



EFEITOS DO FeCl_2 e CuCl_2 NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE *Oreochromis niloticus*

RESUMO

Acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) é uma enzima cuja principal função é a modulação dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas. É o alvo primário de alguns pesticidas e sua atividade pode sofrer interferência de íons. Estudos apontam o íon Cu_2^+ como um inibidor da AChE ao passo que o íon Fe_2^+ pode inibir a atividade enzimática em concentrações maiores. O presente trabalho objetivou avaliar in vivo e in vitro o efeito do cloreto de ferro (FeCl_2) e do cloreto de cobre (CuCl_2) sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral de alevinos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. O teste in vivo com FeCl_2 (3 $\mu\text{g/mL}$) mostrou uma atividade da colinesterase de $100,13 \pm 24,58\%$, enquanto a análise in vitro para 0,127; 1,27; 12,7; 126,7; 1267 $\mu\text{g/mL}$ mostraram atividade AChE de $100,82 \pm 5,20\%$, $101,96 \pm 2,45\%$, $96,27 \pm 3,71\%$, $103,82 \pm 1,76\%$ e $89,65 \pm 2,43\%$, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%), enquanto o teste in vivo com CuCl_2 (3 $\mu\text{g/mL}$) mostrou uma atividade colinesterásica de $88,44 \pm 2,01\%$, e a análise in vitro para 0,17; 1,70; 17,0; 170,5; 1705 $\mu\text{g/mL}$ mostraram atividade AChE de $98,78 \pm 5,74\%$, $81 \pm 0,29\%$, $87,79 \pm 10,27\%$, $81,50 \pm 9,84\%$ e $62,55 \pm 5,06\%$, respectivamente. Os resultados sugerem que a acetilcolinesterase cerebral de *O. niloticus* apresenta sensibilidade baixa ao íon Fe_2^+ e acentuada ao Cu_2^+ , porém apenas na concentração de 1.705 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM), o que não representa impedimento ao uso dessa enzima como biomarcador de pesticidas, uma vez que tal concentração só é encontrada na natureza em amostras associadas à empreendimentos industriais e de mineração.

PALAVRAS-CHAVE: Colinesterase; Tilápia; Metais Pesados.

EFFECTS OF FeCl_2 AND CuCl_2 ON THE ACTIVITY OF BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE FROM *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is an enzyme whose classical function is the modulation of nerve impulses in the cholinergic synapses. It is the primary target of some pesticides and its activity can be disturbed by ions. Studies pointed Cu_2^+ as an AChE inhibitor whereas Fe_2^+ can inhibit enzymatic activity at higher concentrations. The present work aimed to evaluate in vivo and in vitro the effect of iron chloride (FeCl_2) and copper chloride (CuCl_2) on the activity of acetylcholinesterase from brain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings. The in vivo test with FeCl_2 (3 $\mu\text{g/mL}$) showed a cholinesterase activity of $100.13 \pm 24.58\%$, while in vitro analysis using 0.127; 1.27; 12.7; 126.7 and 1267 $\mu\text{g/mL}$ showed AChE activity of $100.82 \pm 5.20\%$; $101.96 \pm 2.45\%$; $96.27 \pm 3.71\%$; $103.82 \pm 1.76\%$ and $89.65 \pm 2.43\%$, respectively, compared to controls. The in vivo test of CuCl_2 showed a cholinesterase activity of $88.44 \pm 2.01\%$, whereas in vitro analysis using 0.17; 1.70; 17.0; 170.5 and 1705 $\mu\text{g/mL}$ showed AChE activity of $98.78 \pm 5.74\%$; $81 \pm 0.29\%$; $87.79 \pm 10.27\%$; $81.50 \pm 9.84\%$ and $62.55 \pm 5.06\%$, respectively. The results suggest that brain acetylcholinesterase from *O. niloticus* has low sensitivity to Fe_2^+ and high sensitivity to Cu_2^+ only at the concentration of 1705 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM), which does not prevent the use of this enzyme as a biomarker of pesticides, since this concentration is only found in nature in samples associated with industrial or mining enterprises.

