



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Laís Gonçalves Bessa Rego

**Susceptibilidade de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), sob
hipoxia aos agrotóxicos organofosforados**

Rio de Janeiro

2012

Laís Gonçalves Bessa Rego

Susceptibilidade de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), sob hipoxia aos agrotóxicos organofosforados



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R343 Rego, Laís Gonçalves Bessa.
Susceptibilidade de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), sob hipoxia aos agrotóxicos organofosforados / Laís Gonçalves Bessa Rego. - 2012. 56 f. : il.

Orientador: Jayme da Cunha Bastos Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. Anoxemia. 2. Carboxilesterase - Teses. 3. Inseticidas organofosforados - Teses. 4. Pacu (Peixe) – Teses. 5. Peixe - Efeito dos pesticidas – Teses. 6. Acetilcolinesterase - Teses. I. Bastos Neto, Jayme da Cunha. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 632.95.024:597.554.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Laís Gonçalves Bessa Rego

Susceptibilidade de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), sob hipoxia aos agrotóxicos organofosforados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 08 de fevereiro de 2012.

Orientador: Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Correa Atella
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Andrea Viviana Waichman
Universidade Federal do Amazonas

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Para meus pais Luís Carlos e Genilda, que são meus exemplos e meus heróis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais e meu irmão Victor por sempre me apoiarem em tudo e serem meu alicerce.

Agradeço ao Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto pela orientação, pela paciência e principalmente pela amizade e apoio.

À Prof. Dr.^a Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos pela amizade, apoio e participação intelectual no trabalho.

Aos amigos Aline Simões Fraga, Rafael Dantas e Frederico Freire Bastos pelos conselhos e amizade.

Aos amigos Santiago Tobar, Daphne Wrobel, Carlucio dos Santos e Arthur Pedro pelo apoio e colaboração.

Aos amigos Eduardo Santos Silva e Bruna Righi pela amizade, paciência e importante ajuda nos experimentos.

Ao Lin pela ajuda no laboratório.

Ao Prof. Roosevelt Dias pelos conselhos.

As amigas Carol Bastos, Carol Quaresma, Aline, Grazi, Paulinha, Natália, Raquel e Suellen pelo constante apoio durante essa trajetória.

Ao meu namorado Thiago Sillos pelo amor, carinho e principalmente paciência nos momentos de estresse.

RESUMO

REGO, Laís Gonçalves Bessa. *Susceptibilidade de pacus, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887), sob hipoxia aos agrotóxicos organofosforados*. 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A ação inibitória dos organofosforados sobre as esterases, por ser específica, pode ser empregada como um eficiente biomarcador da exposição de seres vivos aos organofosforados. A inibição da acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) provoca acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas colinérgicas, o que pode resultar na morte do indivíduo. Outra atividade também afetada por organofosforados é a da enzima carboxilesterase (CarbE; EC 3.1.1.1). CarbE estão envolvidas na fase I da biotransformação de xenobióticos e atuam como captadoras (“scavengers”) de organofosfatos, incluindo os formados pela biotransformação dos organofosforados. As CarbE estudadas até hoje se ligam com maior velocidade aos organofosfatos do que as colinesterases. Por isto se admite que CarbE possam diminuir, por captação estequiométrica, a ligação tóxica de moléculas de organofosfatos às acetilcolinesterases das sinapses colinérgicas e das placas motoras dos músculos. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a atividade da CarbE está aproximadamente 50% menor no soro e no fígado de pacus submetidos à hipoxia. Por causa disso, em razão de uma possível diminuição da capacidade captadora da CarbE, decidimos verificar se o pacu em hipoxia seria mais sensível aos agrotóxicos organofosforados. Para este propósito foram colocados seis pacus divididos em dois tanques. No primeiro tanque, os animais foram submetidos a 24 horas de hipoxia seguidos por mais 4 horas de exposição ao organofosforado metilparation em duas concentrações diferentes (0,02 ou 0,01 mg / L). No segundo tanque os animais permaneceram em normoxia durante o mesmo período de 24 horas e depois foram expostos ao metilparation como no primeiro tanque. As atividades da AChE ensaiada com acetiltiocolina, a da butirilcolinesterase (BChE) ensaiada com butiriltiocolina e a da CarbE ensaiada com p-nitrofenilacetato foram avaliadas no soro, fígado, cérebro, músculo e coração dos pacus. Houve redução de aproximadamente 35% da atividade de CarbE no soro dos pacus submetidos a 24 horas de hipoxia. Uma queda de 85% na atividade de CarbE do soro foi observada nos animais que sofreram hipoxia e subsequente exposição a 0,02 mg de metilparation por litro. Com metilparation a 0,01 mg/L a diminuição observada foi de 48,2%. No músculo dos pacus expostos a 0,02 mg/L, as atividades de AChE e BChE caíram pela metade quando os mesmos foram submetidos à hipoxia quando comparados a animais que permaneceram em normoxia. Nos diversos tecidos dos pacus expostos a 0,01 mg/L de metilparation não observamos diferenças significativas nas atividades de AChE, BChE ou CarbE. Concluímos que a duplicação da concentração de metilparation de 0,01 para 0,02 mg/L levou à atividade residual de CarbE do soro de 51,8% para 15%. A ausência de mudanças nas atividades das esterases dos tecidos de animais expostos a 0,01 mg/L entre os grupos hipoxia e normoxia deve ter ocorrido porque a concentração de organofosforado não foi suficiente para superar a primeira barreira de proteção das esterases séricas e atingir os tecidos. Mas, no experimento com 0,02 mg/L de metilparation, as inibições de AChE e de BChE no músculo dos animais em hipoxia podem ser explicadas pela diminuição da atividade de CarbE do soro dos pacus.

Palavras-chave: Hipoxia. Carboxilesterase. Organofosforados. Pacu.

ABSTRACT

The inhibitory action of organophosphates on cholinesterases is a specific phenomenon, and it is used as a biomarker of exposure to organophosphate in live animals. Inhibition of cholinesterases results in the accumulation of acetylcholine in the synaptic clefts of cholinergic synapses, which can lead to death. Another enzyme which is affected by organophosphates is the carboxylesterase (CarbE). CarbE are involved in phase I of xenobiotic biotransformation and can act as a "scavenger" of organophosphates. The CarbE studied to the present date can bond to organophosphate with greater speed than other cholinesterases. Therefore, CarbE might decrease by stoichiometric uptake the binding of organophosphate at the acetylcholinesterase at cholinergic synapses and motor end plates of muscles. Experiments conducted in our laboratory showed that the CarbE activity is about 50% lower in serum and liver of pacu subjected to hypoxia. Due to the detoxifying role of CarbE we verified whether pacu, under conditions of oxidative stress, would be more sensitive to organophosphate pesticides. Nine pacus were divided into two tanks. In the first tank the animals underwent 24 hours of hypoxia followed by a further 4 hours of exposure to methylparathion in two different concentrations (0,02 or 0,01 mg/L). Thus, in the second tank the animals remained in normoxia for 24 hours and were subsequently exposed to methylparathion for 4 hours. The activities of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and CarbE were tested in serum, liver, brain, muscle and heart. We found a decrease of approximately 35% of CarbE activity in serum of the animals subjected to 24 hours of hypoxia. A fall of 85% in CarbE activity was detected in the serum of animals that suffered hypoxia and subsequent exposure to 0,02 mg/L, yet in animals exposed to 0,01 mg/L there is a decrease of 48,2%. In muscle the activities of AChE and BChE declined by half in animals submitted to hypoxia compared with animals in normoxia when exposed to 0,02 mg/L. In the tissues of pacus exposed to 0,01 mg/L of methylparathion we did not observe significant differences in the activities of AChE, BChE or CarbE. We concluded that doubling the concentration of methylparathion from 0,01 to 0,02 mg/L causes CarbE activity in the serum to decrease from 51,8% to 15%. The absence of changes in activities in the tissues of animals exposed to 0,01 mg/L between the groups hypoxia and normoxia may have occurred because the concentration of methylparathion was not sufficient to break the first enzymes barrier of protection in serum. In the experiment with 0,02 mg/L of methylparathion the activities of AChE and BChE in the muscle were most inhibited in the hypoxia group than the normoxia group. This phenomenon can be explained by the decrease in the CarbE activity in the serum of animals under hypoxia.

Keywords: Hypoxia. Carboxylesterase. Organophosphates. Pacu.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura geral dos organofosforados.....	17
Figura 2 –	Fórmula molecular do Sarin.....	18
Figura 3 –	Fórmulas estruturais planas do etilparation e do metilparation.....	18
Figura 4 –	Etapas da biotransformação.....	20
Figura 5 –	Dessulfuração oxidante responsável pela ativação do metilparation....	21
Figura 6 –	Fórmula estrutural plana da acetilcolina, um éster de ácido acético e colina.	22
Figura 7 –	Hidrólise enzimática do neurotransmissor acetilcolina. A reação é catalisada pela AChE.	22
Figura 8 –	Eventos da transmissão colinérgica.....	23
Figura 9 –	Hidrólise da acetilcolina catalisada pela AChE.....	25
Figura 10 –	Inibição de serino-hidrolases pelo organofosfato metilparaaxon.....	27
Figura 11 –	Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos.....	29
Figura 12 –	Liberação de β -glicuronidase (β G) de hepatócitos para o sangue em consequência de administração de organofosforado (OP).....	30
Figura 13 –	<i>Piaractus mesopotamicus</i> , conhecido como Pacu.	31
Figura 14 –	Atividade de CarbE em soro de pacus submetidos a hipoxia (n = 9) ou normoxia (n = 9) durante 24 horas, seguidas por mais 4 horas de exposição a metilparation (0,02 mg/L).....	39
Figura 15 –	Atividade de CarbE em soro de pacus submetidos a hipoxia (n = 9) ou normoxia (n = 9) durante 24 horas, seguidas de mais 4 horas de exposição a metilparation (0,01 mg/L).....	40
Figura 16 –	Atividade residual de CarbE em soro de pacus submetidos a diferentes concentrações de oxigênio e metilparation.....	41
Figura 17 –	Atividade de AChE de músculo de pacus controle (n = 4), normoxia + metilparation (n = 9) e hipoxia + metilparation (n = 5).....	42

Figura 18 - Atividade de BChE de músculo de pacus controle (n = 4), hipoxia + metilparation (n = 5) e normoxia + metilparation (n = 9)..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Vendas totais de venenos agrícolas por tipo no Brasil: 2003 a 2007 em milhão de dólares.	16
Tabela 2 –	Classificação das esterases segundo a interação com organofosfatos e especificidade de substrato. Fonte: HAYES, 1994.	24
Tabela 3 –	Atividade de AChE nos tecidos de pacus controle e expostos a 0,01 mg/L de metilparation. A atividade está expressa em U.mg-1 de proteínas nos tecidos ou U.mL-1 no soro.	44
Tabela 4 –	Atividade de BChE nos tecidos de pacus controle e expostos a 0,01 mg/L de metilparation. A atividade está expressa em U.mg-1 de proteínas nos tecidos ou U.mL-1 no soro.	44
Tabela 5 –	Atividade de CarbE nos tecidos de pacus controle e expostos a 0,01 mg/L de metilparation. A atividade está expressa em U.mg-1 de proteínas.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ASCho	Acetiltiocolina
ACh	Acetilcolina
AcCoA	Acetilcoenzima A
Asp	Ácido aspartato
BChE	Butirilcolinesterase
BSCho	Butiriltiocolina
BW284C51	1,5-bis(alildimetilamoniofenil)pentan-3-one dibrometo
CAT	Colina acetiltransferase
CarbE	Carboxilesterase
ChE	Colinesterase
CoA	Coenzima A
CYP	Citocromo P-450
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico]
Ecotiofato	2-dietoxfosforilsulfaniletil-trimetil-amonio iodeto
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
Eserina	8-trimetil- pirrolo [2,3] indol-5-il <i>N</i> -metilcarbamato
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina
K_M	Constante aparente de Michaelis-Menten
Leu	Leucina
Lis	Lisina
p-NPA	p-nitrofenilacetato
O	Oxigênio
S	Enxofre
Se	Selênio
Ser	Serina
TEPP	tetraetilpirofosfato

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Agrotóxicos	15
1.1.1	<u>Agrotóxicos Organofosforados</u>	16
1.2	Biotransformação	19
1.3	Sinapse colinérgica	21
1.4	Esterases	23
1.4.1	<u>Colinesterases</u>	24
1.4.2	<u>Carboxilesterases</u>	28
1.5	Animal de estudo	31
1.5.1	<u>Hipoxia</u>	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Animais	35
3.2	Equipamentos e reagentes	35
3.2.1	<u>Equipamentos</u>	35
3.2.2	<u>Reagentes</u>	35
3.3	Experimento de hipoxia	36
3.4	Preparo de soro	36
3.5	Preparo dos homogeneizados teciduais e dosagem de proteínas	37
3.6	Ensaio enzimático	37
3.7	Análises estatísticas	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Atividade de CarbE no soro	39
4.2	Inibição da atividade esterásica nos tecidos	41
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da história o Homem usa a água como destino final de quase todos os resíduos provenientes de suas atividades. Atualmente, os lançamentos vão desde esgoto doméstico até metais pesados como o chumbo, mercúrio e cádmio. Com os recursos naturais cada vez mais limitados e com o evidente impacto negativo das ações humanas sobre o meio ambiente, é necessário estudarmos cada vez mais a poluição das águas e seus efeitos sobre a fauna aquática.

Dentre os principais poluentes dos recursos hídricos estão os organofosforados; compostos derivados do ácido fosfórico, frequentemente usados em lavouras e pisciculturas como agrotóxicos para combater pragas. Sua utilização como pesticida aumentou ao longo dos anos o que contribuiu para a poluição dos recursos hídricos.

Os organofosforados são largamente utilizados devido à propriedade de se degradarem rapidamente no ambiente depois de aplicados. Entretanto, esses compostos são rapidamente biotransformados *in vivo* por isoformas de citocromo P-450 (CYP) para a sua forma ativa de organofosfato, ou forma oxon, a qual é capaz de produzir efeitos danosos nos organismos vivos não alvos (CASARETT & DOULL, 2008).

A ação inibitória dos organofosfatos sobre as colinesterases é um fenômeno bastante específico, sendo possível empregá-la como ferramenta biomarcadora da exposição de seres vivos aos organofosforados (HELFRICH *et al.*, 1996). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh), que é a molécula neurotransmissora dos neurônios colinérgicos e das placas motoras (DIGGLE & GAGE, 1951; JOKANOVIC, 2001). Sua inibição resulta no acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas, o que desencadeia uma série de eventos que podem levar a morte do indivíduo.

