

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lígia Sampaio Lanzarin

**Características cinéticas da acetilcolinesterase de Rã touro (*Lithobates catesbeianus*) e Sapo cururu (*Rhinella icterica*) e sua sensibilidade ao glifosato**

Florianópolis

2022

Lígia Sampaio Lanzarin

Características cinéticas da acetilcolinesterase de Rã touro (*Lithobates catesbeianus*) e Sapo cururu (*Rhinella icterica*) e sua sensibilidade ao glifosato

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Coorientador: Dra. Daína de Lima

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor.

Orientações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Lígia Sampaio Lanzarin

**Características cinéticas das colinesterases de Rã touro (*Lithobates catesbeianus*) e Sapo cururu (*Rhinella icterica*) e sua sensibilidade ao glifosato**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso o Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 08 de março de 2022.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela Cristina de Toni  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas  
Avaliadora  
Universidade do Estado de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida  
Avaliador  
Universidade Regional de Blumenau

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por sempre me incentivar a ser quem eu realmente sou e me apoiar durante toda a minha vida.

Agradeço as pessoas que compartilharam essa jornada acadêmica comigo na UFSC, em especial ao Rossito, Gu, Rafa, Alisson, Laura, Garbo e Vilmar. Foram muitas conversas, trabalhos e copos compartilhados

Agradeço aos integrantes do LEAR, ao Professor Selvino e ao Dr. Vitor Carvalho, que me ajudaram muito na elaboração do projeto. Um agradecimento especial ao Kauan e ao Edu, que me acompanharam no campo e a Saty e a Sophia, que me ajudaram no início da minha jornada.

Quero agradecer aos pesquisadores do LABCAI, que foram como uma segunda família para mim. Ao Jacó que me ajudou não só na elaboração do projeto, mas a entender o caminho que queria seguir na pesquisa. A Bárbara e ao Clei por sempre tornarem o ambiente do lab mais leve. A Camis, Vera e ao Miguel, por sempre tentarem me pôr para cima e compartilharem dos dramas da pesquisa.

Quero agradecer aos meus companheiros de projeto, Luiza, Thiago e Giulia, por serem uma equipe de IC's incríveis.

Quero agradecer ao meu Orientador, Professor Afonso, por me dar liberdade de trabalhar da forma como eu achava correta e me dar o suporte necessário para terminar a minha pesquisa. Quero agradecer a minha coorientadora e amiga, Daína, que me fez rir, chorar e me sentir realizada em todo o caminho da produção desse TCC, esse trabalho não existiria sem ela e tenho certeza que a influência dela vai ser sentida em toda a minha jornada acadêmica.

Quero agradecer enfim, a todos os amigos que fiz ao longo dos meus anos em Floripa, muitas vezes me vi fraquejando frente aos desafios da vida, e eles foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui. De coração, obrigada Maria pelas conversas e rolês aleatórios, obrigada Soninha, pelas jantas e papos profundos. Obrigada Mari, Xu, Verônica e Isa, pelas noites de trabalho suado que sempre se tornavam mais engraçadas. Obrigada Andressa e Rodrigo por todas as memórias boas.

No fim, gostaria de agradecer a mim e a todos que trouxeram algo de positivo para minha vida ao longo desses anos de faculdade, quem tem amigo tem tudo.

## RESUMO

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o uso indiscriminado destes compostos está relacionado com diversos problemas ambientais. O glifosato é o defensivo agrícola mais comercializado no Brasil e a exposição a este agrotóxico pode gerar distúrbios na fauna nativa do país. O uso de biomarcadores é vital na área de ecotoxicologia pois é uma ferramenta eficiente de análise dos efeitos em estágios iniciais da contaminação em organismos. As colinesterases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de colina atuando como moduladores do sistema nervoso colinérgico. Sua atividade é inibida por agrotóxicos organofosforados e carbamatos, tornando essa classe de enzimas importantes biomarcadores dos efeitos causados por estes compostos. O sapo cururu (*Rhinella icterica*) é um anuro nativo da região da Mata Atlântica e a Rã touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie invasora, originária da América do Norte. A ampla distribuição e abundância de indivíduos faz dessas espécies bons modelos para estudos de avaliação de contaminação ambiental. Este estudo foi realizado para se obter o perfil cinético das colinesterases de *R. icterica* e *L. catesbeianus* e também para avaliar sua sensibilidade ao glifosato. Foi avaliada a atividade catalítica da acetilcolinesterase de cérebro, fígado, músculo e pele de ambas as espécies (n = 12) utilizando o método colorimétrico de Ellman com 10 diferentes concentrações de iodeto de acetiltiocolina, variando de 0,0156 mM a 8 mM. Em *R. icterica*, o tecido que apresentou maior atividade foi o cérebro, com valor de  $V_{max} = 93,81 \pm 2,38$  mU/mg e  $K_{mapp} = 0,286 \pm 0,029$  mM, o mesmo foi observado em *L. catesbeianus* com o cérebro apresentando  $V_{max} = 108,7 \pm 2,87$  mU/mg e  $K_{mapp} = 0,2789 \pm 0,030$  mM. O ensaio de exposição ao glifosato foi realizado incubando por 30 min o pool de cérebro de ambas as espécies com soluções de 500 µg/L e 700 µg/L do composto. Nenhuma alteração na atividade destas enzimas foi observada quando incubadas com glifosato. Podemos concluir que o cérebro é o tecido mais indicado para ensaios que busquem avaliar o efeito inibitório de contaminantes nas colinesterases. Considerando o modelo utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos, sugere-se que a concentração ideal de substrato para o ensaio de atividade de colinesterases no cérebro é de 2,8 mM tanto para *R. icterica* quanto para *R. catesbeiana*, ou seja, aproximadamente 10 vezes o  $K_{mapp}$  obtido nas análises. Mais estudos devem ser realizados para determinar o potencial das colinesterases como biomarcadores de exposição ao glifosato em anuros.

**Palavras-chave:** Anuros. Acetilcolinesterase. Glifosato. Biomarcadores.

## ABSTRACT

Brazil is the largest consumer of pesticides in the world and the indiscriminate use of these compounds is related to several environmental problems. Glyphosate is the most commercialized agricultural pesticide in the country and exposure to this pesticide can cause disturbances in the country's native fauna. The use of biomarkers is vital in the field of ecotoxicology as it is an efficient tool for analyzing the effects in early stages of contamination in organisms. Cholinesterases are enzymes that catalyze the hydrolysis of choline esters acting as modulators of the cholinergic nervous system. Its activity is inhibited by organophosphate pesticides and carbamates, making this class of enzymes important biomarkers of the effects caused by these compounds. The cane toad (*Rhinella icterica*) is an anuran native to the Atlantic Forest region and the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is an invasive species, native to North America. The wide distribution and abundance of individuals make these species good models for environmental contamination assessment studies. This study was carried out to obtain the kinetic profile of cholinesterases from *R. icterica* and *L. catesbeianus* and also to assess their sensitivity to glyphosate. The catalytic activity of brain, liver, muscle and skin acetylcholinesterases of both species (n =12) were evaluated using the Ellman colorimetric method with 10 different concentrations of acetylthiocholine iodide, ranging from 0.0156 mM to 8 mM. In *R. icterica*, the tissue that showed the highest activity was the brain, with a value of  $V_{max} = 93.81 \pm 2.38$  mU/mg and  $K_{mapp} = 0.286 \pm 0.029$  mM, the same was observed in *L. catesbeianus* with the brain showing  $V_{max} = 108.7 \pm 2.87$  mU/mg and  $K_{mapp} = 0.2789 \pm 0.030$  mM. The glyphosate exposure assay was performed by incubating the brain pool of both species for 30 min with solutions of 500  $\mu$ g/L and 700  $\mu$ g/L of the compound. No changes in enzyme activity incubate with glyphosate were observed. We can conclude that the brain is the most suitable tissue for assays that seek to evaluate the inhibitory effect of contaminants on cholinesterases. Considering the model used to obtain the kinetic parameters, it is suggested that the ideal concentration of substrate for the assay of cholinesterase activity in the brain is 2.8 mM for both *R. icterica* and *R. catesbeiana*, that is, approximately 10-fold the  $K_{mapp}$  obtained in the analyses. More studies should be carried out to determine the potential of cholinesterases as biomarkers of glyphosate exposure in anurans.

