

## **EFEITOS DO ENDOSULFANO NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE CASCUDO (*Ancistrus multispinnis*, FISH, TELEOSTEI)**

*Effects of Endosulfan on Acetylcholinesterase Activity of "Cascudo" (**Ancistrus multispinnis**, Fish, Teleostei)*

Claudio Klemz<sup>1</sup>  
Helena Cristina da Silva de Assis<sup>2</sup>

### **Resumo**

Respostas biológicas à presença de poluentes, também chamadas biomarcadores, podem ser usadas como indicadores precoces de contaminação ambiental. Esses biomarcadores são usados em programas de monitoramento ambiental, porém, devido às características de cada espécie animal usada como bioindicadora, a utilização de biomarcadores deve ser precedida da padronização dos métodos. A atividade da acetilcolinesterase é um dos mais antigos biomarcadores de contaminação aquática em peixes. Pesticidas organofosforados e carbamatos atuam como inibidores da acetilcolinesterase, outros compostos, porém, parecem também ter esta capacidade. É motivo de controvérsia na literatura a atividade anticolinesterásica do organoclorado endossulfano. Neste trabalho foi escolhida uma espécie nativa de peixe (*Ancistrus multispinnis*) e a viabilidade do uso da atividade acetilcolinesterásica como biomarcador de contaminação por endossulfano foi avaliada. Uma dose subletal de endossulfano (4 mg/kg) intracelomática foi administrada e uma amostra de músculo retirada após 24, 48 e 96 horas. A atividade acetilcolinesterásica foi medida e não se encontrou diferença estatística significativa em comparação ao grupo controle. Uma correlação negativa foi encontrada entre o peso e comprimento dos peixes em relação à atividade da enzima. Não houve correlação da atividade enzimática com o sexo dos animais. Esta informação se torna relevante em programas de monitoramento ambiental, onde se compara a atividade colinesterásica de peixes coletados em diferentes locais. O estudo dos efeitos do endossulfano em laboratório é importante no sentido de elucidar possíveis mecanismos de ação, viabilidade do uso do biomarcador e contribuir para a interpretação de resultados obtidos em pesquisas de campo.

**Palavras-chave:** Endossulfano; Acetilcolinesterase; Biomarcadores; Peixes.

---

<sup>1</sup> Médico Veterinário, M. Sc., ex- bolsista CAPES

<sup>2</sup> Médica Veterinária, Ph.D., Departamento de Farmacologia. Setor de Ciências Biológicas, UFPR, C.P. 19031 CEP: 81531-990 Curitiba, PR. helassis@ufpr.br

## Abstract

Biological responses to pollution, also called biomarkers, can be used as an early warning system of environmental contamination. These biomarkers have been used in environmental monitoring programs, therefore due to features of each animal species used as bioindicator, the standardization of methodologies precede the application of biomarkers. The acetylcholinesterase activity is one of the oldest biomarkers of aquatic contamination in fish. Organophosphorous and carbamate pesticides act as acetylcholinesterase inhibitors, but other compounds can also show this ability. Literature about the organochlorine endosulfan as a acetylcholinesterase inhibitor is controversial. In this study a native fish species (*Ancistrus multispinnis*) was chosen and the viability of acetylcholinesterase activity as a biomarker of endosulfan contamination was evaluated. A sublethal dose of endosulfan (4 mg/kg) was administered intraperitoneally and fish were killed after 24, 48 and 96 hours. Acetylcholinesterase activity was measured in muscle and did not reveal any significant statistical changes compared to control group. A negative correlation between fish weight and size against acetylcholinesterase activity was observed. There was not a correlation between sex and enzymatic activity. This information is relevant for monitoring programs, where the fish cholinesterasic activity is compared in different sites. The study of endosulfan effects in lab is important to elucidate possible action mechanisms, the use viability of the biomarker and to contribute to the results interpretation from field researches.