Outra atividade, também afetada por organofosforados, é a das carboxilesterases (CarbE). As CarbE, assim como as colinesterases, são serino-esterases que hidrolisam com grande eficiência moléculas que contêm grupos éster, amida ou tioéster. Ao contrário das AChE, as CarbE não hidrolisam o neurotransmissor acetilcolina. CarbE estão envolvidas na homeostase do colesterol, são importantes enzimas da fase I da biotransformação de xenobióticos e atuam como “scavengers” de organofosforados. As CarbE estudadas até hoje se ligam com maior velocidade aos organofosforados do que as colinesterases (GAUSTAD *et al.*, 1991). Por isto se admite que numerosas CarbE presentes em tecidos vivos possam

diminuir, por captação estequiométrica, a inibição tóxica de organofosforados tanto das AChE das sinapses colinérgicas como das placas motoras dos músculos (DOCTOR *et al.*, 1993).

Uma vez que as serino-esterases plasmáticas podem proteger ratos e outros animais contra agrotóxicos, consideramos que elas também podem ser de grande importância para a sobrevivência dos peixes às novas pressões poluidoras que estão sendo introduzidas nos ambientes aquáticos. Sendo assim, o peixe é um bom modelo de estudo dos organofosforados sobre a fauna aquática. Além disso, é importante estudar a bioquímica de desintoxicação desses animais por ocuparem diversos níveis na cadeia trófica, serem adaptados às variações bruscas no ambiente e, principalmente, devido a sua importância econômica.

Além da contaminação por despejos industriais e orgânicos, que podem conter os organofosforados, outra pressão ambiental que os peixes sofrem é a variação dos níveis de oxigênio dissolvido na água. Em alguns biomas essa variação é muito maior em comparação com outros, como é o caso das águas continentais em relação à água dos oceanos que têm a concentração de oxigênio praticamente estável.

Um importante bioma que sofre com as variações de oxigênio na água é o Pantanal Mato-Grossense. O Pantanal é uma das mais importantes e ainda conservadas áreas úmidas do mundo. Nele ocorre um fenômeno chamado pulso de inundação (JUNK *et al.*, 1989). O pulso de inundação se caracteriza pelo alagamento de boa parte da superfície pantaneira no verão, e quando da menor pluviosidade do período do inverno, pelo escoamento lento, que resulta na formação de extensas lagoas.

O fenômeno de pulso de inundação pode muitas vezes levar o ambiente aquático a um estado de hipoxia. Um ambiente aquático está em hipoxia quando a concentração de oxigênio dissolvido é menor do que 2,8 mg/L (DIAZ & ROSENBERG, 1995). A hipoxia pode ser um fenômeno natural derivado da estratificação térmica ou, como vem ocorrendo nos últimos anos, causado pela ação antrópica através da entrada de matéria orgânica na água. Sendo assim, a hipoxia é um fenômeno que afeta as águas de todo o mundo.

O Pantanal também tem sofrido com o uso excessivo de agrotóxicos aplicados nas áreas de cultivo que circundam a planície pantaneira, bem como nas áreas da própria planície (como no Pantanal do rio Miranda). Segundo Calheiros *et al.* (2008) foram encontrados piretroides, organoclorados e outras substâncias, como organofosforados, nas águas e sedimentos do Pantanal.

Um peixe neotropical e típico do Pantanal é o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). O *Piaractus mesopotamicus*, nosso animal de estudo, é uma espécie de peixe neotropical migratória encontrada nas bacias dos rios Paraná e Paraguai no Pantanal.

Essa espécie pertence à ordem Caraciforme que inclui uma variedade de peixes que vivem na África e América. São usados na aquicultura e são importantes para o consumo. Adaptações morfológicas e fisiológicas permitem a alguns caraciformes sobreviverem em condições extremas de altas e baixas concentrações de oxigênio que ocorrem durante o pulso de inundação do pantanal.

Experimentos realizados em nosso laboratório com o pacu mostraram que a atividade da CarbE foi aproximadamente 50% menor no soro e no fígado de animais submetidos à hipoxia (SILVA, 2009). Tendo em vista esses fatos, e devido ao papel desintoxicante da CarbE, propusemos verificar se o pacu, em condições de estresse oxidativo, seria mais sensível aos agrotóxicos organofosforados.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Agrotóxicos

Existem documentos históricos que comprovam a utilização de agrotóxicos desde 1500 a.C. As civilizações Grega e Chinesa já utilizavam algumas substâncias químicas como pó de enxofre e arsênico no controle das pragas de suas plantações. Porém, no começo do século XX houve a necessidade de buscar produtos mais eficientes e ocorreu a introdução dos primeiros produtos orgânicos com a finalidade de agir como agrotóxicos, a exemplo do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Colocado no mercado em 1942, o DDT trouxe um imenso benefício para a economia agrícola e para a saúde pública devido a sua ação contra vetores de várias doenças. A malária foi muito diminuída então com o uso de DDT. Devido a sua ação benéfica para a saúde pública na época o DDT rendeu a seu criador, Mueller, o Nobel de medicina em 1948. Porém, no meado dos anos 70, quando a comunidade científica passou a conhecer melhor a bioquímica dos organoclorados, sua ação bioacumuladora no ambiente e seus efeitos nocivos para a saúde humana, o DDT foi proibido (CASARETT & DOULL, 2008). Com isso, os organoclorados foram gradativamente substituídos por agrotóxicos inibidores de acetilcolinesterase, como os organofosforados e os carbamatos (VEIGA *et al.*, 2006). Atualmente, aproximadamente 1.500 produtos químicos são adicionados anualmente no mercado, e estima-se que 11.000 deles já existam em quantidades suficientes para ameaçar o ecossistema. Sem dúvida, dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil estão os organofosforados (MENTEM, 2008). O Brasil é o terceiro maior mercado de agrotóxicos do mundo. Porém em 2008 o país movimentou 7,7 bilhões de dólares contra 6,6 bilhões do segundo colocado, os EUA (PACHECO, 2009). Em 2010 foi o melhor ano de vendas da história do setor, em que foi registrado um aumento de 9% das vendas em relação a 2009 (SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2011). Na tabela 1 encontramos as vendas totais de agrotóxicos por tipo no Brasil no período de 2003 a 2007.

Tabela 1. Vendas totais de venenos agrícolas por tipo no Brasil: 2003 a 2007 em milhão de dólares.

Classes	2003	2004	2005	2006	2007
Herbicidas	1.523,7	1.830,7	1.735,8	1.674,3	2.304,1
Fungicidas	713,5	1.388,2	1.089,5	917,4	1.264,4
Inseticidas	725,2	1.066,6	1.180,7	1.128,9	1.537,4
Acaricidas	80,0	78,0	82,8	70,4	92,1
Outros	93,8	131,5	155,0	128,8	174,0
Total	3.136,3	4.494,9	4.234,7	3.919,8	5.372,0

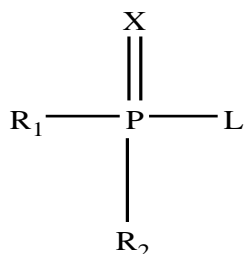
Fonte: MENTEM, 2008.

Esses valores representam a aplicação de 734 milhões de toneladas de venenos usados na agricultura brasileira (MENTEM, 2008). Os restos de tais substâncias acabam no solo, na água, no ar e nos alimentos produzidos. Caldas & Souza (2000) analisaram a dieta da população de onze regiões metropolitanas do país, incluindo o Rio de Janeiro. Identificaram 23 compostos presentes em alimentos da dieta brasileira acima dos níveis permitidos e, portanto, um risco em potencial à saúde do consumidor. Dezesesseis dos 23 compostos eram agrotóxicos organofosforados, dentre eles, o metilparaoxon.

1.1.1 Agrotóxicos Organofosforados

Organofosforados são compostos orgânicos que contêm um átomo de fósforo em sua estrutura química. Na sua maioria são derivados do ácido fosfórico ou do ácido tiofosfórico. Dependendo da configuração dos átomos de oxigênio ou enxofre (FIGURA 1), vários grupos principais de organofosforados podem ser distinguidos: fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos, S-alquilfosforotioatos, S-alquilfosforoditioatos, fosfonotioatos, fosfonoditioatos e fosforoamidatos (Santos, parte I, 2002).

São amplamente utilizados como inseticidas e, em menor extensão, como herbicidas. Eles também possuem outros nomes comuns: fosfatos orgânicos, inseticidas fosforados, inseticidas fosfatos ou pesticidas ésteres do ácido fosfórico.

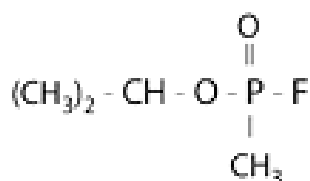


X = O, S ou Se
 R1; R2 = alquil, SR', OR' ou NHR'
 L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos

Figura 1. Estrutura geral dos organofosforados. Fonte: SANTOS *et al.*, 2007.

Foram primeiramente sintetizados em 1937 por um grupo de químicos alemães. Dentre eles destacou-se Gerhard Schrader, químico de uma indústria alemã, o primeiro a descobrir a estrutura química geral dos organofosforados anticolinesterásicos. Também sintetizou o primeiro a ser industrializado, em 1944, o tetraetilpirofosfato (TEPP), mas que teve pouco sucesso devido à sua instabilidade em solução. Schrader também ficou conhecido por sintetizar milhares de moléculas, incluindo o paration que, em 1944, se tornou um dos inseticidas mais conhecidos e comercializados. Gerhard Schrader é considerado o “pai” dos inseticidas organofosforados.

Vários outros compostos mais tóxicos que o paration foram sintetizados, como o sarin, somam e o tabun. Pela sua alta toxicidade acabaram sendo usados pelos nazistas como armas químicas na Segunda Guerra Mundial. Um exemplo bem conhecido é o sarin (FIGURA 2) que também pode ser chamado de “gás dos nervos”. Recentemente ainda ocorreram casos do uso de organofosforados como agentes químicos, a exemplo do atentado no metrô de Tóquio que deixou onze mortos. Mas, felizmente, seus derivados usados hoje na agricultura são cerca de quatro gerações mais desenvolvidos e menos tóxicos, porém milhares de casos de intoxicação acidentais e suicídios ainda são registrados (CASARETT & DOULL, 2008; SANTOS, parte I, 2002).



2-(fluoro-metil-fosforil) oxipropano

Figura 2. Fórmula molecular do Sarin. Fonte: CASARETT & DOULL, 2008.

O etilparation e o metilparation são importantes representantes dos fosforotioatos (FIGURA 3). O metilparation se tornou disponível em 1949 e, desde então, sua utilização cresceu porque se mostrou menos tóxico, tanto para humanos, como para animais domésticos, bem como mais eficiente no controle de insetos do que o etilparation. Um relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) mostrou que aproximadamente 58% de todo agrotóxico consumido pelo Brasil no período de 2000 a 2003 foi o metilparation (MENTEM, 2008).

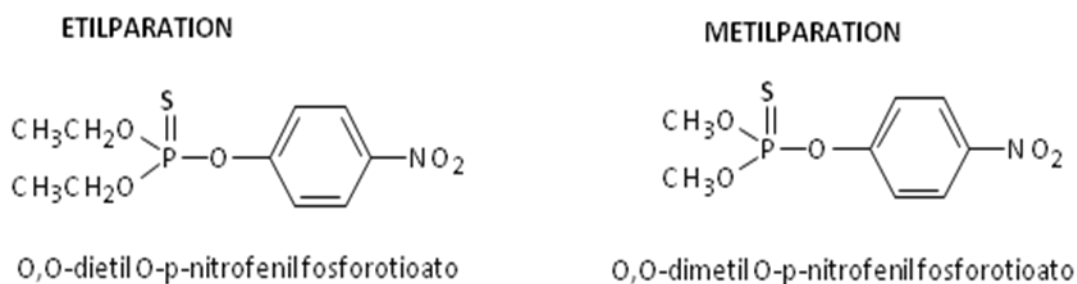


Figura 3. Fórmulas estruturais planas do etilparation e do metilparation.

Existem cerca de 70 tipos de agrotóxicos organofosforados comercializados e várias outras substâncias químicas similares, bem como diversos alvos e vias metabólicas de inibição. Os organofosforados correspondem a mais da metade de todos os inseticidas comercializados no mundo (CASARETT & DOULL, 2008).

Sua ação tóxica é baseada na rápida inibição sobre a acetilcolinesterase que tem como ação fisiológica a degradação do neurotransmissor acetilcolina das sinapses colinérgicas. Com

a acetilcolinesterase inibida há o acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica causando assim uma síndrome colinérgica (RANG *et al.*, 2007). Essa síndrome causa uma superestimulação dos receptores colinérgicos tendo como sintomas um aumento da salivação e suor, secreção bronquial, broncoconstrição, diarreia, tremores e outros efeitos sobre o sistema nervoso. Devido a isso os organofosforados são substâncias extremamente neurotóxicas e, em casos graves de intoxicação acidental ou envenenamento voluntário, podem provocar a morte (CASIDA & QUISTAD, 1998). Por outro lado, em doses menores e controladas os organofosforados são usados no tratamento de doenças neurológicas.

1.2 Biotransformação

Os agrotóxicos depois de absorvidos pelo corpo sofrem um processo de biotransformação. A biotransformação pode ser descrita em duas fases (FIGURA 4), a fase I e a fase II, envolvendo diversas enzimas que catalisam a transformação de compostos lipofílicos em substâncias mais polares para serem excretadas em meio aquoso. A biotransformação nem sempre gera produtos inertes e, em alguns casos, ocorre produção de substâncias ativas que ao interagirem com moléculas intracelulares interferem em reações metabólicas. Sendo assim, a biotransformação pode ser dividida em dois tipos de reações, as de ativação e as de desintoxicação. As reações de ativação são aquelas em que o produto metabólico resulta mais tóxico que o original.