**Keywords:** Anurans. Acetylcholinesterase. Glyphosate. Biomarkers.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de um indivíduo da espécie <i>Rhinella icterica</i> .....	17
Figura 2 – Imagem de um indivíduo da espécie <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	17
Figura 3 – Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em cérebro de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	25
Figura 4 – Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em músculo <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	26
Figura 5 – Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em fígado de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	26
Figura 6 – Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em pele de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	27
Figura 7 – Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> na presença de concentrações crescentes de eserina.....	28
Figura 8 – Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> na presença de concentrações crescentes de BW284C51.....	28
Figura 9 – Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> na presença de concentrações crescentes de ISO-OMPA.....	29
Figura 10 – Atividade de colinesterases do cérebro de <i>R. icterica</i> e <i>L. catesbeianus</i> , incubadas com diferentes concentrações de glifosato .....	29
Figura 11 – Atividade média de acetilcolinesterase em cérebro de <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos de acetilcolinesterase em <i>Rhinella icterica</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	<b>28</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA-UFSC – Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC

DTT – DL-ditioneitol

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético

K<sub>m</sub> – Constante de Michaelis-Menten

K<sub>mapp</sub> – K<sub>m</sub> aparente

LABCAI – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica

M – Molar

mg – Miligrama(s)

min – Minuto(s)

mL – Mililitro(s)

mM – Milimolar

n – Número amostral

nm – Nanômetro(s)

p – Probabilidade de significância

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – picomol (10<sup>-12</sup> mol)

PMSF – Fluoreto de fenilmetano sulfonilo

V<sub>máx</sub> – Velocidade Máxima da reação enzimática

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	agrotóxicos e seus efeitos na diversidade de anfíbios .....	15
1.2	Biomarcadores .....	18
1.3	COLINESTERASES E SEU PAPEL NA ECOTOXICOLOGIA .....	18
1.5	OBJETIVOS .....	20
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
2.1	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	22
2.2	EXTRAÇÃO DAS COLINESTERASES .....	22
2.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	23
2.4	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ACETILCOLINESTERASE .....	23
2.5	PERFIL DE INIBIÇÃO DAS COLINESTERASES .....	24
2.6	ENSAIO COM GLIFOSATO .....	24
2.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	25
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>ATIVIDADE DE COLINESTERASES NOS DIFERENTES TECIDOS DE <i>L. catesbeianus</i> E <i>R. icterica</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR INIBIÇÃO E SENSIBILIDADE AO GLIFOSATO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>ATIVIDADE MÉDIA DA ACETILCOLINESTERASE .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AGROTÓXICOS E SEUS EFEITOS NA DIVERSIDADE DE ANFÍBIOS

O Brasil é um dos maiores exportadores de alimentos do mundo e a produção agrícola possui um papel essencial na economia do país. O sistema de plantio brasileiro é altamente dependente do uso de agrotóxicos, fazendo com que o Brasil seja o maior consumidor destes compostos no mundo (PIGNATI et al., 2017). A população mundial tem estado em franco crescimento desde a revolução industrial, esse crescimento veio acompanhado de uma demanda alimentar maior e ressaltou a necessidade de expandir e melhorar o rendimento agrícola, levando a maiores taxas de desmatamento e ao uso indiscriminado de agrotóxicos nas lavouras brasileiras. Esta expansão do agronegócio no país gera uma série de problemas no espectro ambiental e de saúde pública, tornando essa problemática especialmente preocupante do ponto de vista de conservação ambiental.

A contaminação ambiental causada por defensivos agrícolas compromete a qualidade de água e alimentos e causa desequilíbrios ecológicos (CLÉSSIA VIEIRA BELCHIOR et al., [s.d.]). O número de agrotóxicos liberados pelo governo brasileiro tem aumentado anualmente desde 2016, com o ano de 2021 batendo o recorde de compostos registrados pelo Ministério da Agricultura, tendo 500 defensivos novos aprovados ao longo do ano (AGROFIT, 2022). Segundo dados da Sisagua (Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano), uma em cada quatro cidades brasileiras apresentam água contaminada por agrotóxicos. Alguns contaminantes encontrados, como a atrazina ou o mancozebe, estão relacionados com distúrbios de desenvolvimento e do metabolismo de anuros (FALFUSHINSKA; ROMANCHUK; STOLYAR, 2008). Entre os compostos detectados, encontra-se também o glifosato, avaliado como fortemente genotóxico e provavelmente cancerígeno pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) (International Agency for Research on Cancer, 2015). Estudos apontam que a exposição a glifosato pode aumentar os riscos de formação de linfomas de não-Hodgkins em humanos (ZHANG et al., 2019).

O glifosato é um herbicida sistêmico de amplo espectro muito utilizado em culturas de milho e de soja (PIGNATI et al., 2017). O mecanismo de toxicidade do glifosato envolve a inibição da enzima reguladora 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que está envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos pela via bioquímica do chiquimato de plantas

e microrganismos (AMRHEIN et al., 1980). Atualmente é o herbicida mais comercializado do Brasil, tendo sido vendidas 173 mil toneladas em 2017 (G1, 2019). Estudos com girinos de *Leptodactylus latrans* demonstraram que a exposição a glifosato pode levar a danos hepáticos em anuros (BACH et al., 2018) e Pavan et al. demonstrou que a contaminação combinada de glifosato com 2,4-D leva a mudanças na natação e danos ao intestino de girinos de *L. latrans* e *Boana faber*. (PAVAN et al., 2021). O efeito genotóxico do glifosato também foi observado em anuros, com estudos *in vivo* mostrando que a exposição à glifosato induz a formação de micronúcleos em girinos (HEREK et al., 2021; YADAV et al., 2013).

Segundo dados da IUCN (2019), a população mundial de anfíbios encontra-se em declínio, fazendo com que essa classe de animais seja considerada a mais ameaçada atualmente entre os vertebrados. Diversos fatores são apontados como causadores dessa problemática, como mudanças na temperatura relacionadas ao aquecimento global, perda de habitat, doenças e poluição. O Brasil é um dos países com maior diversidade de espécies endêmicas de anfíbios no mundo, com a maior parte das suas ecorregiões abrigando mais de 100 espécies desses animais.

*Rhinella icterica* (SPIX, 2011) (Figura 1), também conhecida popularmente como sapo cururu, é um anuro pertencente à família Bufonidae de ampla distribuição no território brasileiro, podendo ser encontrado em diversos habitats, desde florestas fechadas a campos abertos (AMPHIBIAWEB, 2022). Sua alimentação é generalista, sendo composta principalmente por insetos, mas podendo se estender até pequenos roedores e aves. Sua reprodução ocorre em corpos d'água rasos, no período de Agosto a Janeiro. Segundo a IUCN (2022), esta é uma espécie de população abundante e não se encontra na lista de espécies de anfíbios ameaçadas no país.

Figura 1- **Imagem** de um indivíduo da espécie *Rhinella icterica*



©2001 Germano Woehl Jr.

