

**Inibição in vitro de esterases de cascudo-marrom
(*Pterygoplichthys anisitsi*) de diferentes tamanhos pelo
inseticida organofosforado clorpirifos: uma atividade
prática de ecotoxicologia na Pós-Graduação em
Biodiversidade**

*In vitro inhibition of esterases from armoured catfish
(*Pterygoplichthys anisitsi*) with different sizes by the
organophosphate insecticide chlorpyrifos: a practical activity
of ecotoxicology in the Graduate Program in Biodiversity*

**Eduardo Alves de Almeida
Lilian Nogueira**

Recebido em 19 de maio, 2023 aceito em 22 de junho, 2023

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol16ed2.544>



RESUMO

Inseticidas organofosforados, como o clorpirifos, exercem sua toxicidade pela inibição de enzimas esterases, tais como a acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) em insetos e outros animais. Por isso, a avaliação da atividade destas enzimas é amplamente utilizada como biomarcadora da exposição de animais a estes tipos de compostos, em estudos de monitoramento ambiental. No presente estudo, a compreensão desses efeitos foi transmitida a alunos do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade da UNESP, por meio de experimento prático realizado na disciplina de Ecotoxicologia. Esses conceitos foram abordados por meio de uma avaliação comparativa entre os efeitos de inibição in vitro da AChE e da CbE pelo inseticida clorpirifos, em cascudos-marrom (*Pterygoplichthys anisitsi*) de três faixas diferentes de tamanho (10-14, 15-19 e 20-24 cm). Os resultados indicaram discrepâncias entre os valores de atividade enzimáticas entre os diferentes grupos de peixes. Ainda, animais menores foram mais sensíveis à inibição da AChE pelo clorpirifos, enquanto que os animais maiores foram mais sensíveis à inibição da CbE. Além de contribuir para o aprendizado dos alunos, o estudo trouxe dados inéditos sobre a sensibilidade de esterases de cascudos-marrom ao clorpirifos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Organofosforado. Cascudo-marrom. Esterases. Educação.

ABSTRACT

Organophosphate insecticides, such as chlorpyrifos, exert their toxicity by inhibiting esterase enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) in insects and other animals. Therefore, the evaluation of the activity of these enzymes is widely used as a biomarker of animal exposure to these types of compounds in environmental monitoring studies. In the present study, the understanding of these effects was transmitted to students of the Graduate Program in Biodiversity at UNESP, through a practical experiment carried out in the discipline of Ecotoxicology. These concepts were approached through a comparative evaluation between the in vitro inhibition effects of AChE and CbE by the insecticide chlorpyrifos, in brown catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) of three different size ranges (10-14, 15-19 and 20-24cm). The results indicated discrepancies between enzymatic activity values between different groups of fish. Also, smaller animals were more sensitive to AChE inhibition by chlorpyrifos, while larger animals were more sensitive to CbE inhibition. In addition to contributing to students' learning, the study brought unpublished data on the sensitivity of brown catfish esterases to chlorpyrifos.

Keywords: Ecotoxicology. Organophosphate. Armoured catfish. Esterases. Education.



1 INTRODUÇÃO

Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e os agrotóxicos, sendo que estas substâncias são as principais causas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Os agrotóxicos, quando aplicados sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos de água diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, causando efeitos adversos a organismos não alvo (COOPER, 1993).

Inseticidas organofosforados como o Clorpirifos vêm sendo amplamente utilizados como inseticida e parasiticida na agricultura e pecuária (Soares, 1998). Segundo Galloway (2002), os organofosforados exercem uma toxicidade aguda em animais aquáticos por inibição irreversível da acetilcolinesterase (AChE), uma serina hidrolase encontrada em junções neuromusculares, e outras classes de esterases como a carboxilesterase (CbE). As CbEs são uma família de enzimas presentes em vários tecidos de invertebrados e vertebrados que hidrolisam ésteres carboxílicos (WHEELOCK et al., 2008), tendo cada uma delas um substrato específico, seja ele endógeno ou xenobióticos contendo grupo éster (THOMPSON, 1999). Assim, a avaliação do grau de inibição dessas enzimas pode ser utilizada como um biomarcador para se indicar a presença de praguicidas organofosforados no ambiente.

Diversos estudos tem utilizado a inibição de esterases em peixes como indicador de exposição a organofosforados, porém poucos em espécies brasileiras, como o cascudo marrom (*Pterygoplichthys anisitsi*). Tal espécie ocorre na América do Sul, nas bacias do médio e alto Paraná, do Paraguai e Uruguai (LANGEANI; ARAÚJO, 1993). Alimenta-se de detritos e sedimentos, e devido a esse comportamento, este animal pode se alimentar do sedimento contaminado com o agrotóxico e, assim, ter suas esterases inibidas.

Entre as espécies de peixes existem consideráveis variações nas características fisiológicas e nas respostas dos biomarcadores (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dessa forma, este trabalho teve por objetivo verificar se o inseticida Clorpirifos causa inibição das esterases acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE), em



cascudos-marrons (*Pterygoplichthys anisitsi*) de diferentes tamanhos, observando assim se essa inibição é influenciada pelo tamanho do animal.