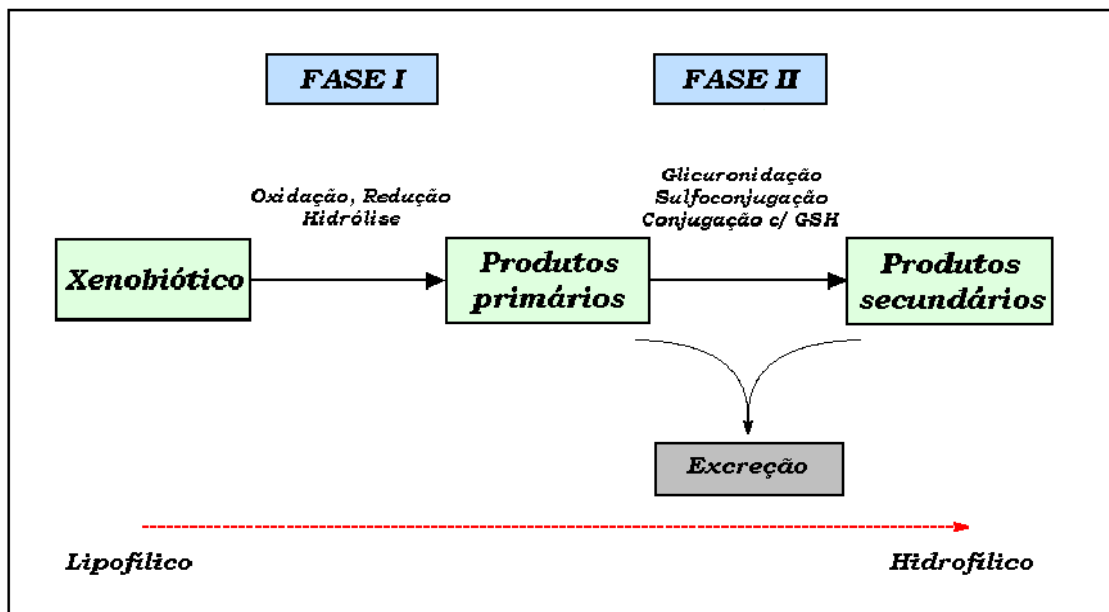


Figura 4. Etapas da biotransformação. A substância de caráter lipofílico deve ser biotransformada num produto mais solúvel em água para ser excretado do organismo. As reações de fase I introduzem ou expõe um grupo funcional. A reação de fase II é a conjugação de produto de fase I ou da própria substância com substâncias endógenas, como por exemplo, a glutatona reduzida (GSH).

Os organofosforados apresentam em sua maioria caráter hidrofóbico, por esta razão são difíceis de serem excretados, o que favorece que sejam tóxicos aos organismos vivos. Sua absorção pode ocorrer pelas vias digestiva, pulmonar e cutânea. Após a absorção as moléculas dos organofosforados passam, em sua maioria, da corrente sanguínea para as células hepáticas (WOLFF *et al.*, 1992; McCracken *et al.*, 1993).

Todos os compostos organofosforados que contém uma ligação entre o enxofre e o fósforo (P=S) sofrem o processo de bioativação. Esse processo consiste na dessulfuração oxidante por citocromos P-450, que levam a formação do “oxon” análogo desses compostos. A forma oxon dos organofosforados é que é altamente tóxica ao organismo.

A bioativação dos organofosforados ocorre principalmente no fígado, mas também pode ocorrer em outros tecidos. Um exemplo conhecido de bioativação é a biotransformação do metilparation em metilparaoxon pelo citocromo P-450 (CASARETT & DOULL, 2008) (FIGURA 5).

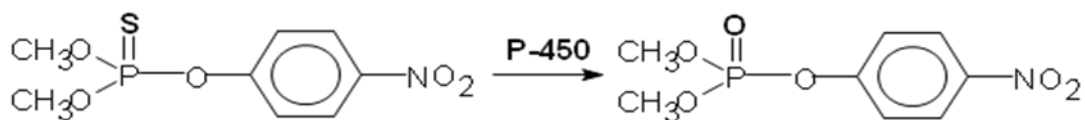


Figura 5. Dessulfuração oxidante responsável pela ativação do metilparation. O grupo P=S do paration é pouco tóxico, mas o grupo P=O de seu oxoanálogo, o metilparaoxon, é muito tóxico porque liga no oxigênio do grupo hidroxila da serina.

A hidrólise não catalítica dos organofosforados também pode ocorrer quando esses compostos fosforilam serino-esterases. Essas serino-esterases são inibidas pelos organofosforados quando os hidrolisam, mas permanecem fosfatadas e não têm atividade catalítica, isto é, seus sítios de catálise, com fosfato ligado, não ligam novas moléculas de organofosfatos (CASARETT & DOULL, 2008). Alguns exemplos dessas enzimas são as CarbE e as colinesterases (ChE, EC 3.1.1). A inibição sobre as colinesterases é um fenômeno de grande importância já que algumas dessas enzimas participam do processo de transmissão de sinal nas sinapses colinérgicas, e sua inibição pode provocar problemas sérios ao organismo, podendo levar à morte (CASARETT & DOULL, 2008).

1.3 Sinapse colinérgica

O neurotransmissor colinérgico acetilcolina (ACh) (FIGURA 6) foi identificado em 1914 por Henry Hallett Dale (1875 – 1968) e foi confirmada sua função como neurotransmissor por Otto Loewi (1873 – 1961) em 1921. Ambos receberam, em 1936, o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina por seus trabalhos (CASARETT & DOULL, 2008).

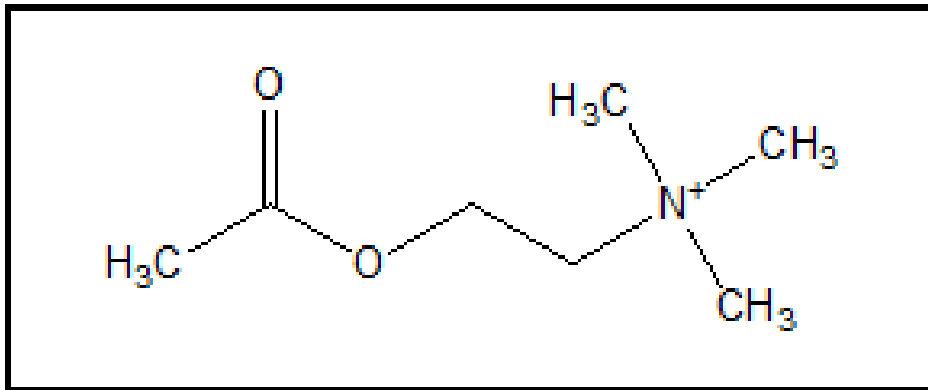


Figura 6. Fórmula estrutural plana da acetilcolina, um éster de ácido acético e colina.

A acetilcolina está presente no Sistema Nervoso Central e no Sistema Nervoso Periférico. Este último engloba o Sistema Nervoso Periférico Autônomo que é o responsável pelo controle da vida vegetativa, ou seja, controla funções como a respiração, circulação do sangue, regulação da temperatura e digestão. Ele também é o principal responsável pela homeostasia do corpo frente às mudanças ambientais.

A AChE é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. O neurotransmissor é liberado nas fendas sinápticas colinérgicas para transmitir o impulso nervoso. Com a liberação da AChE na fenda sináptica ocorre a hidrólise da acetilcolina e assim uma imediata interrupção do estímulo. Devido a isso, a inibição da AChE por pesticidas, com o consequente acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, pode levar o indivíduo à morte. A hidrólise da acetilcolina pela AChE tem como produtos o ácido acético e a colina. A Figura 7 mostra o esquema geral de hidrólise da acetilcolina.

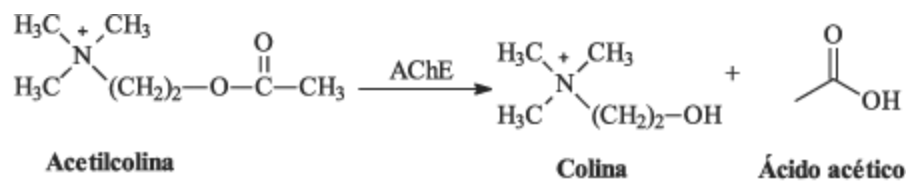


Figura 7. Hidrólise enzimática do neurotransmissor acetilcolina. A reação é catalisada pela AChE.

A AChE se encontra nas terminações nervosas pós-sinápticas e é responsável pela rápida hidrólise da acetilcolina na fenda (RANG *et al.*, 2007). A Figura 8 mostra resumidamente os eventos da transmissão colinérgica.

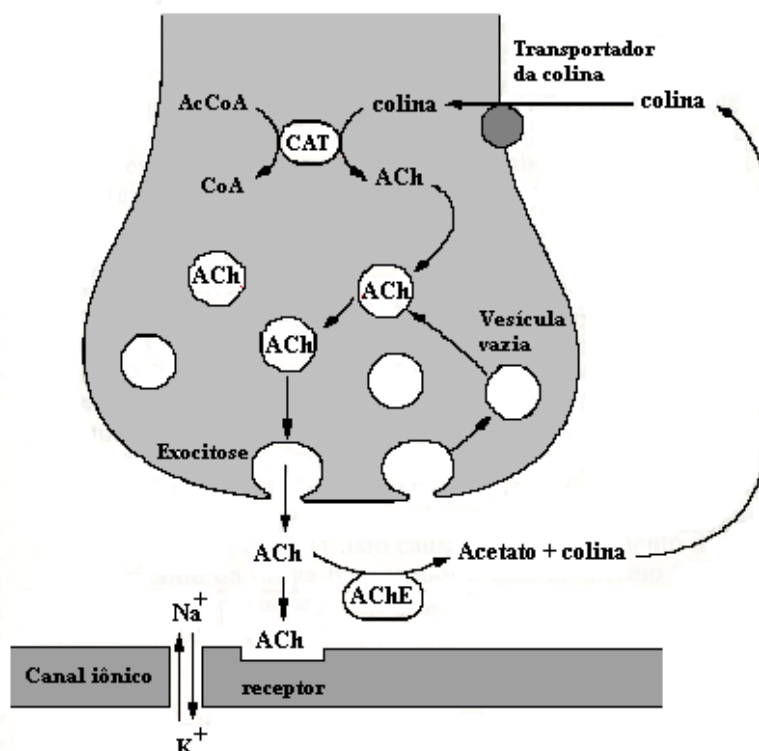


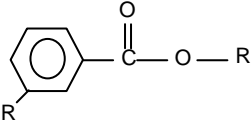
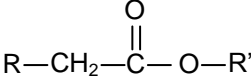
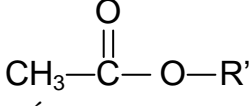
Figura 8. Eventos da transmissão colinérgica. A acetilcolina atua no seu receptor pós-sináptico que controla a abertura e o fechamento de um canal iônico. Legenda: acetilcolinesterase (AChE), acetilcolina (ACh), acetilcoenzima A (AcCoA), coenzima A (CoA) e colina acetiltransferase (CAT). Fonte: Rang *et al.*, 2001.

1.4 Esterases

As esterases são enzimas que hidrolisam ligações do tipo éster produzindo um ácido carboxílico e um álcool agindo sobre uma grande variedade de substratos. São classificadas em A-esterases, B-esterases e C-esterases. Esta classificação foi feita baseada no tipo de grupamento químico que está covalentemente ligado ao carbono da carbonila do grupo éster que será hidrolisado. As A-esterases são um grupo de esterases que preferem como substratos grupos arilas ligados à carbonila dos carboxilésteres. As A-esterases hidrolisam organofosforados. Um exemplo muito conhecido desse grupo de esterases é a paraoxonase (EC 3.1.8.1). As B-esterases preferem substratos com grupamentos alquila ligados à carbonila e são inibidas por organofosforados. Fazem parte deste grupo a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) e as carboxilesterases (CarbE, EC 3.1.1.1). Já as C-esterases preferem ésteres de acetato, isto é, um grupo metil ligado ao carbono da carbonila do éster, não sendo capazes de interagir com organofosforados. A tabela 2 mostra

resumidamente as características de cada grupo de esterases (ALDRIDGE, 1953; MACKNESS *et al.*, 1998; JOKANOVIĆ, 2001).

Tabela 2. Classificação das esterases segundo a interação com organofosfatos e especificidade de substrato.

Esterases	Interação com organofosforados	Substratos	Exemplos
A-esterases (arilesterases)	Substratos	 Éster aromático	Pesticidas organofosfatos e carbamatos
B-esterases (carboxilesterases e colinesterases).	Inibidores	 Éster Alifático	Acetilcolina, succinilcolina, propanidina
C-esterases (acetilesterases)	Nenhuma interação	 Éster de acetato	p-nitrofenilacetato, n-propilcloroacetato

Fonte: HAYES, 1994.

1.4.1 Colinesterases

As colinesterases são enzimas que têm como substrato preferencial ésteres de colina e são inibidas pelo carbamato natural fisostigmina (eserina). São classificadas como B-esterases por serem inibidas por organofosforados. O termo colinesterase foi proposto primeiramente quando Stedman *et al.* (1932) demonstraram que existiam enzimas no soro de cavalo que hidrolisavam os substratos acetilcolina e butirilcolina.

Nos vertebrados em geral existem duas colinesterases, a AChE e a BChE. A BChE é mais encontrada no fígado, do qual é secretada para o sangue, mas também pode ser encontrada no tecido nervoso. A AChE é encontrada na membrana de eritrócitos, nas fendas sinápticas de tecidos nervosos, principalmente do sistema nervoso periférico, e nas junções neuromusculares. No cérebro há predominância de AChE (MASSOULIÉ *et al.*, 1993; LEJUS *et al.*, 1998).

A AChE e a BChE são serino-hidrolases. Nos seus centros ativos atua uma tríade catalítica formada pelos resíduos de aminoácidos serina, histidina e glutamato. O centro ativo da AChE é formado por um sítio aniônico (carga negativa de resíduo de glutamato) e um sítio esterásico (histidina e serina). No momento da catálise o sítio aniônico interage com o nitrogênio quaternário da acetilcolina. O grupo acetil da colina, que é alojado no sítio esterásico, é transferido para o grupo hidroxila da serina, formando transitoriamente uma molécula da enzima acetilada e liberando uma molécula de colina. A seguir ocorre a hidrólise rápida da ligação éster que une o grupo acetil com a serina, recuperando-se o sítio catalítico da enzima. A interação entre o sítio catalítico da AChE e o substrato acetilcolina pode ser resumidamente ilustrada como mostra a figura 9.