A rã-touro (Figura 2), *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), é considerada uma espécie invasora no Brasil, nativo da América do Norte que foi introduzida no país em 1935 com o intuito de se tornar um animal de consumo comercial. É um animal carnívoro de apetite voraz e altamente competitivo, o que torna a presença desta espécie no país um problema ambiental (INSTITUTO RÃ BUGIO, 2022).

Figura 2 – Imagem de um indivíduo da espécie *Lithobates catesbeianus*



©2005 John White

Considerando sua alta prevalência e facilidade de obtenção, as espécies *R.icterica* e *L.catesbeianus* podem ser consideradas boas candidatas como organismos modelo para estudos que abordem o impacto da contaminação química na anurofauna brasileira.

## 1.2 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são considerados ferramentas importantes em trabalhos de monitoramento ambiental pois seu uso permite uma avaliação segura da extensão dos danos causados pela contaminação ambiental em seus organismos alvo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, [s.d.]).

Biomarcadores podem ser definidos como mudanças na resposta biológica de um organismo exposto a componentes tóxicos ambientais, podendo ser respostas moleculares, bioquímicas ou fisiológicas (PEAKALL, 1994). Biomarcadores podem ser divididos em 3 classes: de exposição, efeito e susceptibilidade. **Biomarcadores de exposição** são definidos pela identificação e mensuração de um xenobiótico ou seu metabólito em um organismo, ou o possível produto da sua interação com moléculas endógenas. **Biomarcadores de efeito** aferem alteração na fisiologia de um organismo que podem ser associadas a doenças ou transtornos de saúde em geral. **Biomarcadores de susceptibilidade** tratam da sensibilidade de um organismo a exposição a xenobióticos, são, como o nome já diz, indicadores da sua susceptibilidade a responder a determinado composto (NRC: COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987).

Diversos biomarcadores de efeito são utilizados atualmente para avaliar a exposição a pesticidas em organismos não-alvo. Enzimas do sistema antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) são conhecidos biomarcadores de exposição a inseticidas como o Phoxim e o Carbaril (HAN et al., 2017). Também é bem estabelecido na literatura que a atividade de colinesterases (ChE's) é usualmente inibida pela exposição a pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos (GONÇALVES et al., 2021).

## 1.3 COLINESTERASES E SEU PAPEL NA ECOTOXICOLOGIA



As colinesterases (ChE), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de ésteres de colina. As ChE de vertebrados são muito distintas em expressão, forma e atividade catalítica, podendo ser encontradas em formas globulares ou assimétricas, solúveis, anfifílicas ou hidrofóbicas. As ChE globulares podem estar associadas a membranas por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou outros tipos de âncoras hidrofóbicas, enquanto as formas assimétricas desta enzima são caracterizadas por uma cauda de colágeno que pode estar ligada a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos (formas A4, A8 e A12, respectivamente) (MASSOULIÉ et al., 1993).

A AChE é uma enzima abundante em junções neuromusculares, no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Periférico (SNP). A AChE possui um papel crucial na regulação do sistema de comunicação neuronal colinérgico, pois catalisa a degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, interrompendo o impulso nervoso na sinapse (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

A BChE (também conhecida como pseudocolinesterase), assim como a AChE, está presente no SNC e no SNP de vertebrados, mas pode também ser encontrada no plasma sanguíneo. É uma enzima que atua como co-reguladora do sistema de neurotransmissão colinérgico (DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003). Sua ausência ou inibição farmacológica não incorre em alterações físicas significativas em organismos adultos, fazendo com que sua principal função se mantenha desconhecida (MASSOULIÉ et al., 1993). Estudos investigando a expressão gênica de butirilcolinesterase em células embrionárias de retina sugerem que esta enzima possui um papel importante durante a neurogênese (MACK; ROBITZKI, [s.d.]).

A presença de colinesterases em órgãos com baixa prevalência de neurônios colinérgicos, sugere que estas enzimas executam também funções biológicas não relacionadas ao seu papel principal como reguladores de sinapses colinérgicas (SILMAN, 2021). A indução da expressão de certas variantes de acetilcolinesterase durante a apoptose em diversas linhagens celulares indica que essa enzima possui um importante papel neste processo (ZHANG et al., 2002). Estudos também demonstram haver variações na expressão e atividade de colinesterases durante a formação de tumores (FERNANDA MONTENEGRO et al., [s.d.]; GNATT et al., 1983; VIDAL, 2005).

A variação da atividade destas enzimas tem sido amplamente utilizada no ramo da ecotoxicologia como biomarcador de neurotoxicidade. Sua inibição por contaminação mediante a exposição a agentes anticolinérgicos, como organofosforados e carbamatos já foi demonstrada em estudos envolvendo variados modelos animais, tais como peixes, anelídeos e sapos

(DENOYELLE et al., 2007; MENNILLO et al., 2017; PEREIRA et al., 2019; WIDDER; BIDWELL, 2008). No entanto, detergentes, metais e óleos também afetaram a atividade de colinesterases (DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013) mostrando que seu potencial como biomarcador é mais abrangente do que proposto originalmente.

Devido a seu papel como reguladoras de sinapses em junções neuromotoras, a inibição da atividade de colinesterases mediante a exposição a pesticidas já foi relacionada a diminuição da atividade locomotora de aves e peixes (BEAUVAIS et al., 2004; HART, 1993) e a redução na velocidade de natação e comportamento de fuga frente a predadores em anfíbios ((BRIDGES, 1997, 2006)

Considerando a alta taxa de contaminação por pesticidas aos quais são expostos os anfíbios em território nacional, tanto na matriz aquática quanto na matriz terrestre, vê-se uma necessidade de se realizar estudos avaliando os efeitos de tal contaminação nestes animais. Atualmente na literatura há uma carência de trabalhos com anuros que avaliem a cinética de enzimas utilizadas como biomarcadores, como a acetilcolinesterase, com o intuito de se realizar a padronização do ensaio enzimático para essa classe de animais e com isso poder realizar ensaios de exposição a contaminantes de forma mais segura e eficiente. Ao se investigar a atividade de acetilcolinesterase e os efeitos da exposição *in vitro* ao glifosato nesta enzima, utilizando duas espécies, uma nativa (*Rhinella icterica*) e uma invasora (*Lithobates catesbeianus*), é possível também estabelecer comparações entre esses animais que possam ajudar a elucidar o papel de diferenças fisiológicas na dinâmica entre espécies invasoras e espécies nativas.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade das colinesterases de duas espécies de anuros: *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* e sua sensibilidade ao glifosato.

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- Analisar a atividade de AChE em cérebro, pele, fígado e músculo de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus*.
- Calcular a constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_m$  app) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) das colinesterases das espécies alvo.
- Testar o efeito *in vitro* do glifosato na atividade das colinesterases das espécies utilizadas neste estudo.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 8605251119 na data 13/03/2020. Foram utilizados ao total 24 animais adultos, machos e fêmeas, 12 da espécie *Rhinella icterica* e 12 da espécie *Lithobates catesbeianus*.

Os indivíduos da espécie *R. icterica* foram capturados dentro das dependências do Parque Nacional de São Joaquim, localizado no planalto Sul de Santa Catarina, com a devida licença de coleta fornecida pelo ICMBio ao Pro. Selvino Neckel, sob o nº 42249-7. O método de coleta dos animais foi por meio de busca visual ativa à noite (HEYER et al., 2014). Os animais foram transportados em sacolas plásticas transparentes e livres de perfurações, com parte do substrato do ambiente onde foram recolhidos para manter a umidade e temperatura confortável para o animal. As sacolas foram abertas para renovação do ar periodicamente. Os animais foram armazenados abrigados do calor e da irradiação solar em caixas de isopor. Após a coleta de todos os animais, eles foram transportados e eutanasiados nas dependências do dormitório do próprio parque.

