

ALEXANDRE VIDOTTO BARBOZA LIMA

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E DO PADRÃO DE ATIVIDADE
ESTERÁSICA NO HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÕES PALEMONÍDEOS
EXPOSTOS A DIFERENTES PESTICIDAS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2012

ALEXANDRE VIDOTTO BARBOZA LIMA

Análise da variabilidade genética e do padrão de atividade esterásica no hepatopâncreas
de camarões palemonídeos expostos a diferentes pesticidas

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Genética, Área de Genética Animal e
Evolução, junto ao Programa de Pós-Graduação
em Genética do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Lilian Castiglioni

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto

2012

Lima, Alexandre Vidotto Barboza.

Análise da variabilidade genética e do padrão de atividade esterásica no hepatopâncreas de camarões palemonídeos expostos a diferentes pesticidas / Alexandre Vidotto Barboza Lima. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

77 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Lilian Castiglioni

Coorientador: Eduardo Alves de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. Camarão – Genética. 3. *Macrobrachium*. 4. Esterase. 5. Pesticidas. I. Castiglioni, Lilian. II. Almeida, Eduardo Alves de. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 595.384

ALEXANDRE VIDOTTO BARBOZA LIMA

Análise da variabilidade genética e do padrão de atividade esterásica no hepatopâncreas
de camarões palemonídeos expostos a diferentes pesticidas

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Genética, Área de Genética Animal e
Evolução, junto ao Programa de Pós-Graduação
em Genética do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Castiglioni
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Hermione Elly Melara de Campos
Bicudo
Professor Emérito
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Uderlei Doniseti Silveira Covizzi
Professor Assistente Doutor
UNORP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2012

Dedico este trabalho às mulheres da
minha vida: minha mãe “Tutú”, minha
irmã “Mari” e minha namorada “Lú”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo isso e muito mais...

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni por ter acreditado em mim quanto pesquisador e, principalmente, pelo grande apoio na minha vida acadêmica desde a graduação, pelas orientações profissionais e pelos “conselhos de mãe”. E, acima de tudo, obrigado pela sua amizade. Estaremos juntos no doutorado novamente.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida por ter aberto as portas do seu laboratório e por me aceitar como coorientando. Obrigado por me apresentar o fascinante mundo da bioquímica e da ecotoxicologia, pelas orientações em momentos de urgência, pela paciência de me ensinar uma ciência nova para mim e por me mostrar o que é o real amor pela profissão. Também estaremos juntos novamente no doutorado.

Ao Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei, pela amizade desde os tempos de graduação e por ter me ensinado técnicas de coleta, identificação, sexagem e dissecação de crustáceos. Obrigado por todo o apoio pessoal, pelos “conselhos de biólogo” e pelos momentos de descontração, onde descobrimos que “queijo é um veneno!”.

A todos os professores da UNIRP que participaram da minha formação como biólogo e a todos os professores da UNESP que participaram da minha formação como geneticista.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética da UNESP de São José do Rio Preto pelas orientações burocráticas e pelo apoio financeiro para congressos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que viabilizou a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao laboratório.

A toda equipe do LABCA (Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática), por tornar os dias de trabalho mais produtivos e divertidos.

À Msc. Daína de Lima por ter me auxiliado com as técnicas de espectrofotometria e de exposição *in vitro* e *in vivo* e, principalmente, pela grande amizade. Valeu pequena!

Ao laboratório de Biologia Molecular da UNIRP e toda sua equipe pelo espaço, materiais e apoio técnico cedidos para a identificação, sexagem e dissecação dos espécimes utilizados neste trabalho.

Aos amigos “Destróier” (Tiago) e “Kexu” (Danilo) por me acolherem na república, pelas discussões científicas, idéias, apoio, esclarecimento de dúvidas e ajuda com a estatística e coletas. Muito obrigado pela amizade.

A toda equipe do LHGDH (Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas) e do CEQ (Centro de Estudo de Quelônios) pela amizade, pelos cafezinhos, almoços e churrascos que compartilhamos.

À Profª Drª Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pelo estágio de docência e pelos convites para ministrar aulas para as turmas de graduação. Obrigado pela experiência que obtive através do estágio e de seus convites.

Aos Profª. Drª. Lucilene Regina Maschio, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, Profª. Drª. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e Prof. Dr. Uderlei Doniseti Silveira Covizzi, por gentilmente terem composto minha banca de qualificação e defesa, mas principalmente pelas sugestões que enriqueceram substancialmente o trabalho.

A bióloga e amiga “Jaque” (Jaqueline Costa) por ter quebrado vários galhos que facilitaram muito minha vida e, principalmente, a da Prof^a. Dr^a. Lilian, durante este período, obrigado também pelas agradáveis conversas sob o ar condicionado do NAAC.

A companheira de laboratório e aspirante a bióloga “2n” (Anna Paula) pela amizade e pela ajuda na fotodocumentação dos géis.

Por fim, agradeço a minha mãe “Tutú” (Maria Donizeti), minha irmã Mariana e minha namorada “Lú” (Lucelaine) por todo apoio, motivação, amor, carinho, compreensão, educação, paciência, puxões de orelha...etc., desde muito antes deste trabalho se tornar realidade. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

“Toda geração tem a chance de mudar o mundo.”

Bono Vox – U2

“Manterei essa sabedoria na minha carne
Saio daqui acreditando em mais do que antes...”

Eddie Vedder

É com um conjunto de pequenas
respostas que solucionamos grandes
questões.

(O autor)