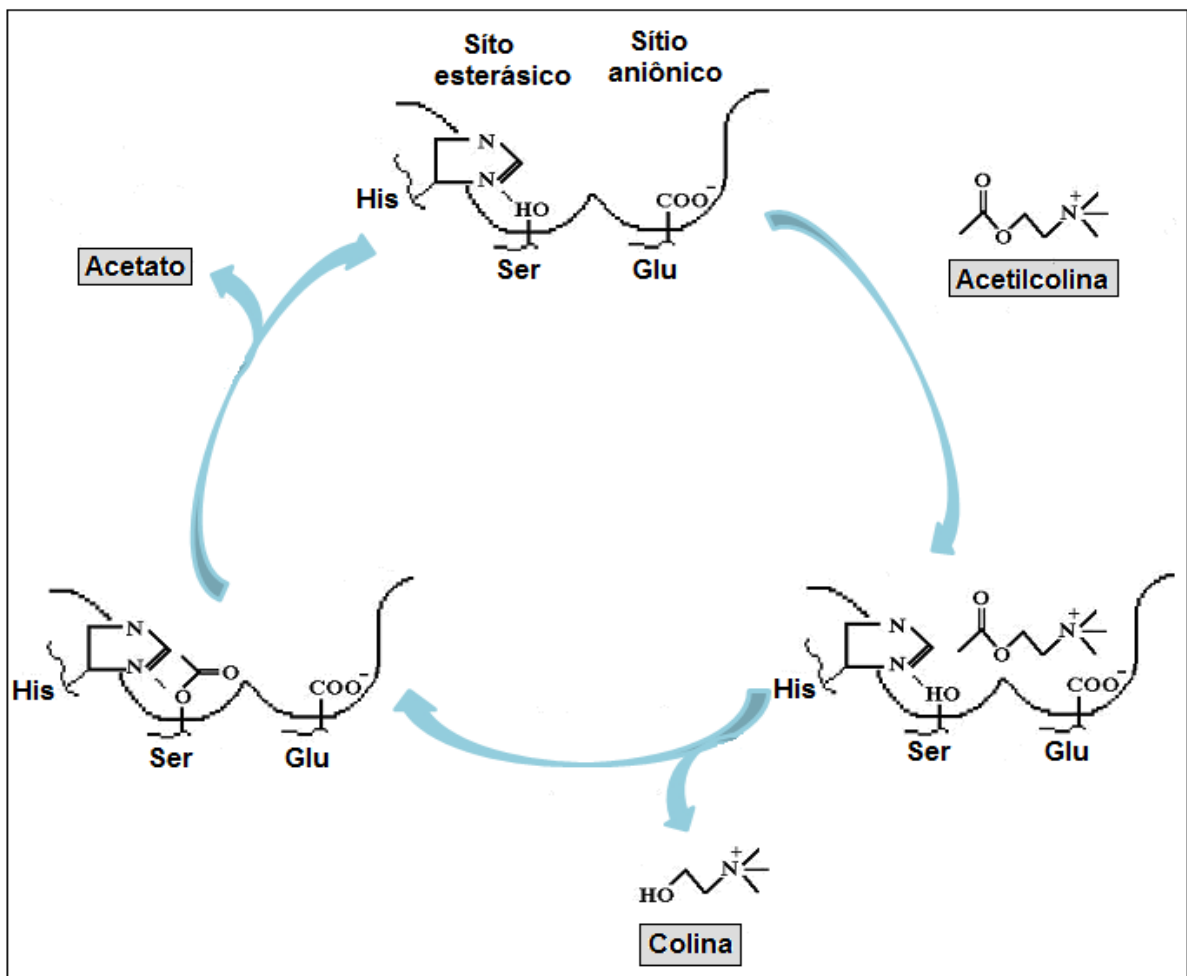


Figura 9. Hidrólise da acetilcolina catalisada pela AChE. A tríade de aminoácidos histidina, serina e glutamato desempenha papel importante na atividade catalítica da enzima. A primeira etapa é a interação do substrato com o sítio ativo. A hidrólise do substrato começa com o ataque do átomo de oxigênio do grupo hidroxila da serina ao carbono do grupo carbonila do substrato. A serina é acetilada e a colina é liberada. Adaptado de RANG *et al.*, 2007.

A BChE também possui atividade catalítica sobre ésteres de colina, entretanto não tem um papel fisiológico definido. Estudos utilizando a BChE estão relacionados com sua função catalítica frente a anestésicos como os relaxantes musculares succinilcolina e mivacúrio. Entretanto, estudos sugerem que a BChE é expressa em algumas populações de neurônios em que apresenta função de correguladora da neurotransmissão colinérgica e que pode estar envolvida com o desenvolvimento do sistema nervoso (DARVESH *et al.*, 2003).

A distinção entre essas duas colinesterases (AChE e BChE) pode ser feita quanto a seus substratos preferenciais e seus inibidores específicos. A AChE tem maior afinidade por acetilcolina do que por qualquer outro éster de colina; apresenta uma pequena afinidade por propionilcolina e nenhuma atividade sobre a butirilcolina. Já a BChE tem maior afinidade por substratos de cadeia mais longa como a butirilcolina, seu substrato preferencial. Pode-se dizer também que ela é menos específica para os ésteres de colina, já que ela é capaz de hidrolisar acetilcolina, propionilcolina e butirilcolina com uma boa eficiência catalítica. A distinção entre as duas enzimas é feita usando-se o BW284C51 {1,5-bis(alildimetilamoniofenil)pentan-3-one dibrometo} como inibidor de AChE e o isoOMPA (tetraisopropil pirofosforamida) na inibição de BChE. Outra característica importante para diferenciar essas duas enzimas é a inibição da AChE e a ativação da BChE pelo excesso de substrato (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

As colinesterases podem regular sua expressão antagonicamente. Em estudos inserindo um gene nocauteado de BChE em uma linha de células precursoras de retina em ratos, a AChE sofre aumento significativo de sua atividade, enquanto na ausência de AChE, a BChE pode hidrolisar a acetilcolina protegendo o sistema colinérgico (DARVESH *et al.*, 2003; LAYER *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos consideram que a BChE tem um papel de cooperatividade com a AChE devido a sua capacidade de quebra da acetilcolina, principalmente em situações de elevadas concentrações desse neurotransmissor (MASSON *et al.*, 2004).

A atividade da BChE plasmática sobre algumas drogas fez com que os farmacologistas considerassem que esta enzima poderia ter uma função desintoxicante. Portanto, sua presença no plasma seria uma vantagem adaptativa, pois funcionaria como uma primeira barreira em casos de intoxicação por ésteres (MASSON & LOCKRIDGE, 2010).

As colinesterases são inibidas por compostos organofosfatos. Esses compostos inibem as colinesterases fosforilando o seu sítio ativo. A serina do sítio esterásico da enzima se liga ao átomo de fósforo do organofosfato formando uma ligação covalente bastante estável. No

caso do metilparaoxon a enzima se ligará a porção fosfato liberando uma molécula de p-nitrofenol (FIGURA 10). Devido à estabilidade da ligação covalente que se estabelece entre as moléculas da enzima e do organofosfato essa inibição pode ser dita irreversível. A desintoxicação por organofosforados ocorre lentamente resultando na acumulação, em níveis tóxicos, de acetilcolina nas fendas sinápticas. As colinesterases também são inibidas por carbamatos de forma semelhante, porém a descarboxilação do sítio ativo da enzima é mais rápida (ETO, 1990).

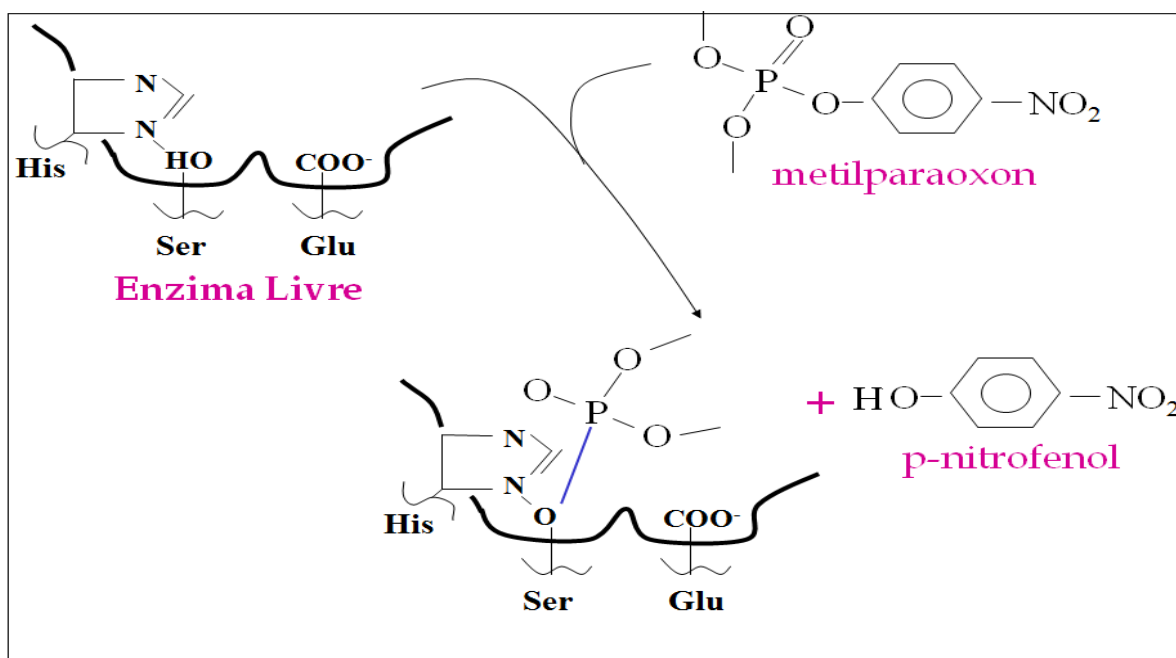


Figura 10. Inibição de serino-hidrolases pelo organofosfato metilparaoxon. A primeira etapa é a interação do organofosfato com o sítio ativo. A hidrólise do organofosfato começa com o ataque do átomo de oxigênio do grupo hidroxila da serina ao carbono do grupo carbonila do metilparaoxon. A serina é irreversivelmente fosfatada e o p-nitrofenol é liberado. Adaptado de ECOBICHON, 2001.

A inibição das colinesterases pelos compostos organofosforados é um fenômeno bastante específico. Tal fato permite que sejam amplamente usadas como biomarcadores da exposição de organismos aquáticos aos organofosforados (DYK & PLETSCHKE, 2011; STURN *et al.*, 1999). Vários estudos mostram as colinesterases de peixes como potenciais biomarcadores de exposição (DE LA TORRE *et al.*, 2002 e 2005; OOST *et al.*, 2003). Em um estudo feito com matrinxãs (*Brycon cephalus*) expostos a 2 mg/L de metilparaoxon por 96 horas foi observado a inibição de 87% da atividade de AChE do cérebro (AGUIAR *et al.*, 2004). Não só as colinesterases de peixes são usadas como biomarcadores, as AChE de invertebrados, como

moluscos e poliquetas, também são sensíveis a organofosforados podendo ser usadas para biomarcar a exposição destes animais a agrotóxicos (BONACCI *et al.*, 2004; HANNAM *et al.*, 2008; LAGUERRE *et al.*, 2009; RICCIARDI *et al.*, 2010; MATOZZO *et al.*, 2005).

1.4.2 Carboxilesterases

As carboxilesterases, assim como as colinesterases, são isoenzimas serino-esterases classificadas dentro do grupo das esterases do tipo B. São capazes de hidrolisar com grande eficiência moléculas que contêm grupos éster, amida ou tioéster. Possuem também no seu sítio catalítico a tríade de aminoácidos serina, histidina e glutamato, sendo que, em algumas formas, no lugar do glutamato há um aspartato.

CarbE são enzimas amplamente distribuídas em animais, plantas e microorganismos (HANDRICK *et al.*, 2001; RASHID *et al.*, 2001; BORNSCHEUER, 2002; ATOMI & IMANAKA, 2004; GERSHATER & EDWARDS, 2007; REDINBO & POTTER, 2005; SATOH & HOSOKAWA, 2006). Estudos mostram que a CarbE não está presente no plasma humano, mas encontra-se em plasma de tigre, rato, camundongo, coelho, cavalo, gato e peixes (LI *et al.*, 2005; FRAGA, 2009). Já nos tecidos estudados até o momento a maior concentração de CarbE é no tecido hepático, associada ao retículo endoplasmático (RE) ou a outras membranas. As CarbE das células hepáticas estão ancoradas ao retículo endoplasmático através de uma sequência de aminoácidos Lis-Asp-Glu-Leu (KDEL) presente em seu C-terminal. Esta sequência de aminoácidos pode ser clivada permitindo a liberação e secreção da enzima para o citosol ou para o exterior da célula (REDINBO & POTTER, 2005; SATOH & HOSOKAWA, 2006).

As isoenzimas de CarbE foram inicialmente classificadas pela sua especificidade quanto ao substrato. Entretanto, esta classificação não se mostrou eficiente porque as CarbE possuem uma sobreposição de especificidade sobre diversos substratos. Uma única hidrolase pode exibir propriedades de CarbE, lipase ou ambas, atuando sobre uma grande variedade de substratos ésteres e lipídicos. Modernamente, a classificação considera também a sequência de aminoácidos e sua homologia com outras CarbE já descritas (REDINBO & POTTER, 2005; SATOH & HOSOKAWA, 2006).

A hidrólise dos ésteres pelas CarbE é feita em reações com a tríade de aminoácidos Ser, His e Glu. A hidrólise acontece em duas etapas (FIGURA 11), sendo que na primeira a serina

do sítio ativo da enzima se liga a um substrato éster formando álcool e um intermediário éster da serina. Na segunda etapa pode ocorrer uma transesterificação quando a porção éster do intermediário formado se liga a um álcool do meio, ou a entrada de uma molécula de água, formando um ácido orgânico (REDINBO & POTTER, 2005).

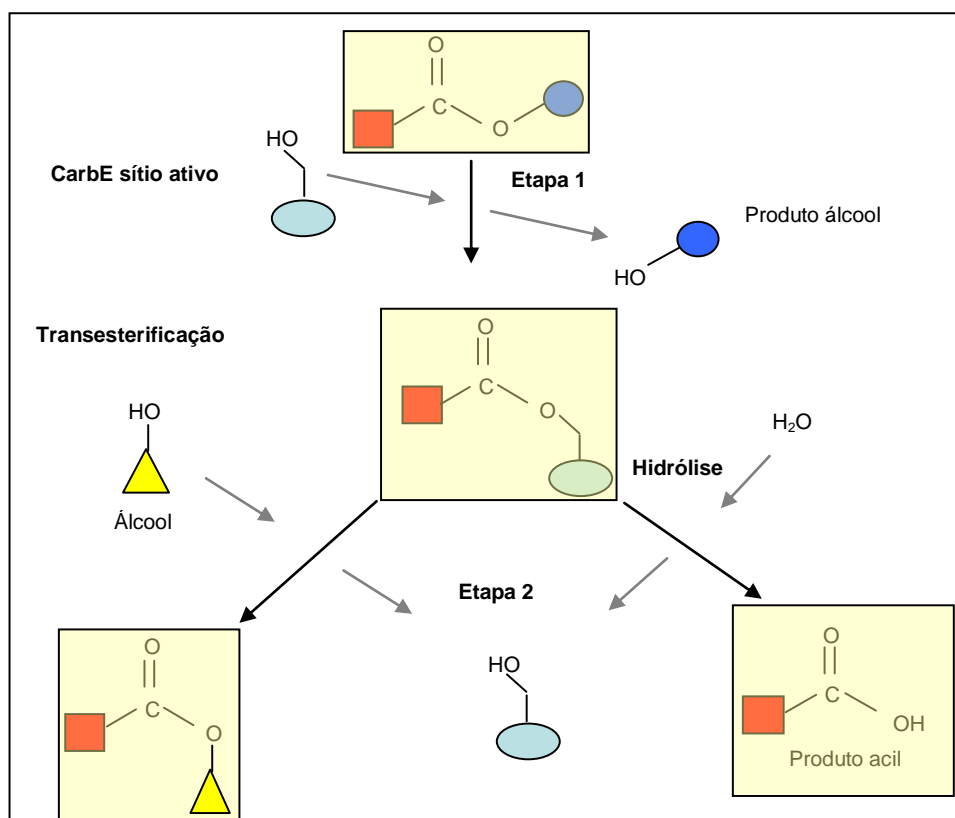


Figura 11. Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos. Adaptado de REDINBO & POTTER (2005).