Os indivíduos da espécie *L. catesbeianus* foram adquiridos em um ranário comercial em Jaraguá do Sul – Santa Catarina e sua eutanásia foi realizada no mesmo local.

Os animais foram eutanasiados por meio de uma injeção de lidocaína (entre 0,1 a 1,0 mL, dependendo do tamanho do animal) na cavidade pleuroperitoneal. Após a eutanásia foi realizada a biometria e dissecação dos animais, sendo retiradas amostras de cérebro, fígado, pele e músculo das pernas que posteriormente foram armazenadas em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 EXTRAÇÃO DAS COLINESTERASES

A homogeneização foi realizada individualmente, com 100 mg de tecido (cérebro, músculo, pele e fígado) imersos em tampão (Tris-HCl 0,1 M, DTT 1 mM, pH 8,0), na proporção 1:5 (m:v). O tecido foi macerado com o auxílio do homogeneizador TissueTearor (Biospec), com as amostras mantidas no gelo para evitar degradação por aquecimento. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 30 min à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante transferido para um microtubo e armazenado no freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para as análises posteriores.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas totais da fração sobrenadante de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), por meio de uma leitura pontual a 595 nm no espectrofluorímetro (SpectraMax, Molecular Devices). A absorbância das amostras foi então comparada com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) para a obtenção do valor da concentração de proteínas de cada amostra.

### 2.4 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ACETILCOLINESTERASE

A atividade catalítica das colinesterases foi determinada pelo método colorimétrico de Ellman (ELLMAN et al., 1961) em que o aumento da coloração amarela do meio de reação, causada pela conjugação de tiocolina com DTNB, foi avaliado por leituras a cada 15 segundos, no tempo total de 3 minutos, no comprimento de onda 412 nm a 25 °C.

O ensaio foi feito em microplacas de 96 poços transparentes de fundo plano (Greiner Bio-One) utilizando o espectrofluorímetro (SpectraMax, Molecular Devices).

Os parâmetros cinéticos analisados neste trabalho foram o  $V_{m\acute{a}x}$ , ou velocidade máxima, que é compreendida como a maior velocidade de reação de uma enzima na presença de uma determinada concentração de substrato e  $K_m$ , ou constante de Michaelis-Menten, é a concentração de substrato ideal para se obter metade do  $V_{m\acute{a}x}$  de uma enzima e pode ser considerada uma medida de afinidade de uma enzima a determinado substrato. Portanto para se obter o  $K_{mapp}$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da acetilcolinesterase de cada tecido, ensaios com 10 diferentes concentrações finais de iodeto de acetiltiocolina foram realizados (0,015; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8). Ensaios foram feitos utilizando solução de DNTB estoque de 0,455 Mm. Os brancos para cada concentração foram feitos para avaliar absorbância da solução de DNTB em conjugação com o iodeto de acetiltiocolina apenas.

Os reagentes foram solubilizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0 e mantidos em banho-maria a 25 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata, com pools feitos com as 12 amostras de cada tecido. Foram pipetados 50 µg de proteínas totais de pele, músculo e fígado e 25 µg de proteínas totais de cérebro em cada poço.

A atividade AChE foi expressa em mU/mg proteína e calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$Atividade = \left( \frac{(mAbs/min) \times Vtotal}{[prot] \times Vamostra \times \varepsilon} \right)$$

Onde:

mAbs/min = variação da absorbância da amostra

Vtotal = volume final da reação

[prot] = concentração de proteínas da amostra

Vamostra = volume de amostra

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar do DTNB ( $\varepsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) em 412 nm

## 2.5 PERFIL DE INIBIÇÃO DAS COLINESTERASES

O perfil de inibição das colinesterases foi realizado avaliando sua atividade em microplaca em conjunto com os inibidores: i) hemissulfato de eserina (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{M}$ ), como inibidor de colinesterases, ii) BW284C51 (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{M}$ ), como inibidor de acetilcolinesterase e iii) Iso-OMPA (0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mM), como inibidor de butirilcolinesterase.

Apenas amostras do cérebro de ambas as espécies foram utilizadas para os ensaios com inibidores. A concentração de acetioticolina ideal para a análise foi definida de acordo com os resultados de  $K_{mapp}$  obtidos nos ensaios de caracterização, seguindo as recomendações de Bisswanger (2014) para ensaios enzimáticos, que considera que a concentração ideal de substrato para um ensaio é 5 a 10 vezes maior que o  $K_{mapp}$  obtido.

As amostras foram incubadas por 30 minutos na presença dos inibidores e após isso o ensaio seguiu conforme descrito na sessão de caracterização de atividade.

## 2.6 ENSAIO COM GLIFOSATO

Para avaliar os efeitos do glifosato na atividade enzimática em cérebro de ambas as espécies, foram utilizadas duas concentrações finais do composto: 500  $\mu\text{g/L}$ , que é o limite legal de glifosato aceito na água potável brasileira, e 700  $\mu\text{g/L}$ , que é a concentração máxima aceita desse composto nos Estados Unidos (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1995).

As soluções de ambas as concentrações de glifosato foram incubadas com o pool de amostras ( $n = 12$ ), por 30 min à 25 °C. Após esse período, o ensaio foi feito conforme descrito na sessão de caracterização de atividade.

## 2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a obtenção do  $K_{mapp}$  e  $V_{máx}$  o conjunto de dados referentes a cada tecido de ambas as espécies foi calculado utilizando regressão não-linear ajustado ao modelo de Michaelis-Menten. Os dados de atividade média de *R. icterica* e *L. catesbeianus* foram submetidos a análise de normalidade (Teste de d'Agostino) e após cumprirem os requisitos de normalidade os valores foram calculados utilizando o teste t para dados paramétricos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 7 para Windows.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ATIVIDADE DE COLINESTERASES NOS DIFERENTES TECIDOS DE *L. CATESBEIANUS* E *R. ICTERICA*

As atividades da AChE no cérebro de ambas as espécies estudadas apresentaram um aumento proporcional à concentração de iodeto de acetiltiocolina utilizada. O cérebro foi o tecido com maior atividade de AChE em *L. catesbeianus* e *R. icterica*. Sua atividade se enquadrou no modelo de velocidade vs. substrato de Michaelis-Menten, e foi observado um  $V_{m\acute{a}x}$  de  $= 93,81 \pm 2,38$  mU/mg e um  $K_{mapp}$  de  $= 0,286 \pm 0,029$  mM em *R. icterica* e, em *L. catesbeianus* foi observado um  $V_{m\acute{a}x} = 108,7 \pm 2,87$  mU/mg e  $K_{mapp} = 0,2789 \pm 0,030$  mM (Figura 3). De acordo com esse modelo, a concentração de substrato nos ensaios deve ser 5-10 vezes o valor de  $K_m$ . Dessa forma, foi definida a concentração de 2,8 mM de acetiltiocolina para todos os ensaios de atividade da AChE, em *R. icterica* e *L. catesbeianus*.