RESUMO

O gênero *Macrobrachium* Bate, 1868, pertence à família Palaemonidae, a qual é amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais, apresentando grande importância nos ecossistemas que habitam. As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam, preferencialmente, os ésteres de ácidos carboxílicos. Diferentes tipos de esterases têm sido caracterizadas em inúmeros organismos, fato este que comprova sua importância fisiológica. Os organofosforados (OP) e carbamatos (CM) compõem um grupo importante de praguicidas que agem inibindo um vasto grupo de enzimas, dentre elas, as esterases. A avaliação da atividade de acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) tem sido empregada com sucesso para monitorar a presença destes praguicidas no ambiente. O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a variabilidade genética de duas espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (*M. jelskii* e *M. amazonicum*), a partir da caracterização bioquímica das esterases do hepatopâncreas de machos e fêmeas adultos, e avaliar o comportamento das mesmas perante a exposição ao Diazinon e Clorpirifos (OPs) e Carbaril (CM). No presente trabalho, esse sistema enzimático foi analisado nas duas espécies de camarões citadas acima. Foram visualizadas 12 bandas esterásicas em ambas as espécies, compreendendo quatro classes diferentes das mesmas (acetilesterase, arilesterase, carboxilesterase e colinesterase). Nenhuma diferença qualitativa na presença de bandas interespecíficas, e nem quanto ao sexo, essas diferenças existem apenas nas frequências das mesmas. Em *M. amazonicum* o diazinon inibiu parcialmente a AChEs, *in vitro*, e apresentou pequena inibição em CbE. Por outro lado este composto não atuou efetivamente em nenhuma das enzimas testadas em *M. jelskii*. O clorpirifos induziu uma grande inibição tanto em AChE quanto em CbE para ambas as espécies testadas, sendo este efeito inibitório mais pronunciado em CbE de *M. amazonicum*. O carbaril inibiu parcialmente AChE de *M. amazonicum* e fortemente CbE. Por outro lado, *M. jelskii* apresentou grande sensibilidade em ambas às enzimas, expostas a este mesmo pesticida. A enzima AChE de machos de *M. amazonicum*, expostos *in vivo* ao diazinon, não apresentaram inibição significativa, ao passo que as fêmeas esta enzima apresentou inibição na concentração de 50µg/L em dois dias de exposição e nas concentrações de 10 e 50µg/L em sete dias de exposição. No que diz respeito à CbE, tanto de machos quanto de fêmeas, apresentou inibição quando expostos a 50µg/L deste mesmo composto por dois dias, ao passo que com sete dias de exposição esta inibição não foi observada. Por outro lado, machos de *M. amazonicum* expostos à concentração de 50µg/L do carbaril por dois dias, apresentaram inibição significativa de AChE, enquanto que com sete dias de exposição não há inibição, a AChE de fêmeas desta espécie não apresentou sensibilidade por este pesticida. Quanto as CbE não observou-se inibição em nenhuma das enzimas testadas para esta espécie, quando exposta ao carbaril. Ao observar os padrões de inibição apresentadas por *M. jelskii*, observa-se que quando esta espécie é exposta ao diazinon apenas AChE de fêmeas apresentaram inibição, na concentração de 50µg/L com dois dias de exposição, com sete dias não houve inibição. Por outro lado, este composto inibiu CbEs apenas de machos desta espécie, com 50µg/L de concentração em ambos os tempos de exposição. O carbaril não inibiu nenhuma das enzimas testadas para esta espécie. Desta forma podemos concluir que a semelhança nas frequências das bandas esterásicas podem estar relacionadas à importância fisiológica dessas enzimas e do hepatopâncreas, e a alta proximidade filogenética entre as duas espécies. Diferenças no padrão de inibição entre machos e fêmeas podem estar relacionadas a diferenças fisiológicas ligadas a processos reprodutivos e, apesar da proximidade filogenética entre as duas espécies, observou-se variações no padrão de resposta inibitória.

Palavras-chave: *Macrobrachium*, esterase, organofosforado, carbamato

ABSTRACT

The genus *Macrobrachium* Bate, 1868, belongs to the Palaemonidae family, which is widely distributed throughout tropical and subtropical regions, with great importance in their habitat. Esterases belong to a group of enzymes which hydrolyze rather carboxylic acids esters. Different kind of esterases have been characterized in numerous organisms, this fact proves their physiologic importance. Organophosphate and carbamate compose an important group of pesticide which acts inhibiting a large group of enzymes, including esterases. The activity evaluation of acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) have been successfully employed to monitor this pesticides presence in environment. The present study has as general aim studying the genetic variability of two species from *Macrobrachium* genus (*M. jelskii* e *M. amazonicum*) from the esterases biochemistry characterization in hepatopancreas of adult male and female, and evaluates the behavior of these enzymes before the exposure to Diazinon and Clorpirifos (OPs) and Carbaril (CM), important pesticides widely used in our region. In this work, this enzymatic system was analyzed in two prawns species mentioned above. Twelve esterasic bands were observed in both species, comprising four different classes of them (acetilesterase, arilesterase, carboxylesterase e colinesterase). No qualitative difference in the presence of interespecific bands, neither about the sexes was observed. These differences are only in their frequencies. In *M. amazonicum*, diazinon inhibited partially AChE and showed small inhibition of CbE. On the other hand this chemical did not operate in none of the enzymes tested for *M. jelskii*. Chlorpirifos induced a great inhibition as in AChE as in CbE to the tested species, but this inhibitory effect was more pronounced in *M. amazonicum* CbE. Carbaril inhibited partially *M. amazonicum* AChE and strongly CbE. On the other hand *M. jelskii* showed great sensitivity to both tested enzymes, exposed to this chemical. The enzyme AChE of *M. amazonicum* males exposed *in vivo* to diazinon, showed no significant inhibition, whereas in females this enzyme showed inhibition at a concentration of 50µg/L over two days of exposure and the concentrations of 10 and 50µg/L in seven days of exposure. As regards to the CbE both males and females showed inhibition when exposed to 50µg/L of the same compound for two days, whereas with seven days of exposure this inhibition was not observed. With regards to CbE, both males and females suffered inhibition when exposed to 50µg / L of this same compound for two days, whereas with seven days of exposure this inhibition was not observed. On the other hand, *M. amazonicum* male exposed to the concentration of 50µg/L of carbaryl for two days showed significant inhibition of AChE whereas seven days of exposure showed no inhibition, AChE of this species females showed no sensitivity to this pesticide. According to the CbE no inhibition was observed in any of the tested enzymes for this species when exposed to carbaryl. Observing the patterns of inhibition in *M. jelskii* when exposed to diazinon only females showed inhibition of AChE in a concentration of 50µg/L in two days of exposure, with seven days no inhibition was observed. Moreover, this compound inhibited only this species CbE males with 50µg/L of concentration at both exposure times. Carbaryl did not inhibit any of the enzymes tested for this species. Thus we can conclude that the similarity in the frequency of esterásic bands may be related to the physiological importance of these enzymes and the hepatopancreas, and the high phylogenetic proximity between the two species. Differences in the pattern of inhibition between males and females may be related to physiological differences related to reproductive processes and although the close phylogenetic relationship between the two species we observed variations in the pattern of inhibitory response.

Key-words: *Macrobrachium*, esterase, organophosphate, carbamate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de fêmeas ovadas de <i>M. jelskii</i> (A) e <i>M. amazonicum</i> (B).....	15
Figura 2. Localização anatômica do hepatopâncreas.....	19
Figura 3. Fórmula estrutural do Diazinon.	24
Figura 4. Fórmula estrutural do clorpirifos.	24
Figura 5. Fórmula Estrutural do Carbaril	25
Figura 6. Mapa indicando o local de coleta (A) e foto da represa Barra Mansa (B).	27
Figura 7. Esquema da montagem dos experimentos <i>in vivo</i>	30
Figura 8. Gel de poliacrilamida a 10% mostrando as 12 bandas esterásicas encontradas no hepatopâncreas. Amostras de 1 a 4: <i>M. amazonicum</i> (1 e 2 fêmea, 3 e 4 macho). Amostras de 5 a 8: <i>M. jelskii</i> (5 e 6 fêmea, 7 e 8 macho).	35
Figura 9. Cinética de inibição de AChE e CbE em fêmeas e machos de <i>M. amazonicum</i> expostos ao diazinon, clorpirifos e carbaril.	42
Figura 10. Cinética de inibição de AChE e CbE em fêmeas e machos de <i>M. jelskii</i> expostos ao diazinon, clorpirifos e carbaril.	49
Figura 11. Cinética de inibição <i>in vivo</i> de AChE e CbE em fêmeas e machos de <i>M. amazonicum</i> expostos ao diazinon e carbaril.	55
Figura 12. Cinética de inibição <i>in vivo</i> de AChE e CbE em fêmeas e machos de <i>M. jelskii</i> expostos ao diazinon e carbaril.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de machos e fêmeas de cada espécie analisada e as frequências de suas respectivas bandas esterásicas.....	36
Tabela 2. Padrão de inibição e classificação das bandas esterásicas no hepatopâncreas nas espécies de <i>Macrobrachium</i> analisadas (-: ausência de inibição; +, ++, +++, +++++: graus de inibição em ordem crescente; Mth: malathion; Eser: sulfato de eserina; pOHMB: para-hidroximercuribenzoato; ND: banda não detectada).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – acetilcolinesterase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CbE – carboxilesterase