Este trabalho foi desenvolvido por alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto (SP), dentro das atividades práticas da disciplina de Biomarcadores Bioquímicos de Contaminação Ambiental. Desta forma, o trabalho teve como objetivo adicional e inerente uma demonstração prática da aplicabilidade de avaliação de atividades enzimáticas de peixes como biomarcador de contaminação ambiental. Além de auxiliar na contextualização da avaliação de biomarcadores em animais modelo em estudos de biomonitoramento ambiental, esta atividade permitiu aos alunos terem uma experiência prática em rotinas de laboratório de ecotoxicologia, realizando experimentos com animais, procedendo e compreendendo as análises e rotinas bioquímicas, aprendendo a analisar e interpretar dados e gerar resultados finais na forma de um artigo científico resumido.

2 METODOLOGIA

2.1 Procedimento experimental

A espécie de peixe utilizada para o experimento foi o cascudo marrom (*Pterygoplichthys anisitsi*), obtida junto ao Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal, SP. Três grupos de peixes (n=3) foram formados de acordo com o tamanho dos animais (Tabela 1). Após serem anestesiados com benzocaína, os peixes tiveram seus fígados e encéfalos dissecados e imediatamente armazenados a -80 °C. Este trabalho possui permissão da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto (CEUA-IBILCE/UNESP) (protocolo número 01/09 CEUA).



Tabela 1. Medidas dos peixes utilizados no experimento.

Grupo	Tamanho (cm)	Peso (g)
A: 10 a 14 cm	10,0	40,39
	12,0	54,22
	10,5	41,38
B: 15 a 19 cm	15,0	80,48
	16,0	93,70
	15,5	87,52
C: 20 a 24 cm	22,5	230,8
	20,0	186,34
	24,0	251,92

2.2 Teste de inibição *in vitro* das esterases pelo Clorpirifos

Para cada grupo foi feita uma mistura de amostras (pool) contendo fragmentos de fígado e outra contendo fragmentos de cérebro. Os conjuntos de amostra foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 na proporção de 1:4 (massa: volume) e centrifugados por 30 minutos a 9168 g, sob temperatura de 4 °C, resultando em cerca de 2 mL de extrato proteico. Em seguida, a porção sobrenadante foi coletada e dividida em diferentes alíquotas de 100 mL para as análises de acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE).

Foram feitas soluções de diferentes concentrações (0 a 10 mM) de Clorpirifos (<98% de pureza; Sigma-Aldrich) diluídas em etanol 100%. Essas soluções foram acrescentadas às amostras de extratos proteicos conforme a tabela 2. Em seguida, as amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Cada grupo foi constituído por 3 repetições de microtubos (triplicata), e as análises de cada microtubo foi realizada em duplicata.

Tabela 2. Protocolo de inibição dos extratos protéicos com concentrações crescentes do praguicida.

Grupos	Amostra (µL)	Solução 1 mM (µL)	Solução 10 mM (µL)	Solução 100 mM (µL)	Etanol (µL)	Concentração final (mM)



Controle	45	-	-	-	5	0,00
0,01	45	0,5	-	-	4,5	0,01
0,1	45	5	-	-	-	0,10
1	45	-	5	-	-	1,00
10	45	-	-	5	-	10,00

2.3 Análise das esterases e quantificação de proteínas

A análise da AChE no tecido nervoso e da CbE hepática foi feita pelo método de Ellman et al. (1961). Acetilcolina e feniltioacetato foram usados como substrato para a atividade da AChE e CbE, respectivamente. A reação do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) com os produtos formados pela catálise das enzimas com seus respectivos substratos foi medida por ensaio espectrofotométrico a 25 °C, 412 nm. A quantificação de proteínas para o cálculo da atividade específica foi medida pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

2.4. Análises Estatísticas

Os diferentes grupos amostrais foram comparados estatisticamente par a par pelo teste t de Student, e diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