**Keywords:** Endosulfan; Acetylcholinesterase; Biomarkers; Fish.

## Introdução

Muitos pesquisadores têm estudado as respostas biológicas a poluentes e seu uso como indicadoras de contaminação ambiental. Tais respostas têm sido chamadas de biomarcadores, os quais podem ser mensurados indicando o efeito precoce de contaminação (WALKER et al., 1996). Na Europa e América do Norte, biomarcadores foram padronizados para espécies nativas, os quais são utilizados em programas de monitoramento ambiental. No Brasil essa etapa se encontra em desenvolvimento. Alguns autores têm colaborado para a padronização de biomarcadores em espécies nativas (CUNHA BASTOS et al., 1989; SILVA et al., 1993; BAINY et al., 1999; RABITTO et al., 2005).

O ambiente aquático é um meio invariavelmente atingido pelos poluentes ambientais. Isso pode ocorrer pela sua evaporação e posterior precipitação com as chuvas ou pelo escoamento ou despejo direto de efluentes em corpos d'água. A agricultura representa uma fonte importante de poluição aquática, tanto pelo escoamento dos pesticidas e fertilizantes nos rios como pela percolação desses na água subterrânea (THOMPSON et al., 1995).

Dentre os pesticidas usados na agricultura e saúde pública, o grupo dos organoclorados tem sofrido várias restrições. O uso de muitos deles foi proibido devido a sua alta persistência no ambiente e efeitos deletérios em espécies não-alvo. O endosulfano tem uso liberado em vários países devido a sua baixa persistência no ambiente em

comparação aos demais compostos organoclorados (DEVI et al., 1981; NAQVI; VAISHNAVI, 1993). Devi et al. (1981) afirmam que, apesar do endosulfano ser um pesticida seguro, ele pode causar sérios problemas no ambiente aquático. É unânime entre diversos autores a opinião de que a toxicidade para organismos aquáticos é extremamente elevada, principalmente para peixes (DEVI et al., 1981, NAQVI; VAISHNAVI, 1993; JOHNSON; WALLACE, 1987, JONSSON; TOLEDO, 1993).

A acetilcolina (Ach) é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo. É encontrada em gânglios autonômicos, junções neuroefetoras parassimpáticas e neuromusculares somáticas, na medula adrenal e também no SNC. Uma vez liberada na fenda sináptica, a Ach interage com receptores exercendo seus efeitos fisiológicos (ADAMS, 1992). A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da Ach, regulando a transmissão do impulso nervoso (ADAMS, 1992; GALGANI et al., 1992). A atividade da acetilcolinesterase é conhecida por ser inibida por pesticidas organofosforados e carbamatos (STURM et al., 2000, OLIVEIRA RIBEIRO; SILVA DE ASSIS, 2005). Estudos comprovam que essa enzima pode ser inibida por outros poluentes como metais pesados, hidrocarbonetos e mesmo o endosulfano (ZINKL et al., 1991; PAYNE et al., 1996; DIAMANTINO et al., 2000). Porém, a capacidade do endosulfano em causar inibição da acetilcolinesterase é tema de controvérsia na literatura (INBARAJ; HAIDER, 1988; GILL et al., 1990; NAQVI; VAISHNAVI, 1993; PAUL et al., 1994; MALLIK et al., 2000).

A medida da inibição da acetilcolinesterase é amplamente aceita como método diagnóstico de exposição a agentes anticolinesterásicos em vertebrados (STANSLEY, 1993). Desde a década de 1950, os efeitos dos anticolinesterásicos vêm sendo estudados em organismos não intencionalmente expostos, particularmente os peixes (WEISS, 1958; ABOU-DONIA; MENZEL, 1967; MAGNOTTI et al., 1994; STURM et al., 1999). Por este motivo, a AchE pode ser considerada um dos mais antigos biomarcadores em peixes (STURM, 2000).

Variações específicas de atividade enzimática são inúmeras e a viabilidade do uso da AchE como biomarcador de poluição aquática depende da sua caracterização nas diferentes espécies (LUNDIN, 1962; JOHNSON; WALLACE, 1987; STURM et al., 1999). Neste trabalho objetivou-se avaliar a atividade acetilcolinesterásica e os efeitos do endossulfano nesta enzima em um peixe nativo, o *Ancistrus multispinnis* (cascudo).