CESP – Companhia Energética de São Paulo

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CM – carbamato

DTNB – ditionitrobenzeno

EST – Esterase

NaF – fluoreto de sódio

NRC – Committee on Biological Markers of the National Research Council

OP – Organofosforado

pOHMB – para-hidroximercuribenzoato

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. O gênero <i>Macrobrachium</i>	15
1.2. Avaliação dos níveis de contaminação do ambiente aquático	17
1.3. Papel fisiológico do hepatopâncreas nos crustáceos	19
1.4. Atividade das enzimas esterásicas na metabolização de compostos xenobióticos	20
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Obtenção das amostras	27
3.2. Obtenção do padrão de esterases	27
3.3. Quantificação de proteínas totais	29
3.4. Exposição controlada aos diferentes praguicidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
3.5. Análise espectrofotométrica dos biomarcadores após exposição aos pesticidas	31
3.6. Concentração da amostra para inibições <i>in vitro</i>	31
3.7. Análise dos dados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Padrão de esterases obtido por eletroforese.....	33
4.2. Testes de inibição <i>in vitro</i>	41
4.3. Padrões de inibição <i>in vitro</i> observados em <i>M. amazonicum</i>	41
4.3.1. Exposição ao Diazinon	41
4.3.2. Exposição ao Clorpirifos.....	43
4.3.3. Exposição ao Carbaril	45
4.4. Padrões de inibição <i>in vitro</i> observados em <i>M. jelskii</i>	47
4.4.1. Exposição ao Diazinon	47
4.4.2. Exposição ao Clorpirifos.....	50
4.4.3. Exposição ao Carbaril	52
4.5. Testes de exposição <i>in vivo</i>	54
4.6. Padrões de inibição <i>in vivo</i> observados em <i>M. amazonicum</i>	54
4.6.1. Exposição ao diazinon	54
4.6.2. Exposição ao carbaril.....	57
4.7. Padrões de inibição <i>in vivo</i> observados em <i>M. jelskii</i>	58
4.7.1. Exposição ao diazinon	58
4.7.2. Exposição ao carbaril.....	60
4.8. Considerações Finais.....	61
5. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXOS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Macrobrachium*

Os camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868, pertencem à família Palaemonidae. Seus representantes habitam as proximidades do litoral e, também, ambientes de água doce, o que desperta a curiosidade daqueles que acreditam serem estes animais exclusivamente marinhos (TADDEI, 2006).

A família Palaemonidae abriga mais de cem espécies amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Apresentam hábitos crípticos e noturnos, permanecendo no período diurno em abrigos formados por fendas, buracos ou raízes e folhas submersas (MAGALHÃES, 2000; MOSSOLIN; BUENO, 2003).

Particularmente, na região noroeste de São Paulo, podemos encontrar duas espécies típicas de ambientes de represa pertencentes ao gênero *Macrobrachium*: *M. jelskii* (Figura 1A) e *M. amazonicum* (Figura 1B).

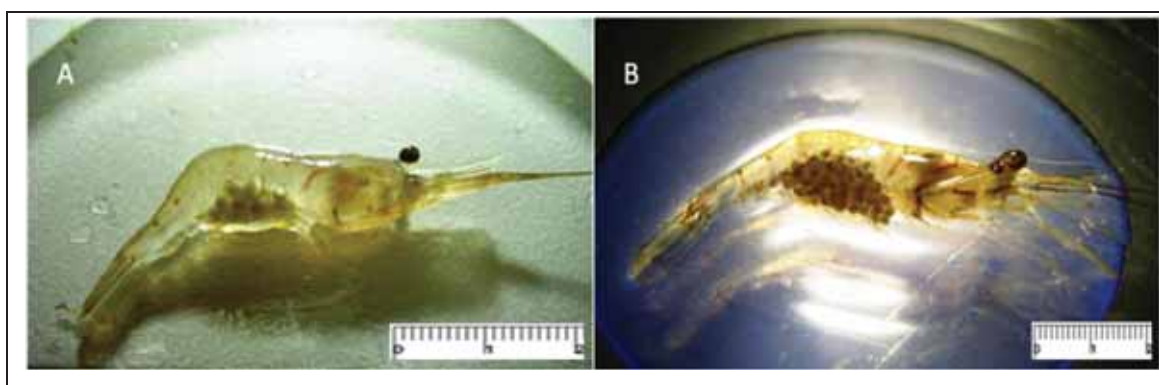


Figura 1. Foto de fêmeas ovadas de *M. jelskii* (A) e *M. amazonicum* (B).

Várias espécies deste gênero possuem um potencial valor econômico, pois constituem fontes de proteína para a dieta humana e animal. Devido à qualidade de sua carne (VALENTI, 1984). Valenti (1998) destaca que o cultivo de espécies do gênero *Macrobrachium* ocupa 5% da produção camaroeira mundial. A espécie mais utilizada em cultivos, *Macrobrachium rosenbergii*, já atingiu a produção de 5 t/ha/ano.

Outra utilização comercial destes organismos é a pesca esportiva, onde são utilizados como iscas vivas. Contudo, essa prática pode interferir em questões ambientais, como à introdução das espécies cultivadas em ambientes naturais, uma vez que os pescadores soltam, na natureza, os animais não utilizados como isca (MAGALHÃES et al., 2005).

Além dos fatores econômicos, esses crustáceos apresentam grande importância nos ecossistemas aquáticos, atuando como predadores de peixes e outros invertebrados ou como presas de alguns insetos, peixes, aves, répteis e mamíferos (PORTO, 1998).

Segundo Magalhães (2000), espécies que habitam diferentes ambientes, como as do gênero *Macrobrachium*, apresentam interessantes particularidades adaptativas quanto aos seus aspectos morfológicos, fisiológicos e de padrões comportamentais que podem torná-los objetos de muitos estudos. Entretanto, pouco se sabe a respeito da biologia desses organismos, uma vez que os trabalhos encontrados na literatura abordam, principalmente, aspectos ecológicos e do manejo de espécies com potencial comercial.

Ainda segundo Magalhães (2000) e Guerra et al., (2010), o esforço de coleta da fauna de decápodes dulcícolas, ao contrário dos marinhos, é esporádico e o conhecimento nesta área ainda apresenta carência de informações. As coletas e pesquisas concentraram-se na região leste do Estado de São Paulo e pouco se conhece a respeito das bacias das demais regiões. É imprescindível a realização de estudos nestas áreas geográficas, tendo em vista as modificações ambientais já verificadas em várias bacias e sub-bacias, e seus eventuais impactos causados por diversos fatores, tais como: os problemas de poluição e deterioração de ecossistemas aquáticos decorrentes da influência antropogênica, a presença de espécies exóticas em populações naturais, e os desequilíbrios ecológicos e ambientais como consequência direta desses fatores (LORENZON; PASCUAL; FERRERO, 2002; ZOU et al., 2003).