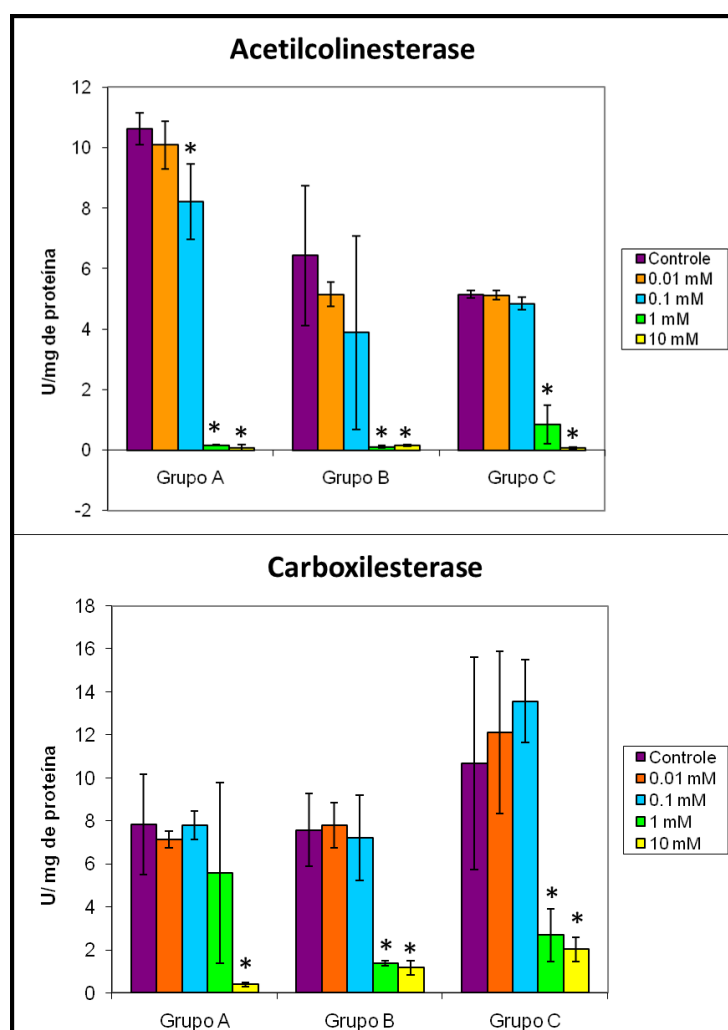
3 RESULTADOS

A atividade da AChE foi menor quanto maior foi o tamanho dos animais (Figura 1). Os grupos tratados com a concentração de Clorpirifos de 1 mM e 10 mM tiveram suas atividades significativamente reduzidas quando comparadas aos grupos controle e tratados com concentração 0,01 mM e 0,1 mM (Figura 1). Contrário ao resultado da AChE, a atividade da CbE foi maior no grupo de animais de maior tamanho. Nos grupos tratados com as concentrações de 1 mM e 10 mM também houve uma redução significativa da atividade enzimática com relação ao grupo controles e tratamentos com menor concentração. Estes dados evidenciam que a atividade duas das esterases avaliadas pode variar de acordo com o tamanho dos



animais. Quando comparados os grupos de peixes de tamanho intermediário (Grupo B) e de peixes maiores (Grupo C), não se notou diferenças quanto a sensibilidade das esterases à inibição pelo Clorpirifos. Entretanto, os animais do Grupo A apresentaram inibição leve, porém estatisticamente significativa, da AChE na concentração de 0,1 mM do inseticida, mostrando que essa enzima é mais sensível à inibição nos encéfalos de animais de menor tamanho. Por outro lado, a atividade da CbE no fígado deste mesmo grupo foi mais resistente à inibição, tendo sido inibida apenas quando os extratos foram tratados com 10 mM do Clorpirifos.

Figura 1. Atividade da acetilcolinesterase e da carboxilesterase em extratos proteicos de encéfalo e fígado, respectivamente, de tilápias do Nilo, após incubação com concentrações crescentes do inseticida Clorpirifos. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle.





4 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o inseticida Clorpirifos é capaz de inibir in vitro a atividade das esterases em cascudo-marrom, espécie cuja avaliação de esterases em estudos ambientais ainda é insipiente. Os resultados também mostraram que animais de diferentes tamanhos podem apresentar diferentes perfis de atividade das esterases, e sensibilidades à inibição pelo organofosforado testado. Este estudo contribuiu sobremaneira para o aprendizado a utilização e relevância da análise de marcadores bioquímicos em peixes como ferramentas para se avaliar a exposição desses animais a contaminantes ambientais, no caso do estudo, um inseticida organofosforado. Os alunos puderam entender o contexto do uso de biomarcadores em estudos de biomonitoramento, obtiveram experiência e vivência em laboratório de ecotoxicologia bioquímica, aprendendo também a interpretar os dados do trabalho, apresentando-os na forma do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRADFORD, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. In: **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.
2. COOPER, C. M. 1993. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems. A review. **Journal of Environmental Quality**, 22: 402-408.
3. ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D.; ANDRES Jr., V.; FEATHERS-STONE, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7: 88-95.
4. GALLOWAY, T. S.; MILLWARD, N.; BROWN M. A.; DEPLEDGE M. H. 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. In: **Aquatic Toxicology**. s/l. p. 169-180.
5. LANGEANI, F.; ARAÚJO, R. B. 1993. *Liposarcus weberi* sp. n., um novo Loricariidae (Ostariophysi, Siluriformes) da bacia do Alto Paraná, Brasil. In: **Projeto Cascudo, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto.**



6. SOARES, L. F. 1998. **Intoxicações agudas por carbamatos em pediatria. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos.** Originalmente apresentada como monografia do curso de especialização em pediatria, UFF.
7. THOMPSON, H. M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamate. **Ecotoxicology**. 8: 369-384.
8. VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. In: **Environmental Toxicology and Pharmacology**. s/l. p. 57-149.
9. WHEELOCK, C. E., EDER KJ, WERMER I., HUANG H., JONES P. D., BRAMMELL B. F., ELSKUS A. A., HAMMOCK B. D. et al. 2005. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpirifos. **Aquatic Toxicology**. 74 (2): 172-192.