As CarbE possuem diversas funções já descritas. Participam do metabolismo de drogas e pré-drogas, como por exemplo, o CPT-11, uma droga anticâncer que necessita sofrer hidrólise enzimática para se tornar ativa (HYATT *et al.*, 2005; REDINBO & POTTER, 2005; SATOH & HOSOKAWA, 2006; HOLMES *et al.*, 2008). Estão envolvidas no metabolismo de lipídeos, pois podem hidrolisar ésteres de colesterol com ácidos graxos de cadeia curta e longa e estudos recentes mostraram ser as principais lipases do tecido adiposo (SONI *et al.*, 2004; OKAZAKI *et al.*, 2006; SATOH & HOSOKAWA, 2006), também possuem um papel importante como captadores estequiométricos (“scavengers”) protegendo os organismos contra intoxicações provocadas por organofosforados. Essa propriedade se deve ao fato das CarbE estudadas até hoje se ligarem com maior velocidade aos organofosfatos do que a AChE

(GAUSTAD *et al.*, 1991). Por isto se admite que tal propriedade seja importante para que as CarbE possam diminuir, por captação estequiométrica, a ligação tóxica de moléculas de organofosforados às AChE das sinapses colinérgicas e das placas motoras dos músculos (DOCTOR *et al.*, 1993).

Estudos apontam as CarbE como principais enzimas captadoras de organofosforados de várias espécies. Um estudo demonstrou o potencial protetor das CarbE contra organofosforados em ratos, sendo elas a primeira barreira para desintoxicação (MAXWELL, 1992). Outro estudo realizado em ratos mostrou que as CarbE são fortemente inibidas por paration e diisopropilfosforofluoridato (DFP) quando ensaiadas *in vivo* (DETTBARN *et al.*, 1999). Alguns trabalhos também vêm demonstrando sua eficiência como biomarcadores em peixes (WHEELLOCK *et al.*, 2005). De acordo com Chanda *et al.* (1997) as CarbE de salmões (*Oncorhynchus tshawytscha*) são mais sensíveis ao organofosforado clorpirifós do que a AChE, diferente do que ocorre em ratos. Também em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao organofosforado metilazinfós e ao carbamato carbaril observou-se a inibição da atividade de CarbE (FERRARI *et al.*, 2007).

Uma importante isoforma da CarbE é a egasina. Ela está associada à enzima β -glucuronidase em microsomos de fígado de rato. Quando os organofosforados são incorporados ao retículo endoplasmático das células do fígado, ligam-se fortemente à egasina, dissociando o complexo e liberando a β -glucuronidase, que é lançada no sangue (FIGURA 12). Com isso, a presença de atividade da β -glucuronidase no sangue foi proposta como um bom biomarcador da exposição aos organofosforados (SATOH & HOSOKAWA, 2006; SATOH, 2005).

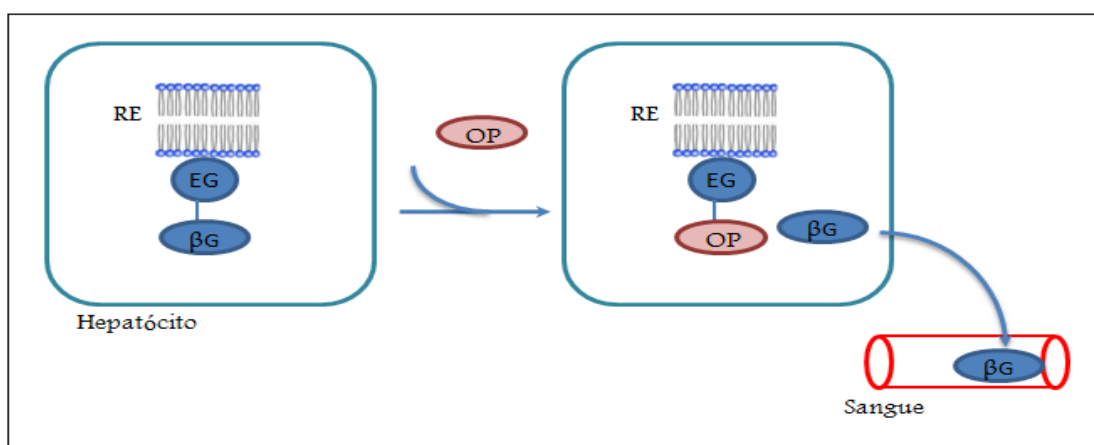


Figura 12. Liberação de β -glucuronidase (β G) de hepatócitos para o sangue em consequência de administração de organofosforado (OP). Na figura EG é a egasina e RE é o retículo endoplasmático. Adaptado de SATOH, 2005.

1.5 Animal de estudo

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), conhecido vulgarmente também como pacu-caranha ou caranha (FIGURA 13), é uma espécie de peixe neotropical migratória encontrada na bacia dos rios Paraná e Paraguai no Pantanal. Essa espécie pertence à ordem Caraciforme que inclui uma variedade de peixes que vivem na África e América. O pacu tem grande importância econômica tanto como fonte de alimento como para pesca recreativa (pesque e pague). Adaptações morfológicas e fisiológicas permitem a alguns caraciformes sobreviverem em condições extremas de altas e baixas concentrações de oxigênio que ocorrem durante o pulso de inundação do pantanal.



Figura 13. *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como Pacu. Fonte: Rafael Dantas.

O Pantanal se encontra na planície mato-grossense e é conhecido por ser uma das maiores áreas alagadas do mundo. No Pantanal o pulso de inundação que se caracteriza por dois períodos bem distintos, o período de chuva (de novembro até abril) e o de estiagem (de maio até outubro). No período das chuvas a baixa declividade e a dificuldade de escoamento fazem com que os rios transbordem, o nível das águas se eleve e alague os campos no entorno. Durante esses meses uma extensa área do Pantanal permanece submersa em águas cuja profundidade pode variar de poucos centímetros até dois metros. Ao invadir as planícies secas a água cobre grande parte da vegetação que morre e se decompõe. Dentre os fatores alterados está a concentração de oxigênio que pode alcançar níveis muito baixos ou até chegar a zero.

Já na época de seca, a quantidade de chuva é menor e o escoamento em direção aos rios é lento. Com o passar do tempo, devido às altas temperaturas e a falta de chuva, grandes lagos

se formam isolados do fluxo fluvial. A concentração de oxigênio nessas águas é muito dependente da fotossíntese, que, quando cessa à noite, fica bruscamente reduzida em relação ao dia, fazendo com que os animais aprisionados nestes lagos, inclusive o pacu, sejam expostos a variações circadianas de oxigênio. Portanto, espécies como o pacu que se adaptaram a essas condições sazonais e circadianas de hipoxia ou anoxia (CALHEIROS *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2007; LEITE, *et al.*, 2007), são um bom modelo de estudo bioquímico.

1.5.1 Hipoxia

A hipoxia por definição é quando a concentração de oxigênio é menor do que 2,8 mg/L (2,8 ppm) (DIAZ & ROSENBERG, 1995). A hipoxia pode ocorrer por uma queda na concentração de oxigênio dissolvido na água ocasionada por um fenômeno natural ou antrópico, como por exemplo, a entrada de nutrientes e/ou matéria orgânica em alta concentração em águas com pouca circulação. Atualmente milhares de km² de águas continentais, baías e estuários, podem sofrer problemas ecológicos pela morte em massa de peixes e de outros animais devido à baixa concentração de oxigênio no ambiente, que impõe às células dos animais a condição de hipoxia. Comparado ao ambiente terrestre, a concentração de oxigênio da água é 30.000 vezes menor do que a do ar e a sua taxa de difusão é 10.000 vezes mais lenta. Ademais, vários fatores ambientais podem mudar a concentração de oxigênio na água, como temperatura, salinidade, profundidade e a vegetação (WU, 2002; NIKINMAA & REES, 2005).

Além de sofrer com o fenômeno natural da variação de oxigênio dissolvido, os pacus que habitam o Pantanal mato-grossense também sofrem constantemente com a lixiviação de agrotóxicos oriundos das lavouras para seus rios. Os animais de cativeiro também podem ser expostos aos agrotóxicos por introdução direta em açudes ou tanques utilizados na aquicultura para eliminação de parasitos (GABRIELLI & ORSI, 2000).

Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que, quando submetidos a pelo menos 18 horas de hipoxia, pacus tem a atividade de CarbE do soro e fígado diminuída pela metade (SILVA, 2009).

Devido a suas propriedades de “scavenger” a CarbE tem um papel muito importante no mecanismo de proteção do animal contra contaminação por agrotóxicos. Pode-se, assim, perceber que o estudo bioquímico das colinesterases e CarbE é de extrema importância no

entendimento dos possíveis efeitos da exposição dos peixes aos agrotóxicos considerando as condições ambientais dos ecossistemas nos quais habitam. Portanto, ensaios que revelem sua inibição podem servir para prever uma possível morte de um grande número de organismos de um determinado sistema aquático que esteja sendo poluído.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se os pacus submetidos à hipoxia sofreram maior inibição das esterases de órgãos vitais como cérebro, coração, fígado e músculos quando expostos a organofosforados.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar se houve alguma alteração na atividade de CarbE do soro e do fígado de animais submetidos a 24 horas de hipoxia.
2. Comparar o nível de inibição das colinesterases no coração, cérebro, músculo e fígado entre os grupos normoxia e hipoxia quando expostos ao metilparation.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os espécimes de pacu foram obtidos da Fazenda São João, localizada no município de Itaocara, Rio de Janeiro. Os pacus pesavam em média 500 gramas. Os animais foram transportados segundo autorização concedida pelo SISBIO para atividade científica. Número da autorização: 18965-1.

O número de animais ficou limitado à disponibilidade da parceria com a piscicultura e das instalações. Sendo assim, foram utilizados cinco pacus em cada grupo em um primeiro experimento e mais quatro pacus em cada grupo no segundo experimento.

3.2 Equipamentos e reagentes

3.2.1 Reagentes

Iodeto de acetilcolina (ASCho), iodeto de butirilticolina (BSCho), albumina de soro de boi (BSA), ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB), ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA), metilparation (O,O-dimetil S-[4-nitrofenil] fosfato), p-nitrofenilacetato (p-NPA), Reativo de Folin e Ciocalteu e azul de bromofenol foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA). Etanol, sacarose, fosfato de potássio monobásico e dibásico, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram comprados da Merck. Sulfato de cobre e tartarato duplo de sódio e potássio foram comprados da Reagen. Os gases nitrogênio e oxigênio foram obtidos da Air Liquide Brasil LTDA.

3.2.2 Equipamentos

Usamos os seguintes equipamentos e dispositivos: agitador tipo Vortex Phoenix AP 56, balança analítica Micronal B 200, balança de precisão Mettler AJ 150, espectrofotômetro

Shimadzu UV-160 A, homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, potenciômetro Analyser pH 300 e Centrífuga Hermle Z323 K.

3.3 Experimento de hipoxia

Dois grupos de pacus (n=18) foram aclimatados à temperatura ambiente (23 a 27 °C) em dois tanques de 1.000 L. No primeiro tanque, nove animais sofreram hipoxia por diminuição da concentração de oxigênio até 0,5 mg.L⁻¹ através de borbulhamento de nitrogênio na água. Quando estes animais atingiram a hipoxia, foram mantidos a 0,5 mg de O₂ por litro durante 24 horas. Os pacus do segundo tanque foram mantidos em normoxia durante o mesmo intervalo de 24 horas. Após as 24 horas, foi colocado na água de ambos os tanques o organofosforado metilparation numa concentração final no tanque de 0,02 mg/L, e os animais permaneceram em exposição ao metilparation por mais 4 horas. Um segundo experimento semelhante foi feito, com a concentração de 0,01 mg/L de metilparation. No decorrer do experimento foram feitas coletas de sangue por punção de vasos sanguíneos da cauda. Os corações, músculos, cérebros e fígados dos animais de ambos os grupos foram obtidos após eutanásia por ruptura da coluna vertebral.

3.4 Preparo de soro

O sangue coletado por punção de um vaso da cauda foi deixado por 30 min à temperatura ambiente para formação e retração do coágulo. A seguir, o sangue coagulado foi centrifugado na Centrífuga Hermle Z323 K a 3.500 rpm por 5 min. O soro foi removido com pipeta e congelado a -10 °C até a hora de ser usado como amostra dos ensaios.

3.5 Preparo dos homogeneizados teciduais e dosagem de proteínas

Após coleta de sangue, os animais foram sacrificados por ruptura da coluna vertebral. Os fígados, cérebros, corações e pedaços de músculo foram retirados e conservados em nitrogênio líquido até o momento do uso, quando foram descongelados. Após descongelamento, os órgãos foram rapidamente secos sobre papel de filtro e pesados. Para cada grama de tecido dos fígados e cérebros foram acrescentados quatro mililitros de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M. O coração e o músculo sofreram processo semelhante, mas a solução tampão utilizada foi Tris-HCl, 0,01 M, pH 7,0, contendo 1,5 M de NaCl e Triton X-100 10%, na proporção de um grama de tecido para dez mililitros de solução tampão para o coração, e na proporção de um grama de tecido para dezenove mililitros de solução tampão nos músculos. A homogeneização foi feita em homogeneizador do tipo teflon-vidro (POTTER & ELVEHJEM, 1936) com os picados mantidos em frascos mergulhados em flocos de gelo. Os homogeneizados de coração e músculo foram centrifugados a 2.500 x g por 5 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pipeta Pasteur e posteriormente congelado a -10 °C até o uso.

As concentrações de proteínas dos tecidos foram determinadas pelo método de Peterson (1977), que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu.

3.6 Ensaio enzimáticos

Os ensaios de atividade colinesterásica foram realizados em uma solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,5, a 25 °C. As atividades de AChE e BChE foram ensaiadas por método cinético em 1 minuto de reação, em volume final de 200 µL, usando a concentração final de 1,875 mM de iodeto de acetiltiocolina (ASCho) ou iodeto de butiriltiocolina (BSCho). O ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico] (DTNB) foi usado como reagente de cor (ELLMAN *et al.*, 1961), na concentração final de 0,32 mM. Usamos 14.150 M⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absorvidade molar do ácido tionitrobenzóico a 412 nm.