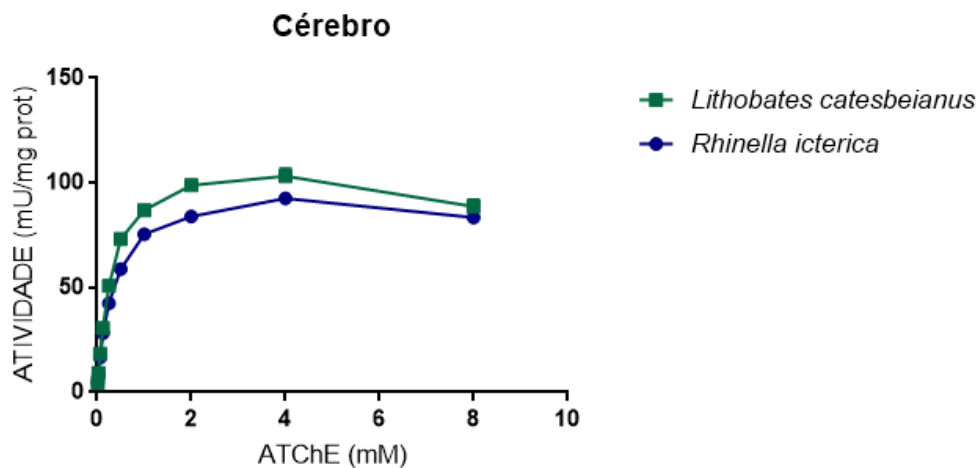


Figura 3: Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* elaborada com concentrações crescentes de acetiltiocolina (0,015 a 8 mM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

A atividade de AChE em músculo de *R. icterica* não apresentou saturação por substrato e teve uma atividade baixa comparado a outros tecidos. Em *L. catesbeianus* este tecido também apresentou baixa atividade quando comparado a outros tecidos. Em *R. icterica* esse tecido apresentou  $V_{m\acute{a}x} = 25,24 \pm 3,77$  mU/mg proteína e  $K_{mapp} = 1,740 \pm 0,697$  mM e em *L. catesbeianus*  $V_{m\acute{a}x} = 4,62 \pm 0,63$  mU/mg e  $K_{mapp} = 0,21 \pm 0,11$  mM (Figura 4).



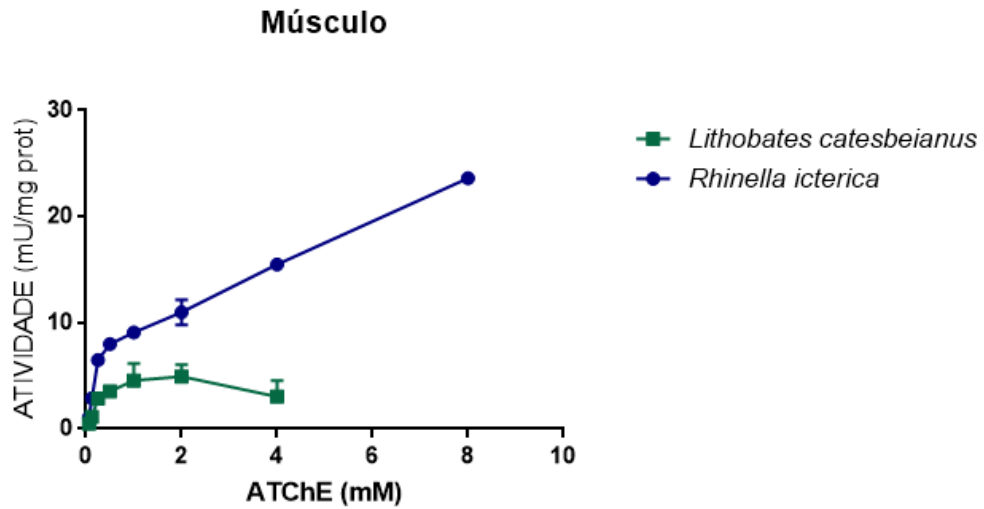


Figura 4: Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em músculo *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* elaborada com concentrações crescentes de acetiotiocolina (0,015 a 8 mM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

Nas análises realizadas em fígado de *R. icterica* foi observada uma  $V_{m\acute{a}x} = 31,35 \pm 0,82$  mU/mg proteína e  $K_{mapp} = 0,474 \pm 0,046$  mM, enquanto que em *L. catesbeianus* a  $V_{m\acute{a}x}$  foi  $44,16 \pm 2,88$  mU/mg e  $K_{mapp} = 0,1487 \pm 0,044$  mM (Figura 5).

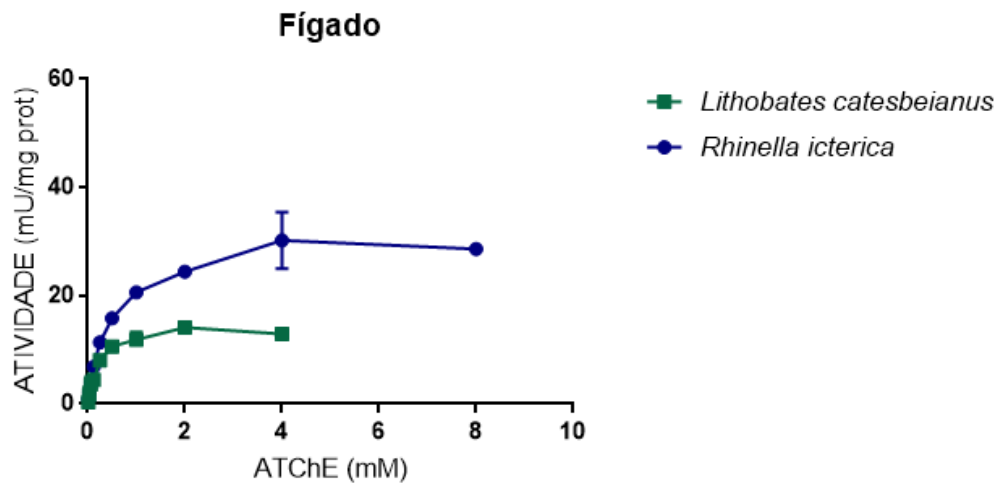


Figura 5: Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em fígado de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* elaborada com concentrações crescentes de acetiotiocolina (0,015 a 8 mM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

Os parâmetros cinéticos da AChE em pele de *R. icterica* foram  $V_{max} = 38,13 \pm 1,45$  mU/mg proteína e  $K_{mapp} = 0,984 \pm 0,117$  mM. *L. catesbeianus* apresentou um  $V_{max} = 18,67 \pm 2,524$  mU/mg proteína e  $K_{mapp} = 1,54 \pm 0,58$  mM (Figura 6).

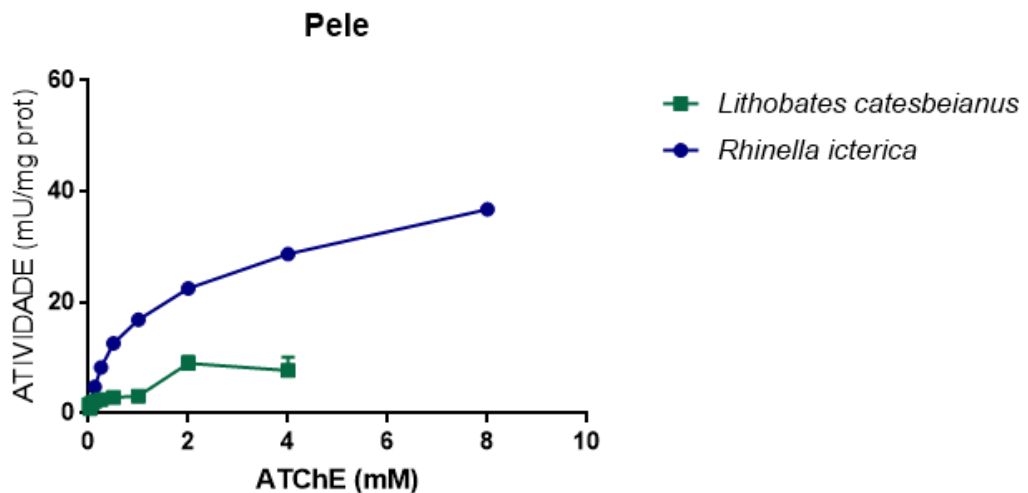


Fig. 6: Curva cinética da atividade de acetilcolinesterase em pele de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* elaborada com concentrações crescentes de acetiotiocolina (0,015 a 8 mM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR INIBIÇÃO E SENSIBILIDADE AO GLIFOSATO

De acordo com a caracterização cinética realizada nos diferentes tecidos de *R. icterica* e *L. catesbeianus*, o cérebro foi selecionado para as análises utilizando inibidores. A atividade de AChE no cérebro de ambas as espécies apresentou forte inibição por eserina. Sendo que, em *L. catesbeiana*, foi possível observar uma inibição desde as concentrações mais baixas de eserina utilizadas (Figura 7).

