sete dias.

Sharma et al. (1993) mostraram que o carbaril causou maior inibição na atividade da acetilcolinesterase de cérebro e brânquias que de fígado e músculo no peixe *Clarias batrachus*. A inibição foi mais pronunciada com concentrações subagudas do agrotóxico (1, 2 e 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) por 15 dias do que por 96 horas. No presente estudo, o carbaril também causou uma inibição maior por 7 dias do que por 96 horas, ocorrendo mortalidade de 50% dos animais no experimento.

A AchE cerebral de *Ictalurus punctatus* foi sensível ao carbamato Aldicarb, mas os peixes, mesmo com 90% da atividade neuronal diminuída, foram capazes de sobreviver apresentando apenas sinais moderados de toxicidade. Esses dados sugeriram que a inibição da AchE muscular é o fator mais importante na mortalidade de peixes expostos ao Aldicarb. A perda do controle muscular pode causar múltiplos problemas para o peixe, incluindo perda do controle da natação e cessação do movimento opercular (PERKINS; SCHLENK, 2000). Existe uma variação de sensibilidade da acetilcolinesterase aos pesticidas entre os peixes neotropicais (WANG; MURPHY, 1982; KEMP; WALLACE, 1990; CARR; CHAMBERS, 1996). A espécie *C. paleatus* é uma espécie resistente, pois pode ser encontrada em locais impactados por poluentes ambientais. Neste trabalho essa espécie também suportou concentrações elevadas de carbaril, apesar de uma alta inibição da acetilcolinesterase. O conhecimento sobre os parâmetros bioquímicos da AchE dessa espécie se torna importante, pois pode ser utilizado como bioindicador da qualidade ambiental em regiões expostas a compostos anticolinesterásicos.

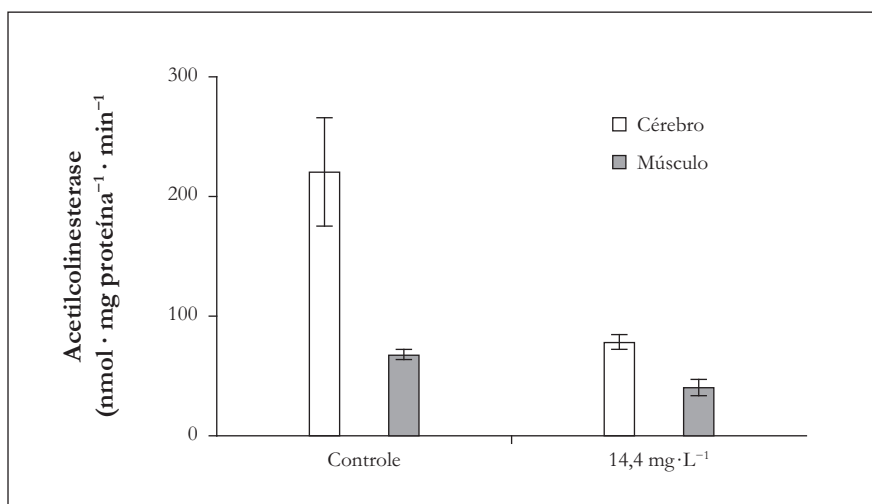


Figura 2 - Efeitos do carbaril na atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral de *Corydoras paleatus* após exposição por sete dias

Nota: As barras expressam a média \pm erro-padrão. n = 8. * Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) – teste t de Student para medidas não pareadas.

Fonte: Dados da pesquisa.

Conclusões

Antes de se utilizar a atividade da acetilcolinesterase como biomarcador de compostos anticolinesterásicos em programas de monitoramento ambiental é importante considerar a sensibilidade da enzima a esses agentes químicos. Com este estudo foi possível demonstrar que a acetilcolinesterase de *C. paleatus* pode ser utilizada como biomarcador de contaminação ambiental por carbaril, pois a enzima permanece inibida mesmo após sete dias de uma única exposição. O tecido cerebral se mostrou mais sensível à inibição.

Agradecimentos

Ao professor Doutor David Alexander Mitchell do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio na interpretação dos resultados da cinética enzimática.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografia de pesticidas 2003**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2006.
- ARANHA, J. M. R. et al. Ocupação espacial, alimentação e época reprodutiva de duas espécies de *Corydoras Lacépède* (Siluroidei, Callichthyidae) coexistentes no Rio Alambari (Botucatu, São Paulo). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, n. 3, p. 453-466, 1993.
- BÁLINT, T. et al. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n. 3/4, p. 279-295, 1995.
- BOCQUENÉ, G. et al. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, n. 2, p. 75-89, 1990.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.
- CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Kinetics analysis of the in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 365-373, 1996.
- CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 2, p. 144-149, 2005.
- COOPER, R. L. et al. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1/2, p. 26-36, 1999.
- DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 271-280, 2002.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FERRARI, A. et al. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 3, p. 420-425, 2004.

- GRUBER, S. J.; MUNN, M. D. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). **Archives Environmental Contaminants Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 391-396, 1998.
- KAVITHA, P.; RAO, J. V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 2, p. 182-188, 2007.
- KEMP, R. J.; WALLACE, K. B. Molecular determinants of species-selective inhibition of brain cholinesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 104, n. 2, p. 246-258, 1990.
- KIRBY, M. F. et al. The use of acetylcholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.
- KRAMER, D. L.; McCLURE, M. The transit cost of aerial respiration in the catfish *Corydoras aeneus* (Callichthyidae). **Physiological Zoology**, v. 54, p. 189-194, 1981.
- LIONETTO, M. G. et al. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 324-330, 2003.
- MAXWELL, D. M. et al. A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 2, p. 57-164, 2008.
- PERKINS Jr., E. J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of Aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 3, p. 308-315, 2000.
- SANTOS, E. **Peixes de água doce: vida e costumes dos peixes do Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1981.
- SHARMA, B. et al. Interaction of carbaryl with acetylcholinesterase of the teleost, *Clarias batrachus*. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 39, p. 147-152, 1993.
- SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung von Gewässerverschmutzungen**. 1998. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.
- SILVA FILHO, M. V. et al. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetic for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicological Letters**, v. 153, n. 2, p. 247-254, 2004.
- STURM, A. et al. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v. 47, n. 4, p. 389-398, 1999.
- VARÓ, I. et al. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 75, n. 3, p. 61-72, 2003.
- WANG, C.; MURPHY, S. D. Kinetics analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 409-419, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **WHO/PCS/98.21: the WHO recommended classification of pesticides by hazard**. Geneva: WHO, 2002.

Recebido: 08/02/2010
Received: 02/08/2010

Aprovado: 25/10/2010
Approved: 10/25/2010