Em uma revisão sobre a fauna de decápodes de água doce no Brasil, Melo (2003) também afirma que o conhecimento destes organismos encontra-se em estágio inicial e ainda incompleto, destacando as prováveis causas para esta situação como sendo a grande extensão territorial do país e o pequeno número de trabalhos relacionados a estes invertebrados de água doce.

O Brasil possui a maior rede hidrográfica do mundo, assim como uma das maiores diversidades de representantes da fauna de decápodes. Porém, o clima tropical favorece a colonização e a proliferação de pragas agrícolas e, como consequência, o uso indiscriminado de praguicidas pode comprometer drasticamente a vida nos ambientes aquáticos.

Particularmente na região Noroeste do Estado de São Paulo, onde a atividade agrícola é intensa, o uso indiscriminado destes compostos que atinge rios e lagos, tendo perturbado o ambiente de forma severa. Tais perturbações, por sua vez, podem causar

sérios danos fisiológicos nas espécies que habitam esses ambientes aquáticos, dentre elas podemos destacar os camarões do gênero *Macrobrachium*.

Um fato importante que deve ser salientado diz respeito à introdução das espécies *M. jelskii* e *M. amazonicum* no Estado de São Paulo. Machado (1966) e Torloni et al., (1993) confirmaram que entre 1966 e 1973, *M. jelskii* e *M. amazonicum* foram introduzidos na estação de piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo), como consequência do processo de cultivo do peixe *Plagioscion squamosissimus* (corvina), oriundo dos reservatórios do Nordeste brasileiro. Por volta de 1970, provavelmente por causa acidental, essas espécies atingiram o ambiente natural, inicialmente no Rio Pardo, alcançando, em seguida, o Rio Grande e os reservatórios de Jupia e Ilha Solteira, no alto do Rio Paraná. Outra possibilidade apontada por esses autores é a prática esportiva dos “Pesque e Pague”, que utilizam esses camarões como iscas vivas, e muitas vezes acabam liberando no ambiente os espécimes não utilizados. Por fim, formas larvais, juvenis ou imaturas desses decápodes podem ter sido transportadas inadvertidamente, associadas às raízes de plantas aquáticas utilizadas para abrigar e proteger os peixes nos reservatórios.

Conforme mencionado, as bacias hidrográficas do Estado de São Paulo têm sofrido severas intervenções antropogênicas que estão modificando drasticamente a biota aquática. A introdução de espécies exóticas em ambientes colonizados, os represamentos, a remoção da vegetação, as práticas agrícolas inapropriadas, o uso indiscriminado de praguicidas, e a liberação de poluentes têm provocado alterações nos parâmetros físicos e químicos da água. Estes, por sua vez, comprometem a saúde dos seres vivos que habitam nesses ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000).

Contudo, mesmo conhecendo essa problemática, trabalhos que relatem os impactos ambientais, econômicos, ecológicos, ou mesmo genéticos e fisiológicos nesses organismos, como consequência de sua introdução em um novo habitat e a contaminação ambiental resultante da ação antropogênica na literatura, ainda são escassos.

1.2. Avaliação dos níveis de contaminação do ambiente aquático

Atualmente, diferentes estratégias podem ser adotadas para se avaliar o nível de contaminação do ambiente aquático. Este pode ser medido a partir da identificação e quantificação dos poluentes presentes na água, nos sedimentos ou, ainda, diretamente nos organismos, principalmente peixes e crustáceos, os quais têm oferecido um campo

eficiente para obtenção de biomarcadores preditivos acerca da qualidade da água ambiental (AMORIM, 2003; BARBOSA et al., 2010).

Uma estratégia para análise da qualidade da água é a obtenção de biomarcadores de contaminação, que consiste no estudo das alterações biológicas em níveis molecular, celular ou fisiológico, avaliados diretamente no organismo ou em determinados órgãos, em espécimes que residem em áreas com suspeita de contaminação, e que expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes presentes no ambiente (LORENZON; FRANCESE; FERRERO, 2000; VIOQUE-FERNADEZ et al., 2007; TRIDICO et al., 2010; BITENCOURT et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011).

O termo biomarcador foi definido em 1987 pelo *Committee on Biological Markers of the National Research Council (NRC)* como indicador que sinaliza eventos em sistemas biológicos ou amostras, submetidos à exposição química (WALKER, 1996; SCHLENK, 1999). Este termo é utilizado de forma ampla, incluindo quase qualquer medida que possa refletir a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico (AZEVEDO; CHASIN, 2003). A resposta biológica a mudanças causadas no ambiente, sejam elas de origem antrópica ou natural, pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade de resposta a contaminantes, boa sensibilidade a compostos exógenos, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN et al., 1995). São várias as vantagens do uso de biomarcadores nos estudos de monitoramento ambiental, como alto potencial de diagnose das respostas biológicas a contaminante, sinalização dos efeitos das contaminações a longo prazo e até nos mais altos níveis de organização biológica. Os biomarcadores detectam as primeiras alterações nas respostas biológicas e com isso, medidas paliativas podem ser instauradas, evitando que os efeitos da intoxicação nos organismos cheguem a um ponto irreversível (VAN DER OOST et al., 2003).

Assim, no presente estudo, foram utilizadas duas espécies de camarões palemonídeos, *M. jelskii* e *M. amazonicum*, visando obter biomarcadores de contaminação ambiental. Essas espécies, como já foi mencionado, apresentam características biológicas e ecológicas favoráveis, as quais são importantes para a finalidade pretendida e, ainda, são espécies exóticas na região amostrada, e que têm

sofrido severas influências antrópicas. Como órgão de estudo, foi utilizado o hepatopâncreas, por apresentar um papel fisiológico importante nesses organismos.

1.3. Papel fisiológico do hepatopâncreas nos crustáceos

Nos decápodes, o hepatopâncreas consiste em um órgão relativamente desenvolvido, que ocupa a maior parte da cavidade cefalotorácica e está conectado ao estômago pilórico através de dois ductos primários como mostra a Figura 2 (BARNES; RUPPER, 2005).

Segundo Franceschini-Vicentini et al. (2009), suas funções estão relacionadas à digestão e absorção de nutrientes, ao estoque de reservas energéticas necessárias para os períodos de jejum, muda e processos reprodutivos (produção de ovos), à excreção dos metabólitos resultantes do processo digestivo e, ainda, à metabolização de compostos endógenos (hormônios, por exemplo) e componentes oriundos do ambiente, tais como os praguicidas orgânicos (JOHNSTON et al., 1998; SOUSA; PETRIELLA, 2000).