### Cérebro - Eserina

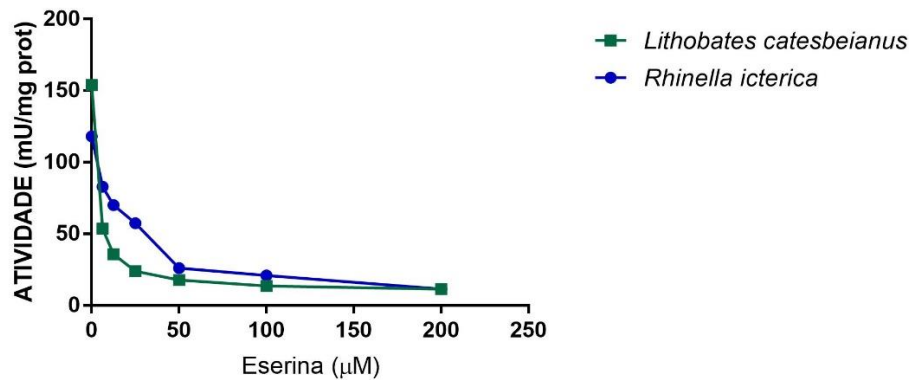


Fig. 7: Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* na presença de concentrações crescentes de eserina (0 a 200 µM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

Nas análises utilizando o BW284C51, inibidor específico de AChE, também foi observada uma alta inibição da atividade desde a concentração mais baixa utilizada, em ambas as espécies (Figura 8).

### Cérebro - BW284C51

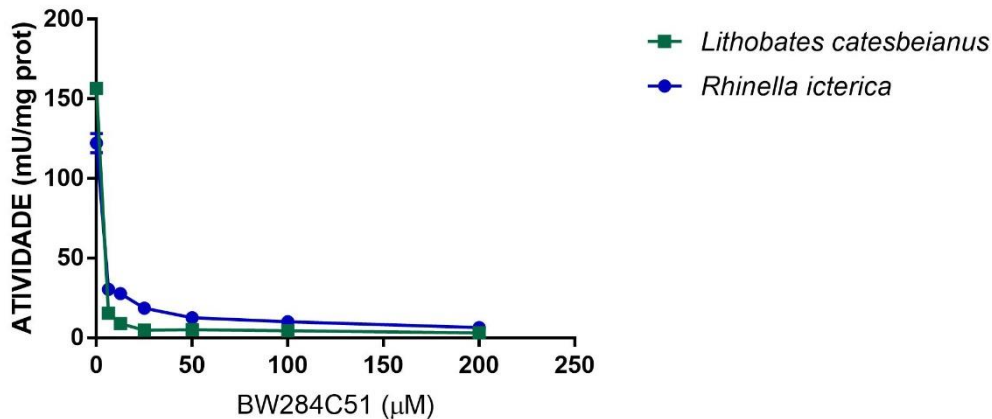


Fig. 8: Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* na presença de concentrações crescentes de BW284C51 (0 a 200 µM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

Não foi observada inibição de atividade AChE quando as amostras de cérebro foram incubadas com ISO-OMPA, inibidor específico de BChE (Figura 9).

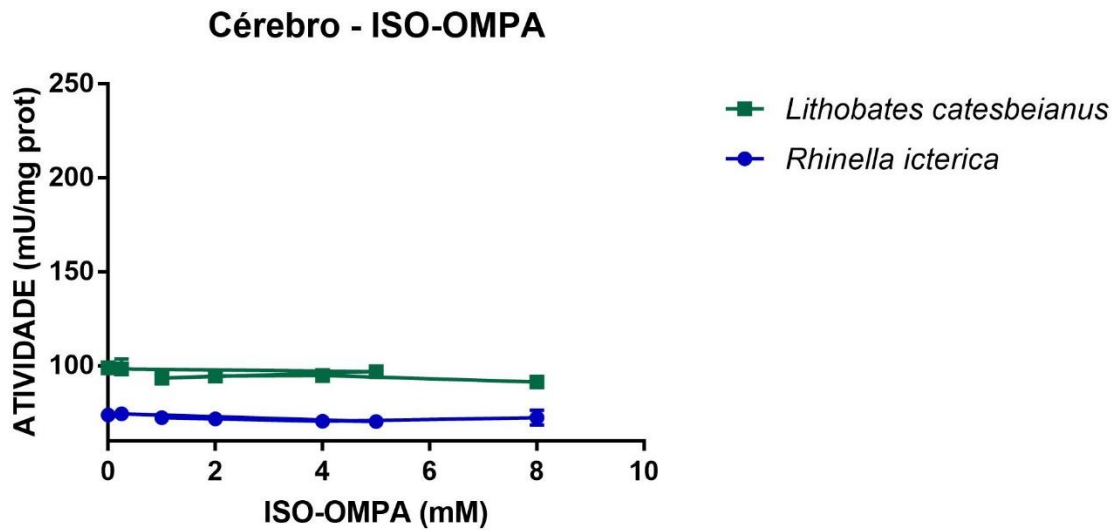


Fig. 9: Atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* na presença de concentrações crescentes de ISO-OMPA (0 a 8 mM). Valores de atividade em mU/mg de proteína.

No teste de sensibilidade ao glifosato, nenhuma alteração na atividade da AChE de cérebro de *R. icterica* e *L. catesbeianus* foi observada nas amostras incubadas com o herbicida em nenhuma das concentrações testadas (Figura 10).

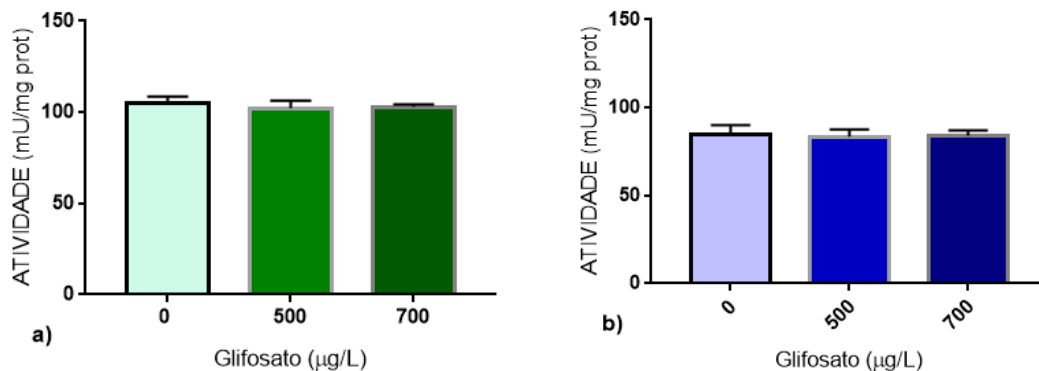


Fig. 10: Atividade de colinesterases do cérebro de *L. catesbeianus* (a) e *R. icterica* (b) incubadas com diferentes concentrações de glifosato (0, 500 e 700 µg/L). Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 2$  réplicas técnicas, pool de 12 indivíduos).