KEYWORDS: Cholinesterase; Tilapia; Heavy Metals.

Natural Resources, Aquidabã, v.2, n.2, Mar, Abr, Mai, Jun, Jul, Ago 2012.

ISSN 2237-9290

SEÇÃO: Artigos

TEMA: Ictiologia



DOI: 10.6008/ESS2237-9290.2012.002.0003

Vagne de Melo Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco,
Brasil

<http://lattes.cnpq.br/6160988158330428>
vagne_melo@hotmail.com

Caio Rodrigo Dias de Assis

Universidade Federal de Pernambuco,
Brasil

<http://lattes.cnpq.br/0018678980235423>
caiodias2@hotmail.com

Raquel Pereira Freitas da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,
Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4580046793509060>
rachel_pereira@hotmail.com

Ranilson de Souza Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco,
Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2205151409139871>
ransoube@uol.com.br

Recebido: 15/07/2012

Aprovado: 30/08/2012

Avaliado anonimamente em processo de pares cegos.

Referenciar assim:

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, R. P. F.; BEZERRA, R. S. Efeitos do FeCl_2 e CuCl_2 na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. *Natural Resources*, Aquidabã, v.2, n.2, p.27-36, 2012.

INTRODUÇÃO

O ambiente aquático recobre dois terços do planeta e é habitado por uma grande variedade de espécies ocupando diferentes nichos ecológicos e muitas das quais são importantes fontes de alimentação (TUZEN e SOYLAK, 2007; OLIVEIRA, 2011). Como consequência do crescimento da população humana e o desenvolvimento industrial, a produção, o consumo e o descarte de produtos químicos corroboram para o aumento da produção de resíduos antropogênicos, acarretando danos ecológicos (TURKMEN *et al.*, 2005; ONER *et al.*, 2009), pois muitos deles são, em última instância, depositados nos ecossistemas fluviais (FERNANDES *et al.*, 2007).

Em sistemas de água doce, o peixe é a principal fonte de proteínas e além do baixo preço comercial de algumas espécies, beneficiando famílias de baixa renda (MENDIL *et al.*, 2005), são frequentemente utilizados como biomonitores por oferecerem vantagens específicas na descrição das características naturais dos ecossistemas aquáticos e na avaliação das mudanças nos habitats. Essas vantagens como organismo biomonitor estão ligadas a duas razões principais: 1) é uma espécie de vida relativamente longa e integram as flutuações dos poluentes ao longo do tempo, já que os compostos bioacumuláveis serão abundantes nos tecidos dos organismos mais antigos; 2) sua abundância nos ambientes aquáticos permite a continuidade do monitoramento (LAMAS *et al.*, 2007).

Entre as espécies aquáticas, as tilápias desfrutam de destaque mundial na aquicultura voltada para alimentação, além do seu potencial uso nos cultivos experimentais em laboratório (TENGJAROENKUL *et al.*, 2000) e, dentre elas, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido utilizada como bioindicadora na produção de respostas aos efeitos degradantes por diversas substâncias (metais, pesticidas) que ocorrem em níveis mais elevados da organização biológica (FERNANDES *et al.*, 2007), através de medidas em nível individual (medidas biométricas), populacional (redução reprodutiva, mortalidade, tamanho e biomassa) e de comunidade (perturbação do ciclo de nutrientes). Estes organismos são amplamente utilizados para obtenção de respostas a agentes estressores, e dessa forma, sua utilização contribui para avaliação de risco ecológico e na definição de estratégias adequadas para conservação das espécies mais afetadas por poluentes (TEJEDA-VERA *et al.*, 2007).