A CarbE foi ensaiada de acordo com Morgan *et al.* (1994) usando 3 mM final de p-nitrofenilacetato em acetonitrila como substrato. Determinamos o p-nitrofenol formado pela leitura da absorvância a 400 nm em 1 minuto de reação em um volume final de 200 µL na

cubeta. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,7, a 25 °C. Usamos o coeficiente de absorvidade molar do p-nitrofenol igual a $13.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Além de ensaiadas no soro, as atividades enzimáticas foram medidas em homogeneizados de fígado, cérebro, músculo e coração.

As atividades enzimáticas foram expressas em U.mL^{-1} de soro ou U.g^{-1} de tecido. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de produto formado por minuto de reação, nas condições descritas acima.

3.7 Análises estatísticas

Os gráficos e análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Prism da GraphPad software, versão 5.0. O método estatístico utilizado foi o One-Way ANOVA, com pós-teste de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade de CarbE no soro.

Com o intuito de ensaiar a atividade da CarbE durante o experimento de hipoxia, foram realizadas coletas de sangue a cada 12 horas, exceto a última, que foi realizada depois de 4 horas de exposição ao metilparation. Após as primeiras 12 horas de hipoxia a mediana das atividades ensaiadas de CarbE no soro dos animais caiu de 4,1 para 2,86 U/mL. A mediana das atividades depois de 24 horas de hipoxia foi de 2,48 U/mL. Completadas as 24 horas de hipoxia, o metilparation foi adicionado a ambos os tanques (hipoxia e normoxia) para uma concentração final de 0,02 mg/L. Os animais permaneceram então por mais 4 horas no tanque em exposição e a mediana das atividades de CarbE encontrada no soro depois destas 4 h foi de 0,48 U/mL para os grupos normoxia e hipoxia, mostrando uma queda de 85% em relação aos valores dos peixes em normoxia (FIGURA 14).

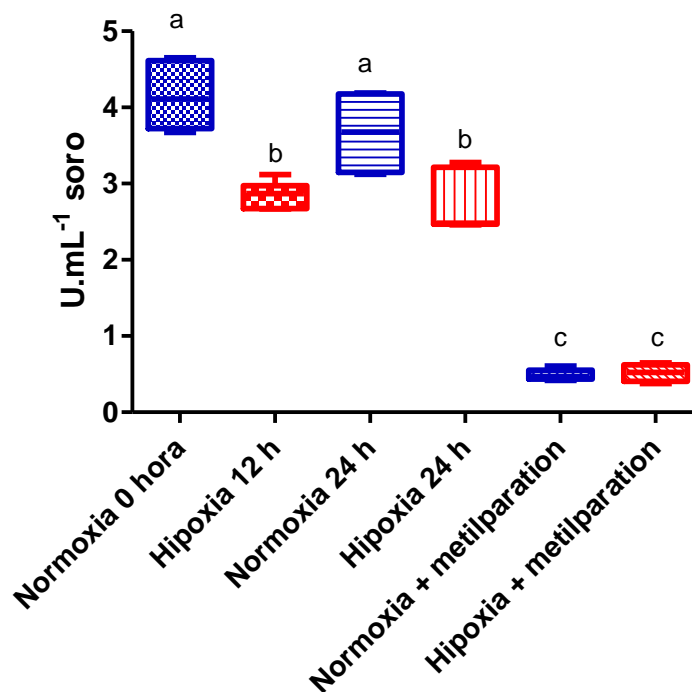


Figura 14. Atividade de CarbE em soro de pacus submetidos a hipoxia (n = 9) ou normoxia (n = 9) durante 24 horas, seguidas por mais 4 horas de exposição a metilparation (0,02 mg/L). Uma unidade de atividade (U) equivale a um μmol de produto formado por um minuto de reação. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A Figura 15 mostra um segundo experimento que foi feito com a concentração de 0,01 mg/L de metilparation. Após as primeiras 12 horas de hipoxia a mediana das atividades de CarbE no soro dos animais diminuiu de 2,70 para 2,15 U/mL, revelando uma queda de 17%. Com 24 horas de hipoxia a mediana das atividades foi de 1,63 U/mL de soro, o que representa uma diminuição de 37% em relação à normoxia. Após as 4 horas de exposição os soros dos peixes em normoxia apresentaram uma mediana de 1,87 U/mL, e os do grupo hipoxia uma mediana de 1,33 U/mL de soro. Depois da exposição ao metilparation a queda nas atividades dos grupos normoxia e hipoxia foi de 28% e 48,2%, respectivamente.

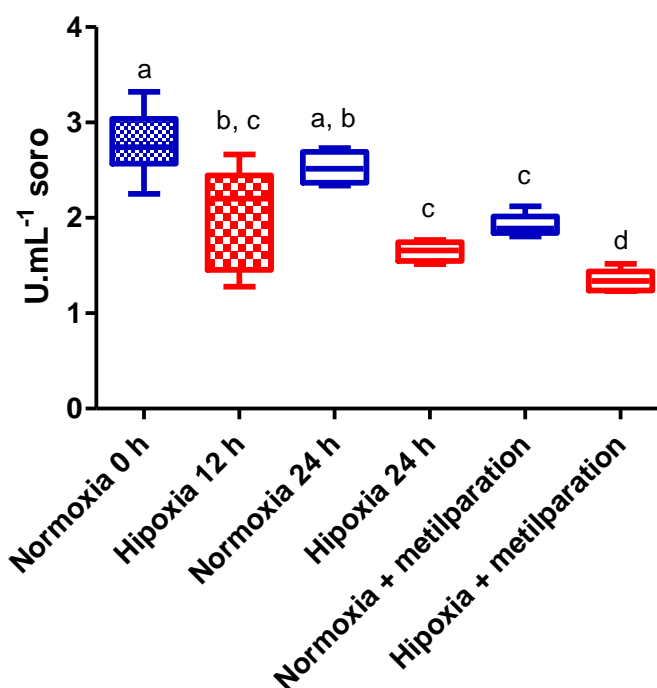


Figura 15. Atividade de CarbE em soro de pacus submetidos a hipoxia (n = 9) ou normoxia (n = 9) durante 24 horas, seguidas de mais 4 horas de exposição a metilparation (0,01 mg/L). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (p < 0,05).

Determinou-se a atividade residual de CarbE no soro dos animais dos dois experimentos, avaliando-se os grupos normoxia, 24 horas de hipoxia, hipoxia mais exposição a 0,01 mg/L de metilparation e hipoxia mais exposição a 0,02 mg/L de metilparation. Houve uma redução de aproximadamente 35% na atividade de CarbE do soro dos animais submetidos a 24 horas de hipoxia. Nos animais que sofreram hipoxia e exposição a 0,01 mg/L de metilparation a queda na atividade foi de 48,2%. Quando expostos a uma concentração de 0,02 mg/L a atividade caiu 88%. Portanto, a duplicação na concentração de metilparation de

0,01 para 0,02 mg/L levou a atividade residual de 51,8% para 12%, como pode ser visto na figura 16.

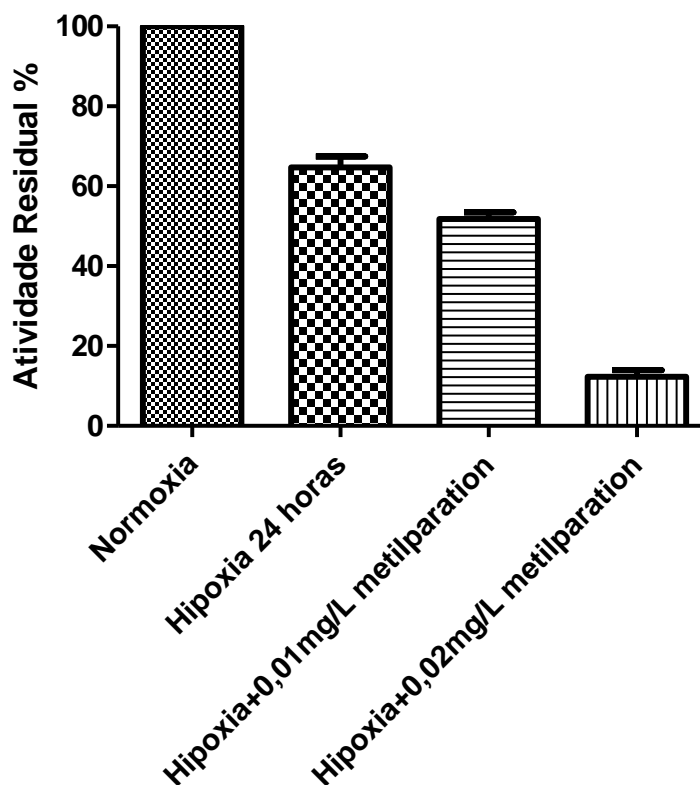


Figura 16. Atividade residual de CarbE em soro de pacus submetidos a diferentes concentrações de oxigênio e metilparation. A atividade foi expressa em porcentagem da atividade não inibida. Todos os resultados foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4.2 Inibição da atividade esterásica nos tecidos

Ao término das 28 horas de experimento os animais foram sacrificados e tiveram seus cérebro, coração, fígado e músculo retirados a fim de ensaiar as atividades de AChE, BChE e CarbE.

Ao ensaiar a atividade acetilcolinesterásica dos tecidos dos pacus que sofreram exposição a 0,02 mg/L de metilparation, o único tecido que apresentou diferença significativa entre os grupos normoxia e hipoxia foi o músculo com $0,018 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ em hipoxia e $0,036 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ em normoxia, respectivamente (Figura 17).

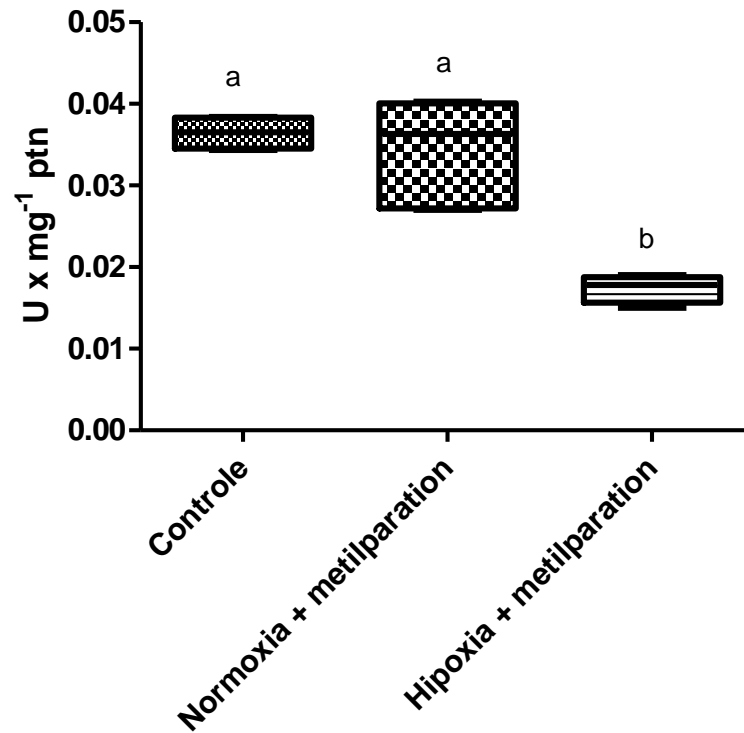


Figura 17. Atividade de AChE de músculo de pacus controle (n = 4), normoxia + metilparation (n = 9) e hipoxia + metilparation (n = 5). A concentração de metilparation foi de 0,02 mg/L. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O ensaio da BChE demonstrou o mesmo resultado. A atividade no grupo submetido à hipoxia ($0,0028 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) também foi de aproximadamente metade da apresentada pelo grupo em condições de normoxia ($0,0048 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), como pode ser observado na figura 18.

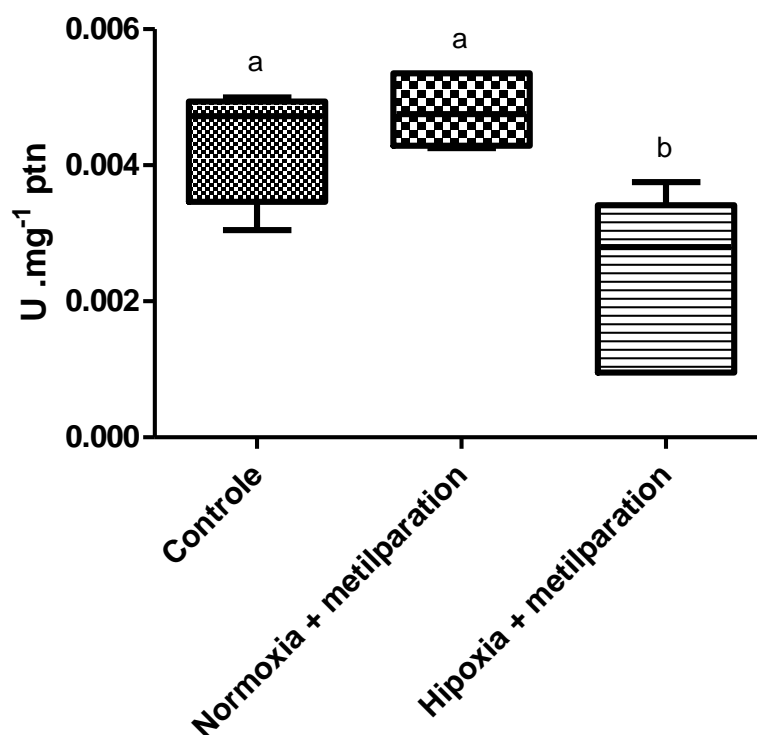


Figura 18. Atividade de BChE de músculo de pacus controle (n = 4), hipoxia + metilparation (n = 5) e normoxia + metilparation (n = 9). A concentração de metilparation usada foi de 0,02 mg/L. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Como pode ser visto nas figuras 17 e 18 as atividades de AChE e BChE do músculo no grupo de paçus em condições de normoxia mais paration foram semelhantes as atividades encontradas nos animais controle. Isso mostra que as colinesterases presentes no músculo desses animais não sofreram inibição pelo metilparation.

Os ensaios da atividade de CarbE dos tecidos de ambos os grupos (normoxia e hipoxia) no experimento com 0,02 mg/L de metilparation não apresentaram nenhuma diferença significativa com relação ao controle. Os valores ficaram em torno de 0,0162 U.mg⁻¹ no músculo, de 0,0446 U.mg⁻¹ no coração, e de 0,676 U.mg⁻¹ no fígado.

No experimento realizado com a concentração de 0,01 mg/L de metilparation as atividades de AChE, BChE e CarbE permaneceram nos níveis observados no controle em todos os tecidos avaliados tanto no grupo hipoxia quanto no grupo normoxia, como pode ser visto nas tabelas 3, 4 e 5.