### 3.3 ATIVIDADE MÉDIA DA ACETILCOLINESTERASE

A figura 11 apresenta a atividade média de AChE realizada individualmente em cérebro de *R. icterica* e *L. catesbeianus*. É possível observar que os animais da espécie *L. catesbeianus* apresentam maior atividade AChE comparados com *R. icterica*.

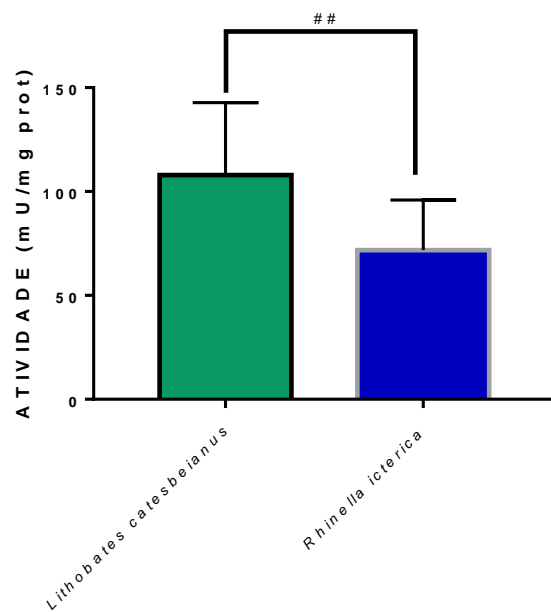


Fig. 11: Atividade média de acetilcolinesterase em cérebro de *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus* (n = 12) determinada com concentração 2,8 mM de iodeto de acetilcolina, p = 0,0091.

A tabela 1 traz um resumo comparativo dos parâmetros cinéticos determinados nas duas espécies de anuros utilizadas.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de acetilcolinesterase em *Rhinella icterica* e *Lithobates catesbeianus*.

Espécie	Tecido	V <sub>máx</sub> (mU/mg)	K <sub>mapp</sub> (mM)	Ativ. AChE (mU/mg)
<i>Rhinella icterica</i>	Cérebro	93,81 ± 2,38	0,286 ± 0,029	71,8 ± 24,09
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Cérebro	108,7 ± 2,87	0,2789 ± 0,030	108 ± 34,81

#### 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a atividade de AChE em diferentes tecidos de duas espécies de anuros, através da análise de parâmetros cinéticos e do padrão de inibição dessa enzima. Também foi investigada a possível influência do glifosato como agente anticolinesterásico.

Para iniciar um estudo com biomarcadores, é essencial estabelecer os parâmetros ideais para a realização das análises. Ensaio enzimáticos como o de Ellman, podem apresentar resultados distintos a depender da temperatura do ensaio, pH do tampão utilizado e concentração de substrato. Segundo Bisswanger (2014), a concentração ideal de substrato para se avaliar a atividade de uma enzima que segue o modelo de Michaelis Menten é de 5 a 10 vezes seu Km. Portanto, nesse estudo estabelecemos que a concentração ideal de substrato para ensaios tipo Ellman em cérebro de *R. icterica* e *L. catesbeianus* é de 2,8 mM. Esse resultado difere do encontrado em tecido nervoso de outros vertebrados, como o peixe *Abudefduf saxatilis*, que possui um Kmapp de aproximadamente 0.098 mM (RODRÍGUEZ-FUENTES; SOTO; LUNA-RAMÍREZ, 2013a), e o lagarto *Gallotia galloti*, cujo cérebro apresentou Kmapp de 0,0123 mM (SANCHEZ-HERNANDEZ; SANCHEZ, 2002). Grandes diferenças no perfil cinético de colinesterases entre espécies são esperadas, pois são enzimas que possuem diversas formas moleculares e sofrem splicing alternativo durante sua expressão, gerando modificações

em sua parte C-terminal (MASSOULIÉ et al., 2008). No entanto, este fato reforça a necessidade da caracterização destas enzimas antes de se iniciar estudos toxicológicos aplicados.

O perfil de colinesterases varia conforme a dieta ou distância filogenética dos animais. Westlake (1983) mostrou que a atividade de acetilcolinesterase se mantém coesa entre famílias de aves e que carnívoros apresentam uma atividade geral de esterases menor que de onívoros e herbívoros sugerindo que, embora o grupo dos vertebrados abrigue uma alta diversidade de animais, é possível ver semelhanças quanto ao perfil de esterases encontradas nos diferentes tecidos de cada animal.

O tecido que apresentou maior atividade de AChE em ambas as espécies foi o cérebro. Devido a sua função como reguladora do sistema de comunicação neuronal colinérgico, é esperado uma maior prevalência desta enzima em tecidos que apresentam uma grande quantidade de neurônios, como o tecido nervoso e o músculo, nas junções neuromusculares. (SOREQ; SEIDMAN, 2001). A atividade média de AChE em tecido nervoso foi similar em ambas as espécies, *L. catesbeianus* ( $108 \pm 34,81$  mU/mg prot) apresentando apenas um leve aumento em comparação a *R. icterica*, ( $71,8 \pm 24,09$  mU/mg prot) no entanto, ao analisar a literatura notamos que a similaridade não se mantém ao longo da classe de vertebrados, com peixes-sargento (*Abdefduf saxatilis*) apresentando  $V_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 26 U/g de proteína e estorninhos (*Sturnus vulgaris*) e cuiruínas (*Troglodytes aedon*) podendo apresentar atividades médias de aproximadamente 25 e 36  $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{g}$  de cérebro respectivamente. (MAYACK; MARTIN, 2003; RODRÍGUEZ-FUENTES; SOTO; LUNA-RAMÍREZ, 2013a).

O músculo não apresentou alta atividade, apesar do esperado para o tecido. Problemas na forma de extração da enzima podem ter resultado na atividade obtida. Devido à grande variedade de formas moleculares que as colinesterases podem ter em um organismo, diferentes métodos de extração podem ser mais indicados para tecidos específicos. O uso de tampões com detergente e altas concentrações de sais parece ser o mais recomendado para extração das colinesterases musculares (LOPES et al., 2018).

A atividade de AChE foi fortemente inibida pela eserina e pelo BW284C51 no cérebro de *R. icterica* e *L. catesbeianus*. Já o inibidor ISO-OMPA, um inibidor específico de BChE, não inibiu a atividade em nenhuma das concentrações testadas, em ambas as espécies. Dessa forma, os resultados referentes ao perfil de inibição indicam que a isoforma predominante de colinesterase no cérebro de *R. icterica* e *L. catesbeianus* é a AChE. Estudos realizados com peixes, pássaros e lagartos sugerem que essa também é a principal isoforma de colinesterase

encontrada no cérebro desses vertebrados (MAYACK; MARTIN, 2003; PEREIRA et al., 2019; SANCHEZ-HERNANDEZ; SANCHEZ, 2002). Estudos com pássaros demonstraram haver uma prevalência de BChE em plasma, enquanto que AChE permanece nos outros tecidos ((WESTLAKE et al., 1983)

A incubação com glifosato não afetou a atividade catalítica das colinesterases das espécies estudadas. Estudos em poliquetas mostraram uma inibição de colinesterases da fração membrana de animais expostos a formulação comercial Round up (DE MELO TAROUÇO et al., 2017). Estudos *in vivo* com moluscos observaram um aumento na atividade das enzimas quando expostas ao contaminante (SOUZA DA SILVA et al., 2003). O mesmo efeito de estímulo da atividade de AChE foi observado em girinos da espécie *Boana pardalis*, em um estudo avaliando o efeito do glifosato nos animais expostos durante 23 dias ao contaminante (MOUTINHO et al., 2020). A exposição a concentrações subletais de Round up no peixe *Labeo rohita* mostrou um aumento na atividade de BChE, indicando um possível efeito protetor desta enzima aos danos fisiológicos causados pelo herbicida (GEETHA, 2021).