Os metais pesados são substâncias quimicamente reativas e bioacumuláveis, ou seja, os organismos não são capazes de eliminá-las com facilidade (FARIAS *et al.*, 2007). Alguns metais tomam parte do metabolismo fisiológico, sendo considerados essenciais por atuarem como componentes funcionais, estruturais, e regulatórios de numerosas biomoléculas, podendo ser classificados como potencialmente tóxicos (p. ex.: arsênio, cádmio, mercúrio, chumbo), provavelmente essenciais (p. ex.: níquel, vanádio, cobalto) e essenciais (p. ex.: cobre, zinco, ferro, manganês). Estes elementos tóxicos podem ser muito prejudiciais, mesmo em baixas concentrações, quando ingeridos durante um longo período de tempo, enquanto os essenciais,

em altas concentrações, podem também interferir em processos metabólicos (PAYNE *et al.*, 1996; TUZEN, 2003; ULUOZLU *et al.*, 2007). Objetivou-se com este estudo avaliar a exposição *in vivo* e o efeito *in vitro* de dois elementos essenciais, ferro e cobre, na forma de íons, utilizando cloreto de ferro (FeCl₂) e cloreto de cobre (CuCl₂) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) do cérebro de alevinos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Proveniência dos exemplares e modelo biológico

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 23076.023157/2010-13. Os exemplares foram provenientes do viveiro da base de aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. O modelo biológico utilizado foram alevinos de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*. Os alevinos de peixes foram transportados em tanques de plástico de 100 litros para o laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco – LABENZ/UFPE, onde se processou todo o experimento. Os peixes foram inicialmente submetidos à um período de 120h de cultivo para a adaptação ao novo ambiente (condições semelhantes ao viveiro de coleta em relação à água, temperatura e alimentação) e evitar situações de estresse. O ensaio experimental foi realizado durante um período de 96h em um tanque de 30L, contendo 30 espécimes de alevinos de *O. niloticus* distribuídos em grupos experimentais. A água do cultivo foi proveniente da empresa de tratamento de água da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, mesma utilizada no viveiro de origem das espécies, não passando por nenhum tipo de tratamento prévio, uma vez que o interesse foi de aproximar ao máximo as condições originais de cultivo.

Grupos experimentais e condições de cultivo

Os animais foram divididos em três grupos experimentais para a exposição *in vivo*, a saber: 1) grupo controle (não submetidos ao metal); 2) animais submetidos ao cloreto de ferro (FeCl₂), na concentração final de 3 µg/mL e 3) animais submetidos ao cloreto de cobre (CuCl₂) a uma concentração final de 3 µg/mL, em um sistema de cultivo estático (sem troca de água), alimentação *ad libitum* (ração para peixe com 32% de proteína) e fotoperíodo de 12:12 h. Após este período, os animais foram sacrificados por imersão em gelo, os parâmetros zootécnicos foram obtidos (peso e comprimento), os cérebros foram coletados, pesados e os extratos foram preparados na solução de Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M até atingir uma concentração de 20 mg de tecido por ml de tampão.

O ensaio *in vitro* foi realizado incubando o cloreto de ferro (FeCl_2) e o cloreto de cobre (CuCl_2) em extratos de cérebros de 15 espécimes juvenis do tratamento controle (sem exposição inicial aos metais), com seis diferentes concentrações, de 0,001 a 10 mM (correspondendo às concentrações de 0,127 a 1267 $\mu\text{g/mL}$ para FeCl_2 e de 0,17 a 1705 $\mu\text{g/mL}$ para CuCl_2). A atividade enzimática foi determinada utilizando 10 μL de extrato incubado por 1 h com 10 μL da solução de cada metal. Após a incubação, 200 μL do reagente cromogênico DTNB 0,25 mM foi adicionado e a reação foi monitorada em um espectrofotômetro de microplacas a 405 nm por 3 minutos após a adição de 20 μL de acetilcolina 62 mM (RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2010 OLIVEIRA, 2011). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Análise estatística