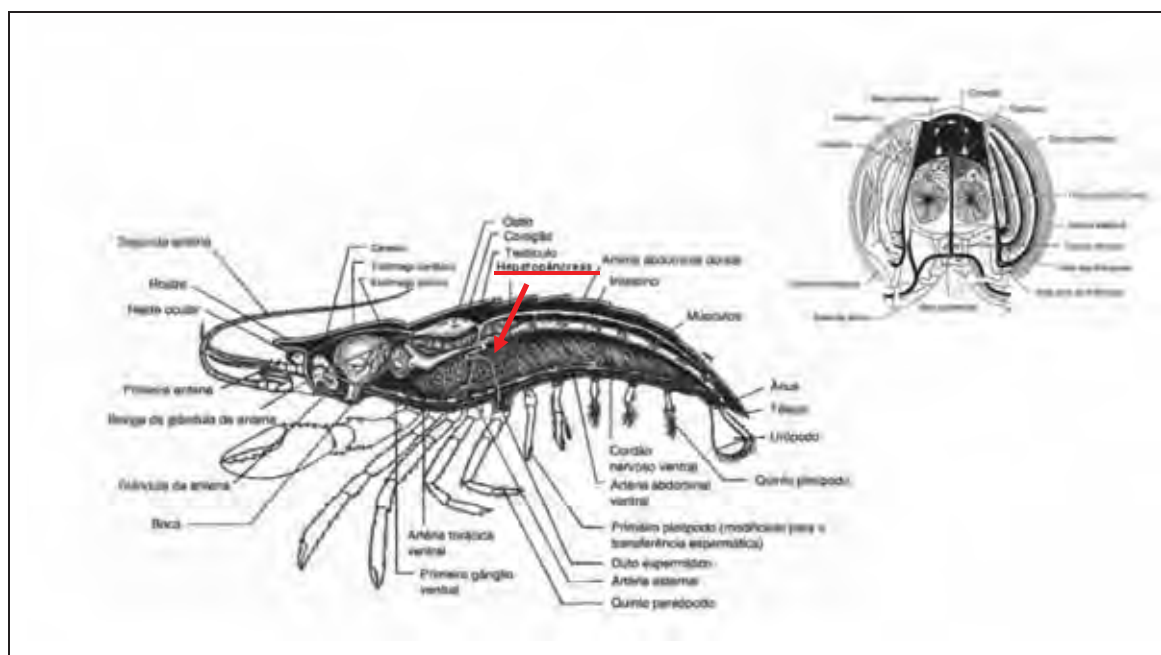


Figura 2. Localização anatômica do hepatopâncreas. (Modificado de Barnes et al., 2005).

Neste contexto, o hepatopâncreas apresenta-se como o principal órgão de desintoxicação em crustáceos, uma vez que ele acumula substâncias tóxicas durante esse processo. Esta importante função torna-o um bom biomarcador para poluição (ARUN; RAJENDRAN; SUBRAMANIAN, 2006; WU et al., 2008).

1.4. Atividade das enzimas esterásicas na metabolização de compostos xenobióticos

De modo geral, diferentes organismos podem metabolizar compostos xenobióticos a partir da atividade de sistemas enzimáticos diferentes. Entre estes sistemas, podemos destacar as esterases (WHEELOCK et al., 2008).

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam, preferencialmente, os ésteres de ácidos carboxílicos. Segundo Oakeshott (1993), elas são capazes de hidrolisar uma ampla gama de substratos, tais como amidas e peptídeos.

Diferentes tipos de esterases têm sido caracterizados em inúmeros organismos, desde bactérias, insetos, aves, répteis e mamíferos, fato este que comprova sua importância fisiológica (CASTIGLIONI-RUIZ; CERON; BICUDO, 1997; LAPENTA et al., 1998; NASCIMENTO; BICUDO, 2002; SOUSA-POLEZZI; BICUDO, 2005; FRASCO et al., 2006; FRASCO et al., 2010).

Amplamente estudadas em insetos, entre as suas funções fisiológicas nesses organismos, podemos destacar: degradação de hormônios (por exemplo, o hormônio juvenil); participação em processos digestivos, reprodutivos e, ainda, a degradação e aquisição de resistência a diferentes tipos de praguicidas pertencentes à classe dos organofosforados (OPs) e carbamatos (CMs) (SHANMUGAVELU et al., 2000; WEILL; LUTFALLA; MOGENSEN, 2004; WHEELOCK et al., 2008).

Segundo Oakeshott et al., (1993), com base na utilização de inibidores químicos, ainda nos insetos, podemos classificar as enzimas esterásicas em quatro grupos: a) carboxilesterases, que são enzimas envolvidas com a desintoxicação do organismo e, em várias espécies, estão relacionadas com a degradação do hormônio juvenil e a aquisição de resistência a inseticidas; b) arilesterases, envolvidas na degradação de substâncias tóxicas e na proteção contra estresse oxidativo causado por vários fatores; c) colinesterases, presentes em grandes quantidades no tecido nervoso, estão envolvidas em diversas atividades fisiológicas, dentre elas, a degradação da acetilcolina, importante neurotransmissor; d) acetilesterases, enzimas envolvidas na degradação de feromônios e processos reprodutivos e, ainda, processos digestivos e subdivididas em acetilcolinesterases (AChEs) e pseudocolinesterases (SHANMUGAVELU et al., 2000; NASCIMENTO; BICUDO, 2006; MERLIN et al., 2007).

Até o presente, poucos estudos para a caracterização de enzimas esterásicas foram realizados em crustáceos, mesmo sabendo-se de sua importância fisiológica (BARATA et al., 2007). Veldsema-Currie (1973) estudou as propriedades bioquímicas

e eletroforéticas das esterases do camarão *Palaemonetes varians*. A partir da análise de vários órgãos, foram encontradas altas taxas de atividade esterásica, principalmente de AChEs, dentre outras colinesterases, as quais produziram oito bandas distribuídas em vários órgãos (olhos, cérebro, gânglio subesofágico e músculos abdominais), que parecem estar relacionadas com a atividade neural, pois devem funcionar como neurotransmissores e estão associadas às fibras nervosas sensoriais, fundamentais para a sobrevivência dos crustáceos.

Outros trabalhos compararam a atividade das acetilcolinesterases (AChEs) e carboxilesterases (CbEs) de algumas espécies de camarões na presença de inseticidas OPs e CMs. A partir da mensuração da atividade dessas enzimas foi observada uma rápida queda na taxa de atividade das mesmas e, algumas vezes, inibições irreversíveis. Segundo estes trabalhos, tal fato explica as sérias alterações metabólicas e fisiológicas causadas pela presença destes inseticidas na água podendo, inclusive, serem letais (*Macrobrachium lamarrei*: OMKAR, 1985; *Metapenaeus monoceros*: REDDY; JAYAPRADA; RAO, 1990; *Palaemon serratus*: BOCQUENÉ; GALGANI, 1991; FRASCO et al., 2006; *Macrobrachium malcolmsonii*: BHAVAN; GERALDINE, 2002).

As CbEs formam uma família de enzimas que hidrolisam ésteres carboxílicos. Estão presentes em vários tecidos e órgãos, de invertebrados e vertebrados, mas segundo Wheelock et al. (2008), são amplamente encontradas no fígado e cada uma delas apresenta um substrato específico, endógeno ou xenobiótico, contendo um grupo éster. Envolvidas com a desintoxicação do organismo, em várias espécies de insetos, estão relacionadas também com a degradação do hormônio juvenil, o qual controla a metamorfose, a oogênese, a vitelogênese e a produção de feromônios (OAKESHOTT et al., 1993; CASTIGLIONI-RUIZ; CERON; BICUDO, 1997; LIMA-CATELANI; CERON; BICUDO, 2004; GUNNING, 2006; NASCIMENTO; BICUDO, 2006).