As atividades de AChE ($0,156 \text{ U.mL}^{-1}$) e BChE ($0,241 \text{ U.mL}^{-1}$) no soro dos animais aumentaram mais que o dobro após as 24 horas de hipoxia. E mesmo após as 4 horas de exposição ao metilparation as atividades de AChE e BChE permaneceram praticamente iguais como pode ser visto nas tabelas 3 e 4 que mostram os valores de atividade no experimento com a concentração de $0,01 \text{ mg/L}$. Na exposição a $0,02 \text{ mg/L}$ de metilparation observa-se o mesmo (dados não mostrados).

Tabela 3. Atividade de AChE nos tecidos de pacus controle e expostos a $0,01 \text{ mg/L}$ de metilparation. A atividade está expressa em U.mg^{-1} de proteínas nos tecidos ou U.mL^{-1} no soro.

	Acetilcolinesterase (AChE)		
	Controle	Normoxia + Metilparation	Hipoxia + Metilparation
Fígado	$0,075 \pm 0,003$	$0,063 \pm 0,008$	$0,065 \pm 0,007$
Coração	$0,080 \pm 0,010$	$0,086 \pm 0,008$	$0,098 \pm 0,010$
Cérebro	$0,200 \pm 0,007$	$0,180 \pm 0,011$	$0,180 \pm 0,013$
Músculo	$0,030 \pm 0,004$	$0,030 \pm 0,007$	$0,036 \pm 0,002$
Soro	$0,060 \pm 0,006$	$0,064 \pm 0,012$	$0,144 \pm 0,014$

Tabela 4. Atividade de BChE nos tecidos de pacus controle e expostos a $0,01 \text{ mg/L}$ de metilparation. A atividade está expressa em U.mg^{-1} de proteínas nos tecidos ou U.mL^{-1} no soro.

	Butirilcolinesterase (BChE)		
	Controle	Normoxia + Metilparation	Hipoxia + Metilparation
Fígado	$0,081 \pm 0,023$	$0,087 \pm 0,036$	$0,074 \pm 0,034$
Coração	$0,028 \pm 0,005$	$0,027 \pm 0,009$	$0,023 \pm 0,009$
Músculo	$0,003 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,0007$	$0,003 \pm 0,001$
Soro	$0,074 \pm 0,012$	$0,071 \pm 0,014$	$0,231 \pm 0,011$

Tabela 5. Atividade de CarbE nos tecidos de pacus controle e expostos a $0,01 \text{ mg/L}$ de metilparation. A atividade está expressa em U.mg^{-1} de proteínas.

	Carboxilesterase (CarbE)		
	Controle	Normoxia + Metilparation	Hipoxia + Metilparation
Fígado	$0,586 \pm 0,374$	$0,460 \pm 0,258$	$0,658 \pm 0,316$
Coração	$0,044 \pm 0,008$	$0,037 \pm 0,007$	$0,046 \pm 0,002$
Músculo	$0,008 \pm 0,003$	$0,018 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,001$

5 DISCUSSÃO

O pacu é um animal típico do Pantanal, em cujas águas ocorrem variações diárias e sazonais de concentração de oxigênio. Sua permanência em um habitat que sofre com variações da disponibilidade de oxigênio na água deve ter provocado o desenvolvimento de adaptações e mecanismos metabólicos para sobreviver a diferentes disponibilidades de oxigênio. Silva (2009) demonstrou que pacus submetidos a pelo menos 17 horas de hipoxia apresentam a atividade de CarbE diminuída no soro e no fígado. Essa diminuição na atividade pode representar algum tipo de mecanismo adaptativo para hipoxia.

Não é de conhecimento a existência de trabalhos de outros grupos mostrando a queda na atividade de CarbE em peixes durante a hipoxia, mas é sabido que a hipoxia pode alterar a expressão gênica de várias proteínas em hepatócitos humanos (HEPG2) e que uma dessas proteínas é a CarbE (SONNA *et al.*, 2003). Também acontece diminuição de sua expressão em células tumorais humanas (GUICHARD *et al.*, 1999). Outra explicação para perda de atividade é a possível inibição da CarbE pelo 4-hidroxinonenal (4-HNE), pois Borazjani *et al.*, (2011) detectaram inibição da atividade de CarbE quando 4-HNE foi misturado *in vitro* com enzimas recombinantes de macrófagos humanos. Acresce que a hipoxia pode levar a um quadro de estresse oxidante e no estresse oxidante podem ocorrer elevados níveis de peroxidação lipídica, cujo principal produto pode ser o 4-HNE (BLOKLINA & FAGERSTEDT, 2010; PETERSEN & DOORN, 2004). Também formulamos a hipótese de que a queda da atividade da CarbE pode ser uma resposta a diminuição na mobilização lipídica durante a hipoxia, já que a CarbE de vertebrados é uma das enzimas do metabolismo de lipídios (DOLINSKY *et al.*, 2004).

A queda na atividade da CarbE na hipoxia pode ser prejudicial ao animal em situações de exposição à contaminantes como os agrotóxicos, pois vários trabalhos vêm discutindo seu potencial como enzima “scavenger”. Ela capta estequiometricamente moléculas de agrotóxicos, principalmente no soro, impedindo que elas atinjam as colinesterases de tecidos importantes como cérebro e coração, funcionando assim como uma primeira barreira de proteção do animal contra contaminações por agrotóxicos (LAGUERRE *et al.*, 2009; VEJARES *et al.*, 2010; MAXWELL *et al.*, 1992; HEMINGWAY & RANSON, 2000).

Nos experimentos de hipoxia realizados neste trabalho observamos que a atividade de CarbE no soro se encontra reduzida nas primeiras 12 horas de hipoxia. A redução foi de 35% no grupo de peixes expostos a concentração de 0,02 mg/L de metilparation (FIGURA 14) e de

17% no experimento com 0,01 mg/L (FIGURA 15). Quando completadas 24 horas de hipoxia observamos uma queda de 35% nos dois grupos de pacus. Isso pode ser devido a variações individuais no conjunto de animais usados em cada experimento.

Depois de expor os animais a uma concentração de 0,01 mg/L de metilparation, após as 24 horas de hipoxia ou normoxia, o grupo previamente submetido à normoxia apresentou uma mediana de atividade de CarbE no soro ($1,87 \text{ U.mL}^{-1}$) um pouco maior do que a do grupo previamente submetido à hipoxia ($1,33 \text{ U.mL}^{-1}$) (FIGURA 15). Esse resultado pode ser explicado pelo fato da atividade já estar 35% reduzida nos peixes do grupo hipoxia antes da exposição. Pode-se notar também que essa diferença não existe entre os grupos normoxia e hipoxia do experimento com 0,02 mg/L, ficando os dois grupos com o mesmo nível de atividade ($0,48 \text{ U.mL}^{-1}$) (FIGURA 14). Portanto, a queda inicial de 35% na atividade, devido às 24 horas de hipoxia, que é visível após a exposição a 0,01 mg/L de metilparation, não é mais visível quando se expõe os animais a concentração de 0,02 mg/L.

Comparando os dois experimentos em termos de atividade residual, pode-se observar que além da queda de 35% por causa da hipoxia, houve uma redução de 85% na atividade de CarbE do soro de animais que sofreram hipoxia com subsequente exposição a metilparation em uma concentração de 0,02 mg/L. Quando expostos a 0,01 mg/L a diminuição observada foi de 48,2%. Ou seja, a duplicação da concentração de metilparation de 0,01 para 0,02 mg/L levou a uma queda da atividade residual de CarbE do soro de 51,8% para 15% (FIGURA 16).

Ao analisar as atividades esterásicas dos tecidos pode-se observar que no músculo de pacus que sofreram hipoxia e também foram expostos a 0,02 mg de metilparation por L as atividades de AChE e BChE caíram pela metade. Já nos pacus em normoxia as atividades de AChE e BChE permaneceram nos níveis normais mesmo após a exposição (FIGURAS 17 e 18). Nos tecidos dos animais expostos a 0,01 mg/L de metilparation não foram observadas diferenças significativas nas atividades de AChE e BChE. A ausência de mudanças nas atividades das esterases dos tecidos de animais expostos a 0,01 mg/L pode ter ocorrido devido a concentração de organofosforado não ter sido suficiente para quebrar a primeira barreira de proteção das enzimas séricas e atingir os tecidos. Mas, no experimento com 0,02 mg/L de metilparation, as atividades de AChE e BChE do músculo foram inibidas no grupo hipoxia. Este fenômeno pode ser explicado pela diminuição na atividade de CarbE no soro de animais em hipoxia. Ou seja, a queda observada por Silva (2009) na atividade de CarbE no soro de pacus submetidos a hipoxia se mostrou crucial para que moléculas de pesticida pudessem atingir o músculo dos animais.

A atividade de CarbE no fígado dos pacus não foi alterada após a hipoxia ao contrário do que foi observado por Silva (2009). Este fato pode ter ocorrido devido à duração no tempo de hipoxia ter sido diferente, já que Silva (2009) observou a queda na atividade no fígado após 42 horas de hipoxia e no presente trabalho a atividade foi ensaiada após 24 horas de hipoxia.

A atividade residual de $0,48 \text{ U.mL}^{-1}$ de soro nos grupos hipoxia e normoxia do experimento com $0,02 \text{ mg/L}$ se deve provavelmente a uma ou mais enzimas que não são inibidas por organofosforados e hidrolisam o substrato p-nitrofenilacetato. Pode-se descartar a paraoxonase como enzima responsável pela hidrólise de p-NPA pelo uso de EDTA (MACKNESS *et al.*, 1998). O EDTA é um quelante de íons divalentes, por isso ele funciona como um inibidor da paraoxonase, já que esta precisa de cálcio no meio como um cofator. É provável que a albumina seja a responsável por essa atividade, já que Li *et al.* (2005) demonstraram a existência de uma albumina no plasma humano capaz de hidrolisar o substrato p-nitrofenilacetato e que Córdova *et al.* (2008) encontraram uma albumina sérica de boi que hidrolisa ligações éster. Por outro lado a BChE também pode ter contribuído para esta atividade residual. Masson *et al.*, (2007) demonstrou que a BChE possui atividade catalítica sobre o substrato p-nitrofenilacetato em plasma humano. Para corroborar essa hipótese, foi encontrado nesse trabalho atividade residual de BChE no soro após a exposição ao metilparation (TABELA 4). Talvez a presença de moléculas de BChE não inibidas no soro se deva a maior sensibilidade da CarbE ao metilparation, como mostrou Fraga (2010). A maior capacidade da CarbE de pacus em captar moléculas de organofosforados também foi demonstrada em outras espécies, como o microcrustáceo *Daphnia magna*, o porquinho-da-índia e o camundongo (DUYSEN *et al.*, 2011; BARATA *et al.*, 2004; GAUSTAD *et al.*, 1991).

Foi observado um aumento significativo nas atividades de AChE e BChE no soro dos pacus submetidos à hipoxia. Esse aumento se manteve mesmo após as 4 horas de exposição ao metilparation, o que sugere que a atividade colinesterásica não foi inibida pelo organofosforado no soro. Nada na literatura sugeriu-nos uma explicação plausível para o aumento da atividade colinesterásica no soro após as 24 horas de hipoxia. Já a falta de inibição da atividade colinesterásica pelo metilparation no soro pode ser explicada pela maior capacidade da CarbE de captar organofosforados, como discutido anteriormente.

De acordo com a Resolução CONAMA de N° 357, de 17 de março de 2005, em águas doces de classe três (águas que são destinadas a pesca, irrigação, recreação e abastecimento) a concentração máxima permitida de paration é de $0,035 \text{ mg/L}$. Porém, quando expostos a $0,02$

mg/L de metilparation após sofrerem hipoxia, os pacus já apresentaram uma expressiva inibição da atividade esterásica no soro e metade de sua atividade colinesterásica inibida no músculo. Esse resultado aponta para uma maior susceptibilidade dos pacus, quando submetidos à hipoxia, ao pesticida metilparation. Sugerimos então que é necessária uma reavaliação da legislação vigente quanto à concentração permitida de organofosforados na água levando em consideração a dinâmica hidrológica de cada ecossistema. Especialmente no caso do Pantanal, que sofre com o fenômeno do pulso de inundação anual e possui ciclos sazonais e circadianos de hipoxia e anoxia. Sendo assim, é de extrema importância estudos que revelem efeitos toxicológicos ainda não letais sobre a fauna pantaneira.

6 CONCLUSÕES

- Pacus submetidos a 24 horas de hipoxia tiveram uma perda de 35% na atividade sérica de CarbE .
- A duplicação na concentração de metilparation de 0,01 para 0,02 mg/L levou a atividade residual de CarbE do soro de 51,8% para 15% em pacus submetidos à hipoxia.
- Não houve diferenças entre os grupos hipoxia e normoxia quanto a atividade residual de CarbE no soro dos pacus após exposição a 0,02 mg/L de metilparation. Isto indica a presença no soro de pacus de alguma outra atividade esterásica insensível a organofosforados.
- Animais expostos a 0,01 mg/L de metilparation não tiveram sua atividade esterásica inibida em músculo, coração, fígado e cérebro. Isto indica que a atividade do soro pode proteger os pacus caso sejam expostos a baixas concentrações de organofosforados.
- No músculo de pacus expostos a 0,02 mg de metilparation por L, as atividades de AChE e BChE caíram pela metade nos animais submetidos à hipoxia quando comparados a animais que permaneceram em normoxia.
- Mesmo uma concentração abaixo do limite de contaminação permitido pode prejudicar os pacus quando em hipoxia.