Os valores médios para os diferentes tratamentos foram comparados utilizando análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$), usando o software de modelagem MicroCal Origin Versão 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período de cultivo experimental foram mensurados os parâmetros de qualidade de água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) para o grupo controle (não submetidas ao metal), tendo as condições experimentais encontradas de $27,76 \pm 0,49^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0 \pm 0,34$; $5,47 \pm 1,55 \text{ mg.L}^{-1} \text{ OD}$; para os animais submetidos ao cloreto de ferro (FeCl_2), na concentração final de 3 $\mu\text{g/mL}$, foram de $27,44 \pm 0,79^\circ \text{C}$, $\text{pH } 7,32 \pm 0,25$; $5,25 \pm 0,49 \text{ mg.L}^{-1} \text{ OD}$, enquanto que para os animais submetidos ao cloreto de cobre (CuCl_2) a uma concentração final de 3 $\mu\text{g/mL}$ foram de $27,44 \pm 0,79^\circ \text{C}$, $\text{pH } 7,32 \pm 0,25$; $5,25 \pm 0,49 \text{ mg.L}^{-1} \text{ OD}$. Os parâmetros zootécnicos observados no momento do abate foram de $10,10 \pm 0,70 \text{ cm}$ e $10,0 \pm 0,01 \text{ g}$ para o grupo controle; $9,0 \pm 0,85 \text{ cm}$ e $10,0 \pm 0,00 \text{ g}$ para o grupo exposto ao cloreto de ferro; e de $10,10 \pm 0,61 \text{ cm}$ e $9,56 \pm 0,00 \text{ g}$ para o grupo exposto ao cloreto de cobre. Os fatores peso e crescimento não foram levados em consideração na análise dos dados uma vez que o curto período de exposição aplicado neste trabalho é insuficiente para tal análise. As condições experimentais foram aproximadas ao máximo as condições de cultivo de origem do viveiro.

A AChE é frequentemente descrita como uma enzima perfeita porque suas propriedades catalíticas se conjugam para aproximar sua atividade do limite máximo de velocidade permitido pela própria difusão do substrato no meio circundante (TÕUGU, 2001; SILMAN e SUSSMAN, 2005; DVIR *et al.*, 2010; SOLÉ *et al.*, 2010). A acetilcolinesterase contém dois sub-sítios catalíticos, um sub-sítio esterásico e um sub-sítio aniônico. O sítio esterásico da acetilcolinesterase situa-se dentro de uma cavidade estreita e é constituído de uma tríade

catalítica formada pelos resíduos dos aminoácidos serina 200, histidina 440 e glutamato 327, variando ligeiramente essas posições entre as espécies. O peso molecular da acetilcolinesterase, assim como nas demais enzimas, vai oscilar de acordo com a espécie em questão, embora exista registro de que cada monômero de unidade desta enzima possua cerca de 70 a 80,00 kDa. Dessa forma, em peixes, por apresentar estrutura tetramérica, no cérebro e no músculo, o peso molecular da enzima pode se situar em torno de 280 kDa (QUINN, 1987).