## Material e métodos

Exemplares da espécie *Ancistrus multispinnis* foram coletados no Rio Marumbi no município de Morretes, no estado do Paraná. Fêmeas e machos ( $10,7g \pm 0,75$  (peso  $\pm$  erro padrão)) foram coletados e transportados ao laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR. Os peixes foram acondicionados em aquários de 120 litros e permaneceram por um período mínimo de 20 dias sob condições controladas de fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro), aeração constante e temperatura da água a 25°C.

Um pré-experimento foi realizado com o objetivo de definir uma dose subletal do endossulfano. Os ensaios foram realizados em aquários de 30 litros por 96 horas. Os peixes de cada grupo (10 indivíduos) foram pesados e receberam administração intracelomática do endossulfano (Defensa S.A., Taquari, Brazil grau de pureza 97%) diluído em óleo de girassol, na dose de 40mg/kg (grupo 40), 4mg/kg (grupo 4) e 0,4mg/kg (grupo 0,4). Os peixes do grupo controle receberam apenas o diluente.

Após definida a dose subletal do endossulfano, seis grupos experimentais foram formados. Os peixes de três grupos receberam 4mg/kg do endossulfano e foram sacrificados

juntamente com os controles, após 24, 48 e 96 horas após a administração, respectivamente. Amostras de músculo axial foram coletadas e armazenadas a -20°C até o processamento das análises.

## Análise da atividade acetilcolinesterásica

As amostras de músculo axial de cada peixe (150-250 mg) foram homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato 0,1M pH7,5, com o auxílio do homogeneizador automático Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 10000 x g a 4°C, obtendo assim o sobrenadante, no qual foi medida a atividade da acetilcolinesterase. O sobrenadante foi diluído 1:50 e usado como fonte de enzima. O substrato iodeto de acetiltiocolina foi utilizado a 9 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo método de Ellman (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O método baseia-se na hidrólise do iodeto de acetiltiocolina pela AchE, originando colina, que se combinando com DTNB (5,5' - Ditio-bis-2-nitrobenzoato), produz um composto de coloração amarela. A absorbância foi medida com comprimento de onda de 415nm no espectrofotômetro Sunrise - TECAN.

## Análise de proteína

Para a quantificação de proteína nas amostras foi utilizado o método de Bradford (1976), com curva padrão de soro albumina bovina.

## Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente por Anova de uma via seguida de Prova de Bonferroni para comparação entre os grupos. Nas comparações de dois grupos foi usado o teste-t não pareado seguido da correlação de Welch (correlação do sexo dos animais com a atividade enzimática). A atividade enzimática dos peixes foi correlacionada com o peso e o comprimento, por meio da correlação de Pearson.