As colinesterases também são enzimas importantes fisiologicamente, envolvidas com a degradação de neurotransmissores e a condução neural. Conforme já mencionado, esse grupo de enzimas pode ser subdividido em acetilcolinesterase e pseudocolinesterase. Estas últimas são inibidas pelo NaF (fluoreto de sódio). As acetilcolinesterases estão localizadas nas membranas de diversos tipos celulares e controlam as correntes iônicas nas membranas excitáveis, possuindo um importante papel nos processos de condução nervosa e nas junções neuromusculares. Já as pseudocolinesterases, apesar de bastante freqüentes, ainda são pouco estudadas

(WHITTAKER,1984; OAKESHOTT et al., 1993; CASTIGLIONI-RUIZ; CERON; BICUDO, 1997; LIMA-CATELANI; CERON; BICUDO, 2004; GUNNING, 2006).

De acordo com Frasco et al. (2010), a caracterização de enzimas esterásicas, em especial as AChEs e CbEs, pode fornecer importantes subsídios utilizados em programas de monitoramento ambiental e auxiliar na obtenção de biomarcadores preditivos que sejam capazes de atestar a qualidade da água ambiental, indicando a presença de CMs e OPs. Uma vez que seu baixo custo de análise e a facilidade nos ensaios de quantificação, boa reprodutibilidade e sua relevância ecológica, tornam os estudos de inibição de esterases cada vez mais comuns entre a bateria de biomarcadores mais utilizados na avaliação ecotoxicológica (NUNES, 2011).

Até o início da década de 40, o desenvolvimento e utilização de pesticidas orgânicos ainda era limitado, predominando o uso de compostos inorgânicos a base de cobre e arsênio (TOMITA; BEYRUTH, 2005).

Com a descoberta da propriedade inseticida do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) instalou-se uma cultura agrícola baseada no uso de agrotóxicos (SILVA; SANTOS, 2007).

É importante ressaltar que o uso destes produtos aumentou substancialmente a produtividade agrícola, além de auxiliar no combate a vários vetores ligados a diversas doenças, mas desencadeou inúmeros problemas ambientais como contaminação aquática, incluindo os lençóis freáticos, e problemas relacionados à saúde, como intoxicação de trabalhadores expostos a estes compostos e aumento da incidência de câncer ligado à utilização de pesticidas organoclorados (TOMITA; BEYRUTH, 2005; SILVA; SANTOS, 2007).

O alto índice de contaminação em populações naturais em decorrência da utilização de agrotóxicos revelou a necessidade de um aperfeiçoamento dos mecanismos de monitoramento, controle do uso, manuseio e descarte destes produtos (RODRIGUES et al., 2005).

Estes compostos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva ou escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações regulares. Sua lixiviação através do perfil dos solos pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos (TOMITA; BEYRUTH, 2005).

Os OPs e CMs compõem um grupo importante de praguicidas que agem inibindo um vasto grupo de enzimas, dentre elas, as esterases (TRAPÉ, 2003;

RODRIGUES et al., 2005; VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALVES DE ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007).

Segundo Printes e Callaghan (2006) e Sarkar et al., (2006) a avaliação da atividade de AChE e CbE, tem sido empregada com sucesso para monitorar a exposição a pesticidas (OPs e CMs), e detectar a presença destes compostos no ambiente.

Algumas alterações moleculares, tais como: modificações covalentes ou inativação protéica por fosforilação podem induzir a perda na atividade enzimática proporcionada por estes pesticidas (STRINGUETTI; GUILHERMINO; SILVA, 2008).

Tanto as substâncias OPs como os CMs apresentam alto nível de inibição das esterases, porém diversos autores demonstraram variações no padrão de inibição decorrentes da concentração, do tempo de exposição e do órgão analisado. Algumas destas enzimas, como por exemplo, as CbEs, sofrem inibição em alguns tecidos (glândulas digestivas), ao passo que não são afetadas em outros (tecido nervoso e muscular) (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALVES DE ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007).

Observações feitas por Bhavan e Geraldine (2001) mostram que a atividade de AChE no hepatopâncreas de *M. malcolmsonii* diminui significativamente *in vivo*, quando exposto a praguicidas, resultando em distúrbios comportamentais e fisiológicos.

Além de alterações moleculares e conseqüentemente fisiológicas, a histoarquitetura do hepatopâncreas apresenta-se igualmente comprometida quando este é exposto a estes compostos. Alterações significativas nos túbulos hepatopancreáticos, nas células epiteliais e formação de túbulos necróticos são freqüentemente observadas neste órgão, em tal situação (BHAVAN; GERALDINE, 2000).

O Diazinon e o Clorpirifos (OP) e o Carbaril (CM) são praguicidas mundialmente utilizados, tanto na agricultura quanto para controle de pragas domésticas. Desta forma torna-se muito comum que estes compostos sejam encontrados na natureza, resultado da deriva, aplicação intencional ou descarte inapropriado (TOMITA; BEYRUTH, 2005; TRAPÉ, 2003; ANVISA, 2010).

O Diazinon é um agrotóxico classificado como sendo de alto risco, ou seja, apresenta uma alta toxicidade em seres vivos. Está classificado na família química dos organofosforados, cuja fórmula geral é dietil-2-isopropil-4-metil-6-pirimidil tionofosfato (C₁₂ H₂₁ N₂ O₃ PS). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 3 (CETESB, 2010).

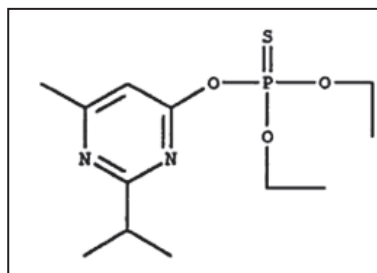


Figura 3. Fórmula estrutural do Diazinon (Modificado de Kamrin, 1997).

Em contato com a água este composto sofre uma reação dependente de sua concentração, a qual forma monotiropirofosfato de tetraetila, um composto altamente tóxico. O diazinon atua inibindo a AChE, que é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, importante para a transmissão do impulso nervoso em fibras colinérgicas e em junções neuromusculares (FUKUTO, 1990).

O clorpirifos é um pesticida cuja classificação se enquadra em alto risco de toxicidade. Pertence à família química dos organofosforados, de nome químico: O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridilfosforo tioato (C₉ H₁₁ Cl₃ NO₃ P S). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 4 (ANVISA, 2010).

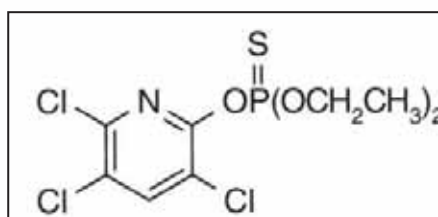


Figura 4. Fórmula estrutural do clorpirifos (Modificado de ANVISA, 2010).

Quando em contato com organismos vivos é metabolizado em oxon-clorpirifos (clorpirifos-oxon), potencializando, assim, seu efeito tóxico, uma vez que adquire reatividade frente às enzimas, principalmente esterases.