Na catálise, o sítio aniônico periférico, situado às bordas da cavidade, atrai fortemente o nitrogênio quaternário, carregado positivamente, da acetilcolina. Uma vez dentro da fenda catalítica, a acetilcolina sofre o ataque nucleofílico da serina (desprotonada pelo resíduo de histidina) ao seu carbono carbonílico, criando um intermediário tetraédrico estabilizado por pontes de hidrogênio o qual, num primeiro momento, forma serina acetilada e libera colina. Ao final do processo de clivagem da ligação éster, o grupo acetila é liberado pela adição de água, formando ácido acético e regenerando o sítio catalítico (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2004). O sítio aniônico periférico é justamente o local de interação da AChE com a maioria dos íons. Ao se ligar aos íons, a enzima sofre mudanças conformacionais que prejudicam (no caso dos íons tóxicos) ou favorecem (no caso dos ativadores) o processo de catálise descrito acima (TOMLINSON *et al.*, 1980 e 1981). Os inibidores específicos mais utilizados para distinguir a AChE da butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) são o BW284C51 (inibidor da AChE), iso-OMPA (inibidor da BChE) e a eserina (ou fisostigmina) e foram utilizados por Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot (2004) para demonstrar que o cérebro de *O. niloticus* contém apenas AChE. A acetilcolinesterase possui temperatura ótima de atuação entre 20 e 45°C, em um pH oscilante de 6,5 a 8,5 (BOCQUENÉ *et al.*, 1990; ASSIS *et al.*, 2010). A AChE pode ter sua atividade reduzida ou abolida quando da interação com íons de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Hg^{2+} e Sn^{2+} , ou ter sua atividade aumentada quando em contato com o Ca^{2+} , K^+ e o Mg^{2+} (OLSON e CHRISTENSEN, 1980).

Nas análises enzimáticas, o teste de exposição *in vivo* com cloreto de ferro (FeCl_2) mostrou uma atividade da colinesterase de $100,13 \pm 24,58\%$, enquanto a análise do ensaio *in vitro* com 0,127; 1,27; 12,7; 126,7 e 1267 $\mu\text{g/mL}$ mostrou atividade AChE de $100,82 \pm 5,20\%$, $101,96 \pm 2,45\%$, $96,27 \pm 3,71\%$, $103,82 \pm 1,76\%$ e $89,65 \pm 2,43\%$, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%). A concentração máxima utilizada não foi significativamente diferente em comparação com grupos de controle *in vivo* e *in vitro*. No concernente às análises do cloreto de cobre (CuCl_2), o teste *in vivo* indicou uma atividade da colinesterase de $88,44 \pm 2,01\%$, enquanto a análise *in vitro* com 0,17; 1,70; 17,0; 170,5; 1.705 $\mu\text{g/mL}$ mostrou atividade AChE de $98,78 \pm 5,74\%$, $81 \pm 0,29\%$, $87,79 \pm 10,27\%$, $81,50 \pm 9,84\%$ e $62,55 \pm 5,06\%$, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%). Ambos os estudos mostraram uma redução na atividade enzimática, no entanto, apenas o CuCl_2 ocasionou redução significativa de 38% na concentração 1.705 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), indicando uma interação dose-resposta negativa com relação à atividade enzimática. Os resultados da exposição *in vitro* ao cloreto de ferro (FeCl_2) e ao cloreto de cobre (CuCl_2) estão ilustrados nas figuras 1 e 2.