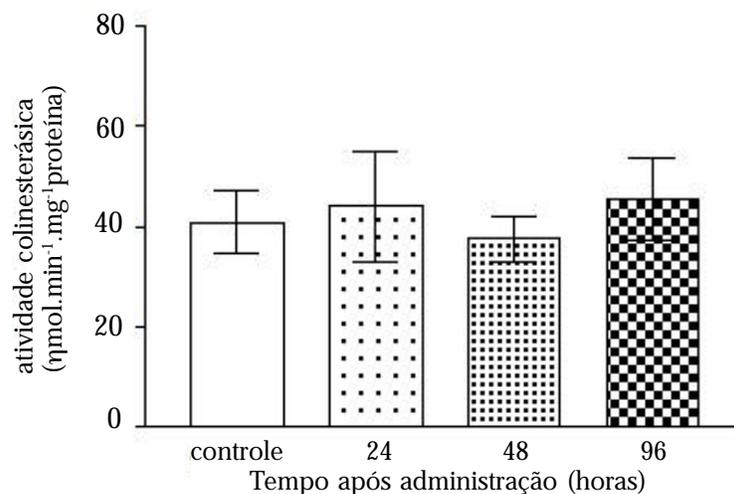
## Resultados e discussão

No pré-experimento, para determinação de uma dose subletal, foram observadas alterações comportamentais nos peixes do grupo 40 mg/kg (grupo 40). Após 24 horas de exposição foi observada hiperexcitação, extensões repetidas das nadadeiras seguidas de natação rápida e incapacidade de se aderirem à parede do aquário, comportamento não observado nos outros grupos. Após 96 horas todos os peixes do grupo 40 morreram. No grupo 4 os animais estavam mais ativos, porém após 48 horas nenhuma alteração comportamental foi observada. No grupo 0,4 não foram observadas alterações comportamentais.

A dose de 4 mg/kg de endossulfano foi escolhida para os estudos dos efeitos deste composto sobre a acetilcolinesterase. Os resultados obtidos na atividade da acetilcolinesterase estão mostrados na Figura 1. A atividade da acetilcolinesterase (média  $\pm$  erro padrão da média) do grupo controle foi  $40,8 \pm 6,3$   $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ . Os grupos de 24, 48 e 96 horas após administração do endossulfano mostraram atividade enzimática de  $34,3 \pm 4,1$ ,  $37,5 \pm 4,4$  e  $38,3 \pm 4,4$   $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ , respectivamente. Como não houve diferença significativa entre os grupos controles durante 24, 48 e 96 horas, os resultados foram colocados em um só grupo. Os resultados mostram que a atividade da acetilcolinesterase de *Ancistrus multispinnis* não foi inibida pelo endossulfano nas condições experimentais.

**FIGURA 1 – Atividade da acetilcolinesterase em *Ancistrus multispinnis* 24, 48 e 96 horas após administração intracelomática de 4mg/kg de endossulfano.**

*Figure 1 - Acetylcholinesterase activity in *Ancistrus multispinnis* 24, 48 and 96 hours after intracelomatic administration of 4mg/Kg of endossulfan.*

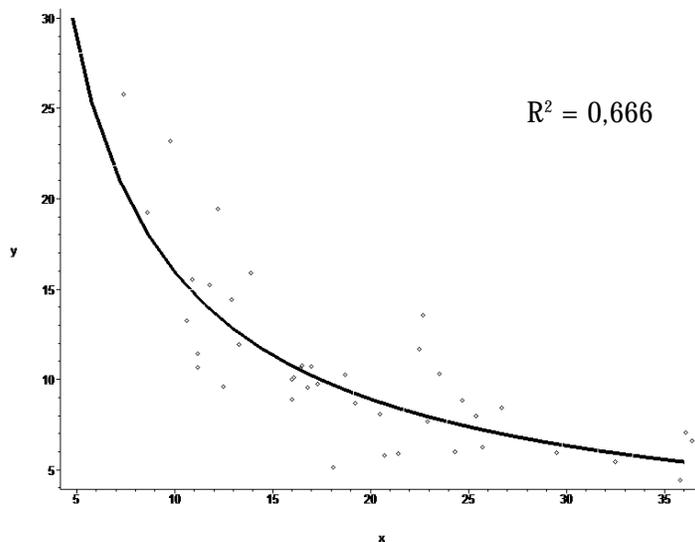


Neste trabalho, a atividade acetilcolinesterásica na espécie *Ancistrus multispinnis* apresentou correlação negativa com o peso e o com-

primento dos peixes estudados (Figura 2 e 3). Não foi observada diferença estatística significativa entre as atividades enzimáticas de machos e fêmeas.