Estudos em peixes e girinos utilizando protocolos *in vivo* de experimentação com exposição aguda (até 96h) à glifosato demonstraram que esse composto é capaz de inibir significativamente a atividade de acetilcolinesterase (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012; RUAMTHUM et al., 2011) e este efeito também é observado e girinos de *Rhinella arenarum* expostos ao glifosato em conjunto com o inseticida clorpirifós (CUZZIOL BOCCIONI et al., 2021).

Sandrini (2013) mostrou que o glifosato pode inibir *in vitro* a atividade das colinesterases de moluscos, no entanto, ela só é observada em concentrações acima de 9 mM (ou  $1,52 \times 10^6$  µg/L). Segundo a resolução CONAMA 357/2005 o limite de glifosato permitido nas águas brasileiras classe I é de 65 µg/L e segundo o Ministério da Saúde na portaria 2914/2011, a concentração permitida na água potável é de 500 µg/L. Avaliações da Sisagua mostram que, embora tenham sido detectadas concentrações de glifosato na água de abastecimento de grande parte dos municípios brasileiros, essa concentração não tem ultrapassado o limite estabelecido por lei.

Não se pode descartar completamente o potencial do glifosato como agente anticolinesterásico. Seu efeito pode ser restrito a exposição em altas concentrações ou pode afetar apenas colinesterases presentes em frações específicas de tecidos. Diferentes isoformas



dessas enzimas podem apresentar sensibilidade variável ao herbicida. Mais estudos deverão ser feitos para se avaliar o efeito desse contaminante na fisiologia de anuros.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que o cérebro é o tecido com maior atividade de AChE em *R. icterica* e *L. catesbeianus*, sendo então o tecido mais indicado para utilização em ensaios ecotoxicológicos visando investigar alterações na atividade dessas enzimas.

De acordo com o perfil de inibição, pode-se sugerir que a AChE é a isoforma predominante de colinesterase no cérebro das espécies estudadas e propõe-se 2,8 mM a concentração ideal de iodeto de acetilcolina para ser utilizada em ensaios colorimétricos de Elmann nesse tecido.

O glifosato não alterou a atividade de AChE nas concentrações utilizadas neste estudo, porém mais estudos devem ser realizados para avaliar o efeito deste contaminante na fisiologia de anuros.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2022. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 19 fev. 2022.
- AMRHEIN, N. et al. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. **Plant Physiology**, v. 66, n. 5, p. 830–834, 1980.
- BACH, N. C. et al. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 202, p. 289–297, 1 jul. 2018.
- BEAUVAIS, S. L. et al. PHYSIOLOGICAL MEASURES OF NEUROTOXICITY OF DIAZINON AND MALATHION TO LARVAL RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) AND THEIR CORRELATION WITH BEHAVIORAL MEASURES. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2004.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding** **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**. [s.l: s.n.].
- BRIDGES, C. M. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 1935–1939, 1997.
- BRIDGES, C. M. Effects of a Pesticide on Tadpole Activity and Predator Avoidance Behavior. **Journal of Herpetology**, 2006.
- CLÉSSIA VIEIRA BELCHIOR, D. et al. **IMPACTOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O MEIO AMBIENTE E A SAÚDE HUMANA**. [s.l: s.n.].
- CUZZIOL BOCCIONI, A. P. et al. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**, v. 273, p. 128475, 2021.
- DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 131–138, 2003.
- DE LIMA, D.; ROQUE, G. M.; DE ALMEIDA, E. A. Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, out. 2013.

DE MELO TAROUÇO, F. et al. Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta *Laeonereis acuta*: Cholinesterases and oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 259–266, 1 jan. 2017.

DENOYELLE, R. et al. Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2644–2649, 2007.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FALFUSHINSKA, H. I.; ROMANCHUK, L. D.; STOLYAR, O. B. Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 223–229, 2008.

FERNANDA MONTENEGRO, M. et al. Acetyl- and Butyrylcholinesterase Activities Decrease in Human Colon Adenocarcinoma. [s.d.].

GEETHA, N. **Mitigatory role of butyrylcholinesterase in freshwater fish *Labeo rohita* exposed to glyphosate based herbicide Roundup**. Materials Today: Proceedings. Anais...Elsevier Ltd, 2021.

GNATT, A. et al. **Expression of Alternatively Terminated Unusual Human Butyrylcholinesterase Messenger RNA Transcripts, Mapping to Chromosome 3q26-ter, in Nervous System Tumors**1CANCER RESEARCH. [s.l.: s.n.].

GONÇALVES, A. M. M. et al. **Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure – A review**Ecological IndicatorsElsevier B.V., , 1 mar. 2021.

HAN, Y. et al. Antioxidant enzymes and their role in phoxim and carbaryl stress in *Caenorhabditis elegans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 43–50, 1 maio 2017.

HART, A. D. M. Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1993.

HEREK, J. S. et al. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021.

HEYER, R. et al. **Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians**. [s.l.] Smithsonian, 2014.

LOPES, R. M. et al. The importance of an efficient extraction protocol for the use of fish muscle cholinesterases as biomarkers. **Talanta**, v. 179, n. December 2017, p. 769–774, 2018.

MACK, A.; ROBITZKI, A. **The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5 'butyrylcholinesterase-DNA study.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/pneurobio>.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31–91, 1993.

MASSOULIÉ, J. et al. Old and new questions about cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 30–44, 25 set. 2008.

MAYACK, D. T.; MARTIN, T. Age-dependent changes in plasma brain cholinesterase activities of house wrens and European starlings. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 3, p. 627–637, 2003.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. et al. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 6–9, jan. 2012.

MENNILLO, E. et al. Suitability of cholinesterase of polychaete *Diopatra neapolitana* as biomarker of exposure to pesticides: In vitro characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 191, p. 152–159, 2017.

NRC: COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Biological Markers in Environmental Health Research.** [s.l: s.n.].

PAVAN, F. A. et al. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, 1 jul. 2021.

PEREIRA, B. V. R. et al. Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, n. January, p. 482–493, 2019.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; SOTO, M.; LUNA-RAMÍREZ, K. Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 99, 1 out. 2013a.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; SOTO, M.; LUNA-RAMÍREZ, K. Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 99, 1 out. 2013b.

RUAMTHUM, W. et al. Effect of glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase activity in tadpoles, *Hoplobatrachus rugulosus*. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 76, n. 4, p. 923—930, 2011.

SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; SANCHEZ, B. M. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: Enzymological characterization. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2319–2325, 1 nov. 2002.

SILMAN, I. The multiple biological roles of the cholinesterases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 162, p. 41–56, 1 jul. 2021.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. April, p. 294–302, 2001.

SOUZA DA SILVA, R. et al. Different sensitivity of Ca-ATPase and cholinesterase to pure and 2q commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p. 215–220, 2003.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. glifosato epa. **Office of water**, 1995.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap)>.

VIDAL, C. J. **Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours**. *Chemico-Biological Interactions*. **Anais...**15 dez. 2005.

WESTLAKE, G. E. et al. **CONTROL ENZYME LEVELS IN THE PLASMA, BRAIN AND LIVER FROM WILD BIRDS AND MAMMALS IN BRITAIN**. [s.l: s.n.].

WIDDER, P. D.; BIDWELL, J. R. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 9–18, 2 jun. 2008.

YADAV, S. S. et al. Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. **Aquatic Toxicology**, v. 132–133, p. 1–8, 2013.

ZHANG, L. et al. Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 781, n. February, p. 186–206, 2019.

ZHANG, X. J. et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 8, p. 790–800, 2002.