7 REFERÊNCIAS

- Aguiar, L. H.; Moraes, G.; Avilez, I. M.; Altran, A. E.; Corrêa, C. F. *Metabolical effects of Folidol 600 in the Neotropical freshwater fish matrinxã, Bricon cephalus*. Environmental Research. 2004; 95: 224-230.
- Aldridge, W. N. *Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*. Biochemical Journal 1953; 53: 110-119.
- Atomi, H.; Imanaka, T. *Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles*. Tetrahedron: Asymmetry. 2004; 15: 2729-2735.
- Barata, C.; Solayan, A.; Porte, C. *Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorous (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to Daphnia magna*. Aquatic Toxicology. 2004; 66: 125-139.
- Bastos, V. L. F. C.; Salles, J. B.; Valente, R. H.; León, I. R.; Perales, J.; Dantas, R. F.; Albano, R. M.; Bastos, F. F.; Bastos, J. C. *Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (Piaractus mesopotamicus), a hypoxia tolerant fish of the Pantanal*. Biochimie. 2007; 89: 1332-1342.
- Blokline, O.; Fagerstedt, K. V. *Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation*. Plant Physiology and Biochemistry. 2010; 48: 359-373.
- Bonacci, S.; Browne, M. A.; Dissanayake, A.; Hagger, J. A.; Corsi, I.; Focardi, S.; Galloway, T. S. *Esterase activities in the bivalve mollusc Adamussium colbecki as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment*. Marine Pollution Bulletin. 2004; 49: 445-455.
- Borazjani, A.; Edelmann, M. J.; Hardin, K. L.; Herring, K. L.; Crow, J. L.; Ross, M. K. *Catabolism of 4-hydroxy-2-trans-nonanal by THP1 monocytes/macrophages and inactivation of carboxylesterases by this lipid electrophile*. Chemico-Biological Interactions. 2011; 194: 1-12.
- Bornscheuer, U. T. *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis*. FEMS microbiology reviews. 2002; 26: 73-81.
- Caldas, E. D.; Souza, L. C. K. R. *Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira*. Revista de Saúde Pública. 2000; 34 (5): 529-537.
- Calheiros, D. F.; Seidl, A. F.; Ferreira, C. J. A. *Participatory research methods in environmental science: local and scientific knowledge of a limnological phenomenon in the Pantanal wetland of Brazil*. Journal of Applied Ecology. 2000; 37: 684-696.
- Calheiros, D. F.; Oliveira, M. D.; Dores, E. F. G. In: Seminário de Agroecologia de Mato Grosso do Sul. Contaminação por agrotóxicos na bacia do rio Miranda, Pantanal (MS). Mato Grosso do Sul: Revista Brasileira de Agroecologia. 2008; 2: 202-205.

Casarett, L. J. & Doull, J. *Toxicology, The basic science of poisons*. 17^a Ed. Kansas City: Curtis D. Klaassen, 2008.

Casida, J. E.; Quistad, G. B. *Golden age of insecticide research: past, present or future?* Annual Review of Entomology. 1998; 43: 1-16.

Chanda, S. M.; Mortensen, S. R.; Moser, V. C.; Padilla, S. *Tissue-Specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison*. Fundamental and Applied Toxicology. 1997; 38 (2): 148-157.

Córdova, J.; Ryan, J. D.; Boonyaratanakornkit, B. B.; Clark, D. S. *Esterase activity of bovine serum albumin up to 160 °C: A new benchmark for biocatalysis*. Enzyme and Microbial Technology. 2008; 42: 78-283.

Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. *Neurobiology of butyrylcholinesterase*. Nature. 2003; 4: 131-138.

De La Torre, F. R.; Ferrari, L.; Salibian, A. *Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 2002; 131: 271-280.

De La Torre, F. R.; Ferrari, L.; Salibia, N A. *Biomarkers of a native fish species (Cnesterodon decemmaculatus) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina*. Chemosphere. 2005; 59(4): 577-583.

Dettbarn, W-D.; Yang, Z. P.; Milatovic, D. *Different role of carboxylesterases in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP*. Chemico-Biological Interactions. 1999; 119-120: 445-454.

Diaz, R. J.; Rosenberg, R. *Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna*. Oceanography and Marine Biology Annual Review. 1995; 33: 245-303.

Diggle, W. M.; Gage, J. C. *Cholinesterase Inhibition in vitro by OO-Diethyl O-p-nitrophenyl Thiophosphate (Parathion, E 605)*. The Biochemical Journal. 1951; 49: 491-494.

Doctor, B.P.; Blick, D.W.; Caranto, G.; Castro, C.A. Gentry, M.K.; Larrison, D.M.; Maxwell, D.M.; Murphy, M.R.; Schutz, M.; Wolfe, A.D. *Cholinesterases as scavengers for organophosphorous compounds: protection of primate performance against soman toxicity*. Chemical-Biological Interactions. 1993; 87: 285-293.

Dolinsky, V.W.; Glham, D.; Alam, M.; Vance, E.; Lehner, R. *Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism*. Cellular and Molecular Life Sciences. 2004; 61: 1633-1651.

Duysen, E.G.; Cashman, J. R.; Schopfer, L. M.; Nachon, F.; Masson, P.; Lockridge, O. *Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofura*. Chemico-Biological Interactions. 2011; 195: 189-198.

- Dyk, J. S. V.; Pletschke, B. *Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment*. Chemosphere. 2011; 82: 291-307.
- Echobicon, D. J. *Toxic effects of pesticides*. In: Casarett, L. J.; Andur, M. O.; Klaassaen, C. D. *et al.* (eds), Casarett & Doull's Toxicology: *The basic science of poisons*. 6 ed. New York, NY: McGraw-Hill Ed. 2001; p. 643-689.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology. 1961; 7: 88-95.
- Eto, M. *Biochemical mechanisms of insecticidal activities*. Chemistry of Plant Protection. 1990; 6: 65-107.
- Fraga, A. S. *Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase, e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados*. (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- Ferrari, A.; Venturino, A.; D'Angelo, A. M. P. *Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) detoxifying enzymes*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2007; 88: 134-142.
- Gabrielli, M. A.; Orsi, M. L. *Dispersão de Lernaea cyprinacea (Linnaeus) (Crustacea, Copepoda) na região norte do Estado do Paraná*. Revista Brasileira de Zoologia. 2000; 17: 395-399.
- Gaustad, R.; Johnsen, H.; Fonnum, F. *Carboxylesterase in guinea pig: A comparison of the different isoenzymes with regard to inhibition by organophosphorus compounds in vivo and in vitro*. Biochemical Pharmacology. 1991; 42: 1335-1343.
- Gershater, M.C.; Edwards, R. *Regulating biological activity in plants with carboxylesterases*. Plant Science. 2007; 173: 579–588.
- Guichard, S.; Terret, C.; Hennebelle, I.; Lochon, I.; Chevreau, P.; Frétigny, E.; Selves, J.; Chatelut, E.; Bugat, R.; Canal, P. *CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase I activities in tumor and normal colon and liver tissues*. British Journal of Cancer. 1999; 80 (3/4): 364-370.
- Handrick, R.; Rinhardt, S.; Focarete, M. L.; Scandola, M.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Jendrossek, D. *A new type of thermoalkalophilic hydrolase of Paucimonas lemoignei with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids*. The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276 (39): 36215-36224.
- Hannan, M. L.; Hagger, J. A.; Jones, M. B.; Galloway, T. S. *Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm Arenicola marina (Annelida: Polychaeta)*. Environmental Pollution. 2008; 152: 342-350.

Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology*. 3th ed. Raven Press Inc.: New York, 1994.

Helfrich, L. A.; Weigmann, D. L.; Hipkins, P.; Stinson, E. R. *Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems*. 24 pp. Disponível em: <<http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.html>>, 1996.

Hemingway, J., Ranson, H. *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. Annual Review of Entomology. 2000; 45: 371–391.

Holmes, R. S.; Cox, L. A.; Vandenberg, J. L. *Mammalian carboxylesterase 5: Comparative biochemistry and genomics*. Comparative Biochemistry and Physiology. 2008; Part D 3: 195-204.

Hyatt, J. L.; Tsurk An L.; Morton, C. L.; Yoon, K. J. P.; Harel, M.; Brumshtein, B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Wadkins, R. M.; Potter, P. M. *Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11*. Chemico-biological interactions. 2005; 157–158: 247–252.

Jokanovic, M. *Biotransformation of organophosphorus compounds*. Toxicology. 2001; 166: 139-160.

Laguerre, C.; Sanchez-Hernandez, J. C.; Kohler, H. R.; Triebkorn, R.; Capowiez, Y.; Rault, M.; Mazzia, C. *B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure*. Environmental Pollution. 2009; 157: 199–207.

Layer, P.G.; Allebrandt, K.; Andermann, P.; Bodur, E.; Boopathy, R.; Bytyqi, A.H.; Paraoanu, L.E. *On the multifunctionality of cholinesterases*. Chemical Biological Interactions. 2005; 157-158: 37-41.

Leite, C. A. C.; Florindo, L. H.; Kalinin, A. L.; Milsom, W. K.; Rantin, F. T. *Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the Neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus**. Journal of Comparative Physiology. 2007; A 193: 1001-1011.

Lejus, C.; Blanloeil, Y.; Burnat, P.; Souron, R. *Les cholinestérases*. Annales Françaises D'anesthésie et de Réanimation. 1998; 17: 1122-1135.

Li, B.; Sedlacek, M.; Manoharan, I.; Boopathy, R.; Duysen, E. G.; Masson, P.; Lockridge, O. *Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma*. Biochemical Pharmacology. 2005; 70: 1673-1684.

Macknes, B.; Durrington, P. N.; Mackness, M. I. *Human Serum Paraoxonase*. General Pharmacology. 1998; 31 (3): 329-336.

Masson, P.; Goldstein, B. N.; Debouzy, J. C.; Froment, M-T; Lockridge, O; Schopfer, L. M. *Damped oscillatory hysteretic behaviour of butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate*. European Journal of Biochemistry. 2004; 271 (1): 220-234.

- Masson, P.; Froment, M.; Gillon, E.; Nachon, F.; Darvesh, S.; Schopfer, L. M. *Kinetic analysis of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetanilides*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1774: 1139–1147.
- Masson, P.; Lockridge, O. *Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 494: 107–120.
- Massoulié, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F-M. *Molecular and cellular biology of cholinesterases*. *Progress in Neurobiology*. 1993; 41: 31-91.
- Matozzo, V.; Tomei, A.; Marin, M. G. *Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice*. *Marine Pollution Bulletin*. 2005; 50(12): 1686–1693.
- Maxwell, D. M. *The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1992; 114: 306-312.
- Mentem, J. O. *Evolução do consumo de agrotóxicos no Brasil (2003-2007): resumo com base em dados publicados pela ANDEF – Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas*. Disponível em: <<http://www.mmcbrazil.com.br/materiais/151009consumoagrotoxicosbr.pdf>>, 2008.
- McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M. *Nature and role of xenobiotic metabolizing esterases in rat liver, lung, skin and blood*. *Biochemical Pharmacology*. 1993; 45: 31-36.
- Morgan, E. W.; Yan, B.; Greenway, D.; Petersen, D. R.; Parkinson, A. *Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B)*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994; 315: 495-512.
- Nikinmaa, M.; Rees, B. B. *Oxygen-dependent gene expression in fishes*. *The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005; 288: 1079-1090.
- Oostr, R. V. D.; Beyer J.; Vermeulen N. P. E. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003; 13: 57-149.
- Okazaki, H.; Igarashi, M.; Nishi, M.; Tajima, M.; Sekiya, M.; Okazaki, S.; Yahagi, N.; Ohashi, K.; Tsukamoto, K.; Amemyia-Kudo, M.; Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yamada, N.; Aoki, J.; Morikawa, R.; Takanezawa, Y.; Arai, H.; Nagai, R.; Kadowaki, T.; Osuga, J.; Ishibashi, S. *Identification of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol: A potential role in adipocyte lipolysis*. *Diabetes*. 2006; 55: 2091-2097.
- Pacheco, P. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. [S.I.:s.n., 07/08/2009].1 p. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0 .php>.
- Petersen, D. R.; Doorn J. A. *Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets*. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 37 (7): 937-945.

Peterson, G. L. *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Analytical Biochemistry. 1977; 83: 346-356.

Potter, V. R., Elvehjem, C. A. *A modified method for the study of tissue oxidations*. The Journal of Biological Chemistry. 1936; 114: 495-504.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Transmissão colinérgica*. In: Rang & Dale: Farmacologia. 4 ed., Editora Guanabara Koogan S. A. 2001. Rio de Janeiro.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. *Transmissão colinérgica*. In: Rang & Dale: Farmacologia, 6 ed. Elsevier Medicina. 2007. Rio de Janeiro.

Rashid, N.; Shimada, Y.; Ezaki, S.; Atomi, H.; Imanaka, T. *Low-temperature lipase from Psychrotropic Pseudomonas sp. Strain KB700A*. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67 (9): 4064-4069.

Redinbo, M. R.; Potter, P. M. *Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics*. Drug discovery Today. 2005; 10 (5): 313-325.

Ricciardi, F.; Matozzo, V.; Binelli, A.; Marin, M. G. *Biomarker responses and contamination levels in crabs (Carcinus aestuarii) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments*. Water Research. 2010; 44: 1725–1736.

Santos, S. P. *A química dos inseticidas (parte I)*. Química. 2002; 85: 43-47.

Santos, S. P. *A química dos inseticidas (parte II)*. Química. 2002; 86: 37- 41.

Santos, V. M. R.; Donnici C. L.; Dacosta J. B. N.; Caixeiro J. M. R. *Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicação como inseticidas e agentes antitumorais*. Química Nova 30 (1). 2007; São Paulo, Jan/Fev.

Satoh, T. *Toxicological implications of esterases, from molecular structure to functions*. Toxicology and Applied Pharmacology 207: S11-S18, 2005.

Satoh, T.; Hosokawa, M. *Structure, function and regulation of carboxylesterases*. Chemical Biological Interactions. 2006; 162: 195-211.

Silva, E. S. *Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Soni, K. G.; Lehner, R.; Metalnikov, P.; O'Donnell, P.; Semache, M.; Gao, W.; Ashman, K.; Pshzhetsky, A. V.; Mitchell, G. A. *Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase*. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279 (39): 40683-40689.

Sonna, L. A.; Cullivan, M. L.; Sheldon, H. K.; Pratt, R.E.; Lilly, C. M. *The effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HEPG2)*. Physiological Genomics. 2003; 12 (3): 195-207.

Stedman, E.; Stedman, E.; Easson, L. Choline-esterase. *An enzyme present in the blood-serum of the horse Choline-esterase*. Biochemical Journal. 1932; 26: 2056-2066.

Stieger, S.; Gentinetta, R.; Brodbeck U. *Cholinesterases from flounder muscle*. European Journal of Biochemistry. 1989; 181: 633-642.

Sturn, A.; Silva de Assis, H. C.; Hansen, P.-D. *Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination*. Marine Environmental Research. 1999; 47: 389–398.

Veiga, M. M.; Silva, D. M.; Veiga, L. B. E.; Faria, M. V. C. *Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil*. Cadernos de Saúde Pública. 2006; 22(11): 2391-2399.

Vejares, S. G.; Sabat, P.; Sanchez-Hernandez, J. C. *Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in Lumbricus terrestris experimentally exposed to chlorpyrifos*. Comparative Biochemistry and Physiology. 2010; Part C 151: 351–359.

Weelock, C. E.; Eder, K. J.; Werner, I.; Huang, H.; Jones, P. D.; Brammell, B. F.; Elskus, A. A.; Hammock, B. D. *Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos*. Aquatic Toxicology. 2005; 74: 172-192.

Wolff, M. S.; McConnel, R.; Cedillo, L.; Rivera, M. *Dermal levels of methyl-paration, organochlorine pesticides, and acetylcholinesterase among formulators*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1992; 48 (5): 671-678.

Wu, R. S. S. *Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses*. Marine Pollution Bulletin. 2002; 45: 35-45.