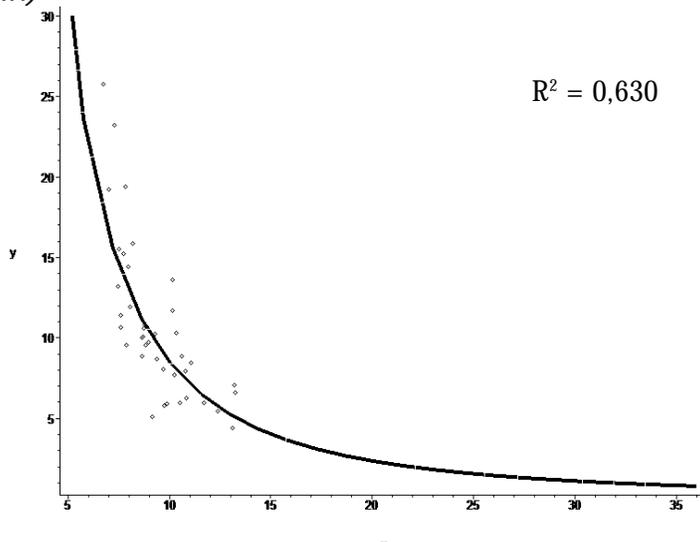
**FIGURA 2 - Correlação entre atividade da acetilcolinesterásica em músculo de cascudos (*Ancistrus multispinnis*) e o peso corporal ( $R^2 = 0,666$ ), em que  $x$  é o peso (g) e  $y$  a atividade da acetilcolinesterase ( $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ )**

Figure 2 - Correlation between muscle acetylcholinesterase activity of "cascudos" (*Ancistrus multispinnis*) and the corporal weight ( $R^2 = 0.666$ ),  $x$  is the weight (g) and  $y$  activity of acetylcholinesterase ( $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$ )



**FIGURA 3 - Correlação entre atividade da acetilcolinesterásica em músculo de cascudos (*Ancistrus multispinnis*) e o comprimento total ( $R^2 = 0,630$ ), em que  $x$  é o comprimento (cm) e  $y$  a atividade da acetilcolinesterase ( $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ )**

Figure 3 - Correlation between muscle acetylcholinesterase activity of "cascudos" (*Ancistrus multispinnis*) and the total length ( $R^2 = 0.630$ ),  $x$  is the lenght (cm) and  $y$  cholinesterasic activity ( $\eta\text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$ )



### Conclusões

O endossulfano como inibidor da acetilcolinesterase é motivo de controvérsia na literatura. Na revisão realizada por Naqvi; Vaishnavi (1993) é citado que o endossulfano causou a inibição da acetilcolinesterase em tecido cerebral de ratas ex-

postas à dose de 4,6 mg/kg/dia via alimento durante 13 semanas. Em ratas expostas à dose de 27,2 mg/kKg/dia pela mesma via e pelo mesmo período foi registrado um declínio da atividade da AchE plasmática. Mallik et al. (2000) avaliaram o efeito da exposição de ratos ao endossulfano por via oral por um período de 30 dias. A atividade da

AchE de tecido cerebral sofreu um incremento nos grupos em tratamento com endossulfano em relação ao grupo controle. No entanto, resultados provenientes de trabalhos com ratos não podem ser simplesmente extrapolados para peixes. Sabe-se que colinesterases de peixes apresentam peculiaridades em relação a colinesterases de vertebrados superiores (MAGNOTTI et al., 1994; STURM, 2000). É reportado por Lundin (1962) que atividades enzimáticas bastante altas têm sido relatadas para peixes, excedendo bastante os valores encontrados em mamíferos.

O endossulfano não causou redução significativa da atividade da AchE cerebral na espécie de peixe *Channa punctatus*, num trabalho que comparou os efeitos desse composto e do organofosforado malation. O composto organofosforado, por sua vez, causou inibição dose-dependente da atividade da AchE no cérebro (INBARAJ; HAIDER, 1988). Gill et al. (1990), estudando os efeitos do endossulfano, de organofosforado e de carbamato sobre a modulação enzimática em tecidos do peixe *Puntius conchonius*, observaram que o endossulfano causou inibição da AchE em tecido cerebral e indução desta enzima em músculo esquelético e no fígado. Os autores atribuíram esta indução à pseudocolinesterase, enzima sintetizada no fígado.