O Carbaril é um pesticida classificado em um patamar de risco entre alto e moderado, ou seja, sua toxidade pode variar de acordo com sua concentração. Enquadra-se na família química dos carbamatos, cujo nome químico é 1-naftil metilcarbamato ou metilcarbamato de naftila (C₁₂H₁₁NO₂). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 5 (ANVISA, 2010).

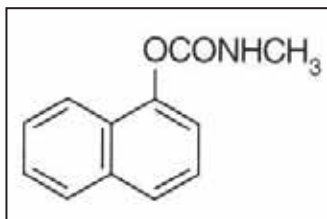


Figura 5. Fórmula Estrutural do Carbaril (Modificado de Kamrin, 1997).

Ao contrário do Diazinon, o Carbaril promove uma ligação química reversível com as enzimas esterásicas (AChE e CbE), possibilitando, assim, que estas retornem à sua forma nativa espontaneamente após a carbamilação, por processos de oxidação do xenobiótico (FUKUTO, 1990).

Assim, os fatos de *M. jelskii* e *M. amazonicum* terem sido introduzidos recentemente em nossa região, a atividade do hepatopâncreas e suas enzimas esterásicas (AChEs e CbEs), tornam estas espécies importantes modelos experimentais. Estudos genéticos e bioquímicos poderão detectar prováveis adaptações fisiológicas na expressão e atividade das enzimas esterásicas, inerentes à ocupação destes novos habitats e, ainda, fornecer importantes biomarcadores de contaminação aquática, capazes de predizer a qualidade da água ambiental.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a variabilidade genética de duas espécies de camarões de água doce, pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (*M. jelskii* e *M. amazonicum*), a partir da caracterização bioquímica das esterases do hepatopâncreas de machos e fêmeas adultos, e avaliar o comportamento das mesmas perante a exposição ao Diazinon e Clorpirifos (OPs) e Carbaril (CM), importantes praguicidas amplamente utilizados em nossa região.

Como objetivos específicos, pretendeu-se:

- caracterizar, eletroforeticamente, o sistema aloenzimático EST (enzimas esterásicas), do hepatopâncreas em machos e fêmeas adultos de *M. jelskii* e *M. amazonicum*, a partir da análise dos zimogramas obtidos.

- verificar a existência de diferentes respostas bioquímicas metabólicas das acetilcolinesterases e carboxilesterases do hepatopâncreas das duas espécies em questão, em ambos os sexos, frente à ação dos praguicidas diazinon e clorpirifos (OPs) e carbaril (CM) *in vitro*; e após exposição controlada *in vivo* (diazinon e carbaril), em concentrações subletais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

As amostras de *M. jelskii* e *M. amazonicum* utilizadas no presente estudo, foram coletadas na Represa Barra Mansa, Mendonça, SP (21°14'27"S e 49°56'28"W) (Figura 6, A e B).

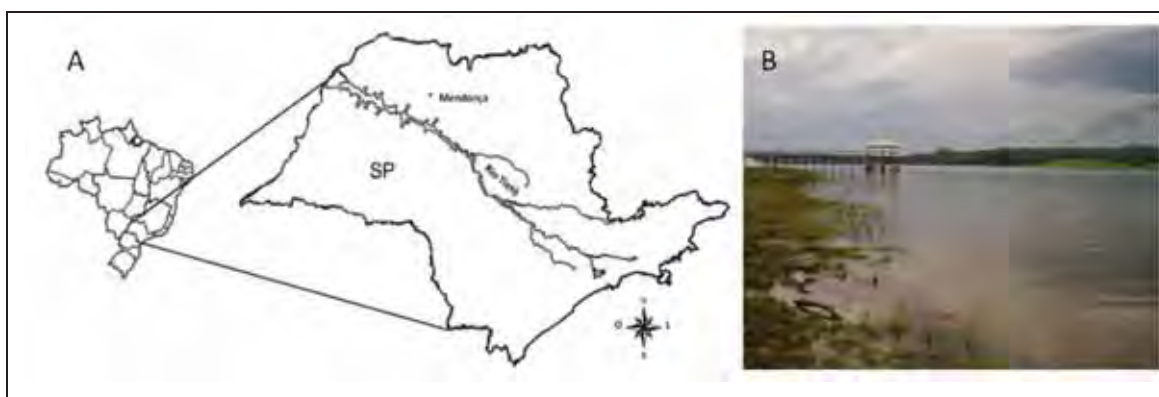


Figura 6. Mapa indicando o local de coleta (A) e foto da represa Barra Mansa (B).

Nas coletas foi utilizada uma peneira (2mm de malha), passada sob a vegetação subaquática e entre formações rochosas e plantas que margeiam o leito do rio. Os animais coletados foram armazenados em caixa de plástico e, então transportados para o Laboratório de Biologia Molecular da UNIRP. Durante o traslado, a água da caixa foi permanentemente oxigenada com compressores de ar. No laboratório, os espécimes coletados foram identificados e sexados segundo Melo (2003). Após a identificação e a separação por sexo, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática na UNESP, para dissecação e remoção do hepatopâncreas. Após este procedimento, as amostras foram congeladas a -80° C. 72 espécimes, para cada experimento, foram mantidos vivos para a realização de testes de exposição *in vivo*.

3.2. Obtenção do padrão de esterases

Para a obtenção do perfil isoenzimático esterásico do hepatopâncreas, foram analisados individualmente 45 machos e 705 fêmeas adultos de *M. jelskii* e 30 machos e 620 fêmeas adultos de *M. amazonicum*, totalizando 1400 indivíduos. O hepatopâncreas

foi homogeneizado, em 150µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8), a 0°C e centrifugado a 2750 x g, por 3 minutos.

De cada amostra foram utilizados 10µl do sobrenadante, que foram aplicados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 10%, preparado segundo o protocolo desenvolvido por Ceron (1988): em 8 ml de solução acrilamida/bisacrilamida (2,6%) foram acrescentados 6,25 ml de Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, 25 ml de água destilada, 0,40 ml de solução de persulfato de amônia a 2% e 25µl de TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina). Em seguida, a solução foi transferida para as placas de vidro.

Após a polimerização do gel, as placas foram presas em cuba de acrílico para eletroforese vertical (posteriormente o tampão foi adicionado) para a aplicação das amostras. Os géis foram submetidos à eletroforese por aproximadamente cinco horas, com voltagem constante (200V), utilizando-se, para isto, 3,5 litros de Tampão de Corrida Tris-Glicina 0,1M, pH 8,3.

Após a corrida, os géis foram submetidos à detecção das esterases seguindo o método descrito por Ceron (1988): onde os mesmos foram pré-incubados por 60 minutos em 50 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,2, à temperatura ambiente. Em seguida, o tampão foi retirado e acrescentou-se a solução de coloração contendo 30 mg de α -naftilacetato, 30 mg de β -naftilacetato, 60 mg de *Fast Blue RR* em 50 ml de Tampão Fosfato 0,1M pH 6,2. Os géis permaneceram incubados com agitação por 1 hora, na ausência de luz. Por fim, os mesmos foram tratados por 24 horas com solução decolorante (etanol-ácido acético) e mantidos em recipientes plásticos contendo solução conservante (glicerina-ácido-acético), até sua fotodocumentação (CERON; SANTOS; BICUDO, 1992).