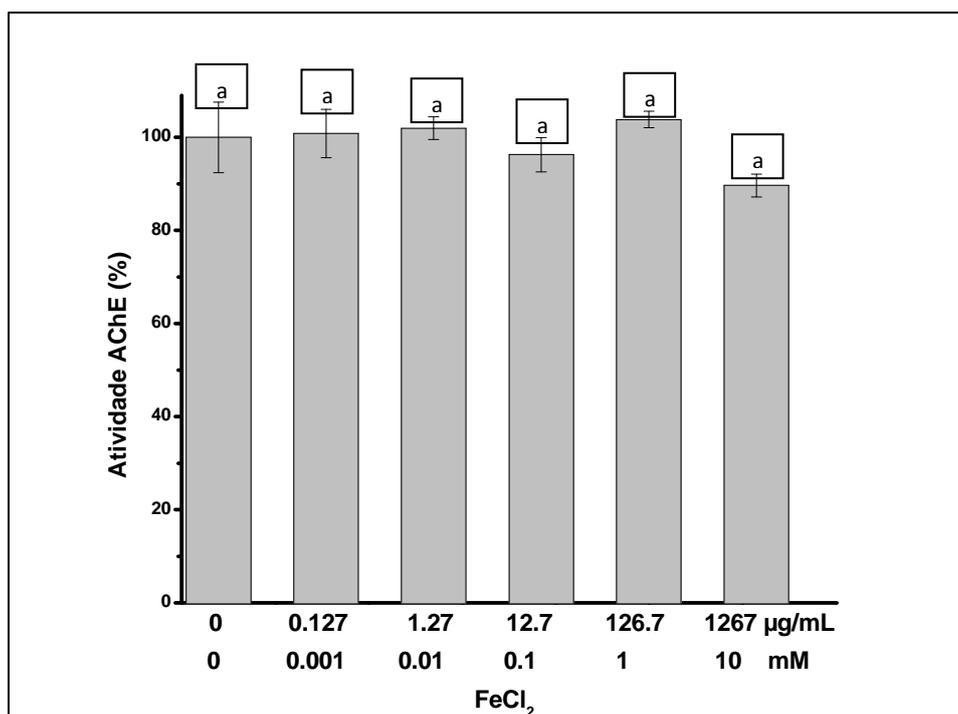


Figura 1: Atividade da colinesterase cerebral de alevinos de tilápia expostas ao cloreto de ferro (FeCl_2) *in vitro*. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

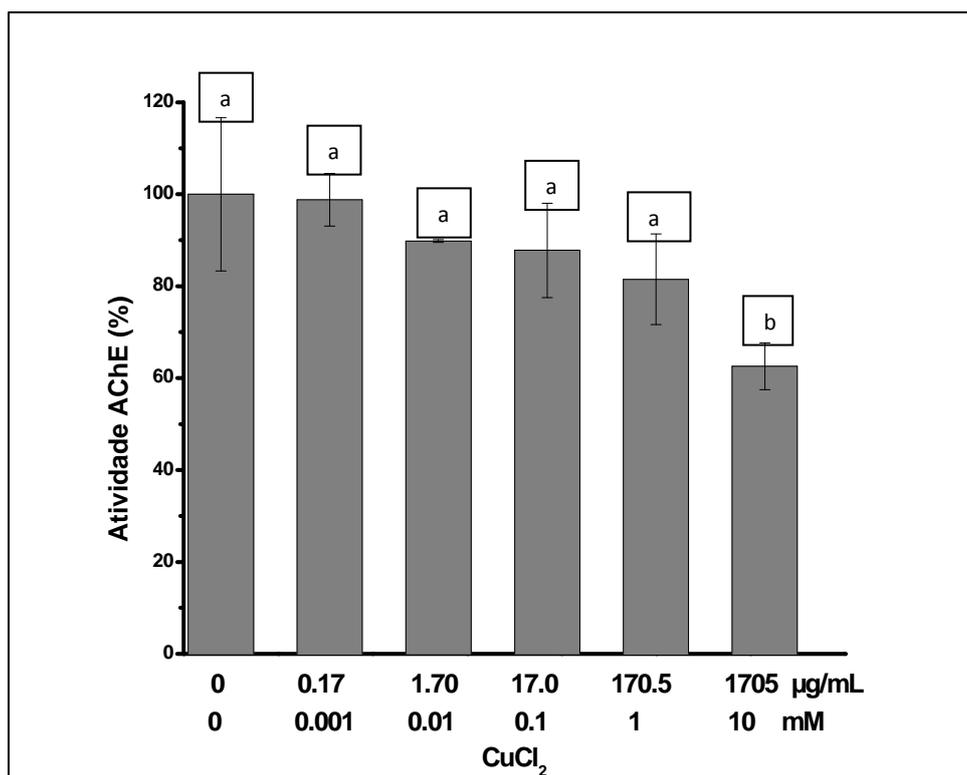


Figura 2: Atividade da colinesterase cerebral de alevinos de tilápia expostas ao cloreto de cobre (CuCl_2) *in vitro*. ANOVA e teste Tukey a 95% de significância ($p < 0,05$).