Apesar de não ter sido observada inibição da atividade acetilcolinesterásica nas doses e nos tempos de exposição avaliados neste trabalho, o comportamento dos peixes observado no pré-experimento ao endossulfano sugere a ocorrência de efeito neurotóxico. Estas alterações comportamentais podem ser decorrentes de um mecanismo de ação já conhecido do endossulfano, que é o bloqueio da ação do neurotransmissor inibitório ácido gama amino butírico (GABA) (BRADBURY, 1991, SALEH et al., 1993, CARLSON et al., 1998). Este bloqueio ocorre pela ligação do endossulfano, assim como de outros compostos do grupo dos ciclodienos, ao sítio de ligação da picrotoxina nos receptores GABA<sub>A</sub>, que são canais de cloro regulados pela ligação do GABA (COATS, 1990). Com a redução do influxo de íons Cl<sup>-</sup>, o limiar para despolarização é diminuído, resultando em hiperexcitabilidade.

Na espécie *Gasterosteus aculeatus*, Sturm et al. (2000) não observaram diferença na atividade acetilcolinesterásica entre machos e fê-

meas. Kirby et al. (2000) igualmente não encontraram variações entre os sexos na espécie *Platichthys flesus*, assim como outros autores (HOGAN, 1970). Em relação ao comprimento dos peixes, resultados semelhantes foram encontrados por Lundin (1962), que avaliou a atividade colinesterásica em diversos peixes, tanto de água doce como de água salgada. O autor concluiu que a atividade acetilcolinesterásica muscular esquelética obedeceu a uma relação inversa do comprimento corporal das espécies por ele investigadas. Da mesma forma, Kirby et al. (2000) encontraram resultados semelhantes, com a particularidade de que a correlação negativa da atividade acetilcolinesterásica com o comprimento dos peixes foi mais evidente em machos. É importante notar que a variação de comprimento experimentada naquele trabalho foi pequena, reduzindo a confiabilidade em tal resultado.

Correlação negativa também foi observada por Sturm (1999) entre a atividade acetilcolinesterásica e peso e comprimento corporal de peixes da espécie *Gasterosteus aculeatus*, corroborando dados do presente trabalho.

As correlações negativas encontradas podem ser explicadas porque as colinesterases parecem ser formadas em taxas mais elevadas nas fases iniciais de desenvolvimento. Uma atividade máxima é atingida após um determinado período depois do qual a diminuição contínua da atividade enzimática passa a acompanhar, progressivamente, o aumento do tecido muscular (SAWYER, 1943; 1944). Diferença na atividade acetilcolinesterásica devida ao sexo parece não ser comum em peixes (GALGANI et al., 1992; STURM, 2000). Os resultados do presente trabalho estão em concordância com esta afirmação, uma vez que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a atividade enzimática da acetilcolinesterase de machos e fêmeas.

Os resultados encontrados neste trabalho se tornam relevantes no desenvolvimento de programas de monitoramento ambiental, onde é necessária a comparação de atividade acetilcolinesterásica de peixes coletados em diferentes locais e em diferentes estações do ano. Para aumentar a confiabilidade dos resultados é importante que sejam coletados peixes com pesos e comprimentos semelhantes para evitar erros de interpretação dos resultados.