Os metais pesados são alvo de avaliações como potenciais inibidores enzimáticos através das ligações com grupamentos tióis protéicos (MARQUES e YAMANAKA, 2008). O conceito biológico de inibidor enzimático diz respeito à substância que é capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática (KOOLMAN e ROHEM, 2005),

retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação, mesmo em baixíssimas concentrações. A ligação dos metais à enzima, em geral, ocorre de maneira irreversível e, na maioria das vezes, tende a reduzir a atividade enzimática. O acréscimo da atividade enzimática, quando observado pela exposição dos organismos aquáticos frente à ação de alguns poluentes, pode ser devido a uma indução da enzima pelo agente tóxico como parte de uma adaptação bioquímica às necessidades metabólicas aumentadas pelo estresse provocado pelo mesmo (JONSSON e AOYAMA, 2010). O cobre é um inibidor da AChE. Vários relatos na literatura reportam inibições deste metal em espécies aquáticas, tais como de 23% para o pirarucu, *Arapaima gigas*, de 35% para a espécie de água doce tambaqui, *Colossoma macropomum*, de 23% para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, de 78% para o poraquê, *Electrophorus electricus* (ASSIS, 2011). Bocquené e colaboradores (1990) relataram uma inibição de 100% em duas espécies marinhas (*Scomber scomber* e *Pleuronectes platessa*) sob exposição de cobre a 1 mM.

O ferro é um micronutriente vital para os peixes teleósteos, sendo um componente integral de proteínas envolvidas na respiração celular e transferência de oxigênio. No entanto, em excesso o ferro é tóxico, e os peixes possuem necessidade de equilibrar a absorção para prevenir a deficiência devido ao seu potencial de toxicidade (BURY e GROSELL, 2003). Na aquicultura, este metal é adicionado frequentemente, como sais de ferro, na alimentação dos peixes. Os valores médios de ferro presente em alguns peixes consumidos pela população é de 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para o salmão, 4,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para a truta e de 24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para a sardinha (LIMA e PEDROZO, 2001). A deficiência do cobre inclui, entre outras coisas, disfunção cardíaca, aumento de lipoproteínas de baixa densidade e elevação da fração de colesterol de alta densidade, diminuição da metionina e diminuição da depuração de glicose, enquanto níveis elevados de acabam por inibir os grupos sulfidrilas das enzimas, tais como glicose-6-fosfatase (levando à hemólise) e glutatona redutase, os quais são responsáveis por proteger o organismo contra os danos provocados pelos radicais livres. A intoxicação aguda pelo cobre pode provocar erosão do epitélio gastrointestinal associado à necrose centrilobular do fígado e necrose tubular dos rins (PEDROZO e LIMA, 2001).

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a acetilcolinesterase cerebral de *O. niloticus* apresenta sensibilidade baixa ao íon Fe^{2+} e acentuada ao Cu^{2+} , porém apenas na concentração de 1.705 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 mM), o que não representa impedimento ao uso dessa enzima como biomarcador de pesticidas, uma vez que tal concentração só é encontrada na natureza em amostras associadas à empreendimentos industriais e de mineração.

REFERÊNCIAS

ASSIS, C. R. D.. **Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcadores *in vitro* da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

ASSIS, C. R. D.; CASTRO, P. F.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO, E. V. M. M.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology**, v.29, n.10, p.2243-2248, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.272>

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P.. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v.30, p.75-89, 1990. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(90\)90012-D](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(90)90012-D)

BURY, N.; GROSELL, M.. Iron acquisition by teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.135, p.97-105, 2003.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSMAN, J. L.. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interaction**, v.187, p.10–22, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>

FARIAS, M. S. S.; LIMA, V. L. A.; DANTAS NETO, J.; LEITE, E. P. F.; LIRA, V. M.; FRANCO, E. S.. Avaliação dos níveis de boro e chumbo na água do rio cabelo – João Pessoa, Paraíba. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v.4, n.1, p.24-31, 2007.

FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; SALGADO, M. A.. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, n.3, p.426-431, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.02.007>

JONSSON, C. M.; AOYAMA, H.. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Revista Química Nova**, v.33, n.4, p.920-928, 2010.

KOOLMAN, J.; ROHEM, K. H.. **Bioquímica: texto e atlas**. 3 ed. Porto Alegre: 2005.

LAMAS, S.; FERNANDEZ, J. A.; ABOAL, J. R.; CARBALLEIRA, A.. Testing the use of juvenile *Salmo trutta* L. as biomonitors of heavy metal pollution in freshwater. **Chemosphere**, v. 67, p. 221-228, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.040>

LIMA, I. V.; PEDROZO, M. F. M.. **Ecotoxicologia do ferro e seus compostos**. 6 ed. Salvador: CRA, 2001.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1791-1799, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700034>

MENDIL, D.; ULUOZLU, O. D.; HASDEMIR, D.; TUZEN, M.; SARI, H.; SUIÇMEZ, M.. Determination of trace metal levels in seven fish species in lakes in Tokat, Turkey. **Food Chemistry**, v.90, p.175-179, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.039>

ONER, M.; ATLI, G.; CANLI, M.. Effects of Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures on Some Enzymatic and Non-Enzymatic Indicators in the Liver of *Oreochromis niloticus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.82, n.3, p.317-321, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-008-9577-4>

OLIVEIRA, V. M.. **Aplicação de hidrolases de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) como biomarcadores de exposição ao alumínio**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

OLSON, D. L.; CHRISTENSEN, G. M.. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). **Environmental Research**, v.21, n.2, p.327-335, 1980. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351\(80\)90034-1](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351(80)90034-1).

- PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L.. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, p.225-231, 1996. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00112-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X(95)00112-Z)
- PEDROZO, M. F. M.; LIMA, I. V.. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos**. 2 ed. Salvador: CRA, 2001.
- QUINN, D. M.. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v.87, n.5, p.955-979, 1987. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cr00081a005>
- RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; ARMSTRONG, J.; SCHLENK, D.. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, n.3, p.466-471, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.008>
- RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G.. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**, v.58, n.2-5, p.505-509, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.037>
- SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v.5, n.3, p.293-302, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2005.01.014>
- SOLÉ, M.; BAENA, M.; ARNAU, S.; CARRASON, M.; MAYNOU, F.; CARTES, J. E.. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. **Environment International**, v.36, n.2, p.202-211, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.008>
- STURM, A.; ASSIS, H. C. S.; HANSEN, P.. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v.47, p.389-398, 1999. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00127-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00127-5)
- TEJEDA-VERA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, E.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E.. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameioba River, Mexico. **Environment International**, v.33, p.521-531, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.018>
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A.. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.. **Aquaculture**, Amsterdam, v.182, n.3/4, p. 317-327, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00270-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00270-7)
- TÖUGU, V.. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry: Central Nervous System Agents**, v.1, n.2, p.155-170, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1568015013358536>
- TOMLINSON, G.; MUTUS, B.; MCLENNAN, I.. Modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral site ligands. **Molecular Pharmacology**, v.18, 33-39, 1980.
- TOMLINSON, G.; MUTUS, B.; MCLENNAN, I.. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.59, p.728-735, 1981. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/o81-101>
- TÜRKMEN, A.; TÜRKMEN M.; YALÇIN, T.; AKYURT, I.. Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. **Food Chemistry**, v.91, p.167-172, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.008>
- TUZEN, M.. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.80, n.1, p.119-123, 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00264-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00264-9)
- TUZEN, M.; SOYLAK, M.. Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1378-1382, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.044>

ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; MENDIL, D.; SOYLAK M.. Trace metal content in nine species of fish from the Black and Aegean Seas, Turkey. **Food Chemistry**, v.104, n.2, p.835-840, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.003>

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.. Produtos naturais como candidatos à fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v.27, n.4, p.655-660, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000400021>