## Referências

- ABOU-DONIA, M. B.; MENZEL, D. B. Fish brain cholinesterase: its inhibition by carbamates and automatic assay. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 21, p. 99-108, 1967.
- ADAMS, H. R. Drogas que Atuam Sobre os Sistemas Nervosos Somático e Autonômico. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 57-109.
- BAINY, A. C. D.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. **Aquatic Toxicology**, v. 44, p. 289-305, 1999.
- BRADBURY, S. P. et al. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 4. Central nervous system seizure agents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 10, p. 115-131, 1991.
- 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, p. 248-254, 1976.
- CARLSON, R. W. et al. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka and endosulfan on brain acetylcholinesterase and ovarian steroidogenesis of *Chana punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 16, p. 123-128, 1998.
- COATS, J. R. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 255-262, 1990.
- CUNHA BASTOS, J. et al. Drug Metabolism Components in Liver Microsomes From Benthic Fish (Cascudo). **Comparative Biochemical Physiology**, v. 94C, n. 2, p. 683-689, 1989.
- DEVI, A. P. et al. Relative toxicity of the technical Grade material, isomers and formulations of endosulfan to the fish *Channa punctata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, p. 239-243, 1981.
- DIAMANTINO, T. C. et al. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* straus evaluated in acute, chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 253-259, 2000.
- ELLMAN, G. L. et al. new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- GALGANI, F.; BOCQUENÉ, G.; CADIOU, Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, p. 72-82, 1992.
- GILL, T. S.; JAISHREE, P.; TEWARI, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 38, p. 231-244, 1990.
- HOGAN, J. W. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 347-352, 1970.
- INBARAJ, R. M.; HAIDER, S. Effect of malathion and endosulfan on brain acetylcholinesterase and ovarian steroidogenesis of *Chana punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 16, n. 2, p. 123-128, 1988.
- JOHNSON, J. A.; WALLACE, K. B. Species-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase by paraoxon and malation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 88, p. 234-24, 1987.
- JONSSON, C. M.; TOLEDO, M. C. F. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish yellow tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 572-577, 1993.
- KIRBY, M. F. et al. The use of cholinesterase 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.
- LUNDIN, S. J. Comparative studies of cholinesterases in body muscles of fish. **Journal of Cellular Comparative Physiology**, v. 59, p. 93-105, 1962.
- MAGNOTTI JR., R. A.; ZAINO, J. P.; McCONNEL, R. S. Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 108C, n. 2, p. 187-194, 1994.

- MALLIK, S. et al. Effects of endosulfan upon succinic dehydrogenase and cholinesterase activity in brain tissue of albino rats. **Indian Veterinary Medical Journal**, v. 24, p. 207-210, 2000.
- NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 105C, p. 347-361, 1993.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. AChE inhibition as a biomarker for pollutants contamination in tropical aquatic ecosystems. In: PARVEEN, M.; KUMAR, S. (Eds). **Recent Trends in the Acetylcholinesterase System**. Netherlands:[s.n.], 2005. p.103-124.
- PAUL, V.; BALASUBRAMANIAM, E.; KAZI, M. The neurobehavioral toxicity of endosulfan in rats: A serotonergic involvement in learning impairment. **European Journal of Pharmacology**, v. 270, p. 1-7, 1994.
- PAYNE, J. F. et al. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 225-231, 1996.
- RABITTO, I. S. et al. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 147-156, 2005.
- SALEH, M. A. et al. Gamma aminobutyric acid radioreceptor-assay a possible biomarker for human exposure to certain agrochemicals. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. v. 28, p. 687-699, 1993.
- SAWYER, C. H. Cholinesterase and the behavior problem in *Amblystoma*. III. The distribution of cholinesterase in nerve and muscle throughout development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 94, p. 1-31, 1943.
- SAWYER, C. H. Nature of the early somatic movements in *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Cellular Comparative Physiology**, v. 24, p. 71-84, 1944.
- SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Berlin, 1998. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Técnica de Berlin, 1998.
- SILVA, H. C. et al. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl Parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces, Teleostei). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.105C, p. 197-201, 1993.
- STANLEY, W. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 25, p. 315-321, 1993.
- 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, p. 389-398, 1999.
- STURM, A. et al. Different sensitivity to organophosphates of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase from Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 1607-1615, 2000.
- THOMPSON, H. M.; LANGTON, S. D.; HART, A. D. M. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife: a biochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.111C, p.1-12, 1995.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B.** Principles of ecotoxicology. **Bristol: Taylor & Francis, 1996.**
- WEISS, C. M. Stream Pollution: response of fish to sub-lethal exposures of organic phosphorus insecticides. In: ANNUAL MEETING FEDERATION OF SEWAGE AND INDUSTRIAL WASTES, 31<sup>st</sup>. Detroit, 1958. **Proceedings...** Detroit. 1958. v. 31, n. 5.
- ZINKL, J. G. et al. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: **Cholinesterase inhibiting insecticides**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 233-254.

Recebido em: 28/04/2005

Aprovado em: 30/09/2005