Foram realizados procedimentos de coloração das esterases, em diferentes pHs, a fim de se detectar possíveis bandas que não estivessem sendo coradas nos testes usuais em pH 6,2. As mesmas amostras foram pré-incubadas em 100 ml de Tampão Fosfato, por duas horas e, posteriormente, incubadas com a solução de coloração para esterases descrita no item anterior. Os tampões utilizados foram o acetato de sódio 0,1M para os pHs 4,0 e 5,0 e fosfato de sódio 0,1M para os pHs 6,2 (usual) e 8,0 (CASTIGLIONI-RUIZ et al., 1997).

Também foram utilizados testes com substâncias que atuam como inibidores de enzimas esterásicas, facilitando a classificação das mesmas com base no comportamento das enzimas na presença destes compostos. No presente estudo, foram

utilizados os seguintes inibidores: NaF 1,0 mM; Malathion 0,4 mM; pOHMB (para-hidroximercuribenzoato) 1,0 mM e sulfato de eserina 1,0 mM (OAKESHOTT et al., 1993; CASTIGLIONI-RUIZ; CERON; BICUDO, 1997; CERON, 1988). Os mesmos foram acrescentados, separadamente, na etapa de pré-incubação com tampão fosfato descrita anteriormente e, em seguida, os géis foram submetidos aos processos normais de coloração, descoloração, conservação e fotodocumentação rotineiros. Este processo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da UNIRP (Centro Universitário de Rio Preto).

3.3. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais do hepatopâncreas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O reagente de Bradford contém o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução ácida. Este ao se ligar às proteínas forma um complexo aniônico estável, causando uma visível mudança na coloração de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. Esse complexo tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e a comparação dos resultados à curva padrão, com valores de concentração conhecidos (extrato de albumina bovina), fornecem a concentração da proteína em estudo.

3.4. Exposição controlada aos diferentes praguicidas *in vivo* e *in vitro*

Para a obtenção das respostas metabólicas dos animais aos diferentes compostos foram constituídos quatro grupos de animais (*M. jelskii* - macho e fêmea e *M. amazonicum* - macho e fêmea) os quais foram expostos ao diazinon, clorpirifos e carbaril.

Para análise das respostas *in vitro* foi utilizado um *pool* contendo dez hepatopâncreas de espécimes não pré-expostas. Os quais foram homogeneizados e posteriormente armazenados em freezer -80°C. No ato da mensuração da atividade esterásica foram adicionadas soluções dos pesticidas (Diazinon ou Clorpirifos (OP), ou Carbaril (CM) em concentrações crescentes (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10mM), sendo a mistura posteriormente submetida à incubação a 30 °C por 15 minutos e analisados por espectrofotometria segundo Ellman et al. (1961). Iodeto de acetiltiocolina e feniltioacetato foram utilizados como substrato para a atividade da AChE e CbE, respectivamente, medindo-se, em espectrofotômetro, a formação do produto derivado da

reação entre o composto tiólico produzido pela ação da enzima sobre o substrato, sendo este corado de amarelo pelo ditionitrobenzeno (DTNB), esta reação pode ser medida em um comprimento de onda de 412 nm no espectrofotômetro. Foram ainda padronizados os volumes de 60 μL de amostra para AChE e 5 μL de amostra para CbE, os quais corresponderam aos melhores volumes para a análise espectrofotométrica nas espécies em questão.

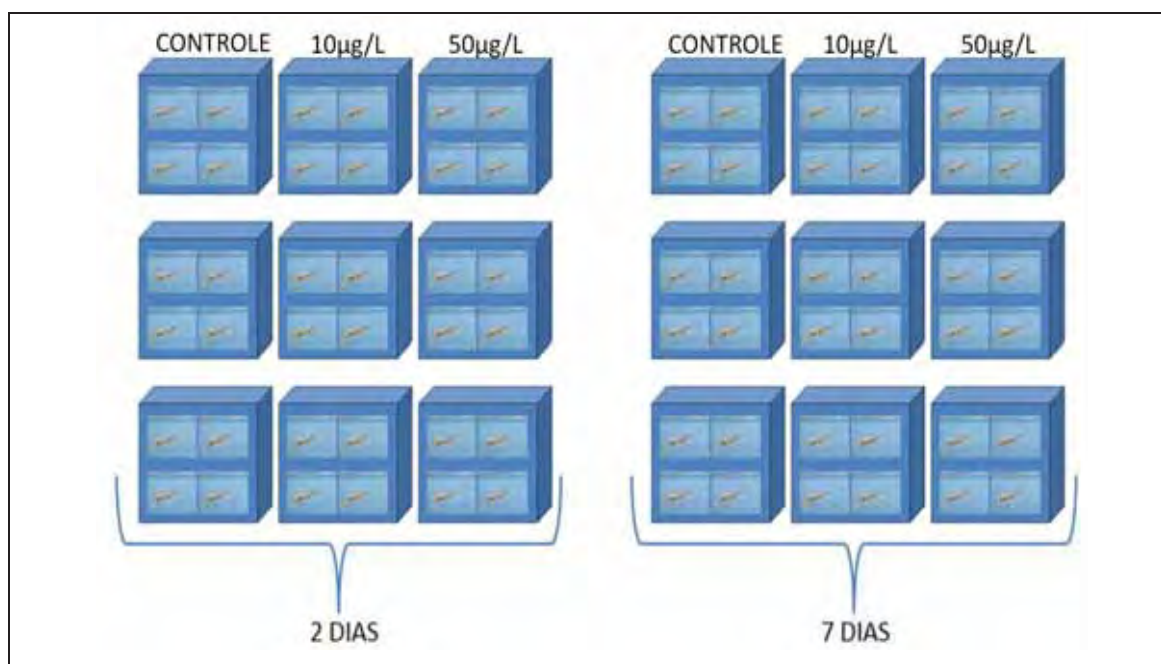


Figura 7. Esquema da montagem dos experimentos *in vivo*.

Para análise *in vivo* os espécimes foram confinados em nove tanques contendo 1,5L de água potável livre de cloro. Três dos tanques receberam uma concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ de Diazinon ou de carbaril, e outros três receberam 50 $\mu\text{g/L}$ dos mesmos compostos. Os três tanques restantes correspondem ao grupo controle; estes receberam 37,6 μL de álcool, concentração esta correspondente à necessária para diluição dos pesticidas aplicados (Figura 7). Os animais permaneceram confinados a estes tanques por dois e sete dias. Após este período de exposição, os espécimes foram mortos e seus hepatopâncreas retirados. Um *pool* contendo tecido hepatopancreático de dois animais por amostra foi obtido, sendo posteriormente homogeneizado, e congelado a -80°C , para posterior análise espectrofotométrica.

3.5. Análise espectrofotométrica dos biomarcadores após exposição aos pesticidas

Para a análise de AChE e CbE foram obtidas amostras do hepatopâncreas, homogeneizadas e diluídas 1:4 m/v, em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, centrifugados por 30 minutos a 9168 x g a 4 °C. A fração sobrenadante foi então coletada e congelada à -80 °C.

A atividade da AChE e da CbE no hepatopâncreas foi medida e caracterizada seguindo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), conforme detalhado no item 3.4.

3.6. Concentração da amostra para inibições *in vitro*

Para o desenvolvimento de experimentos bioquímicos através de espectrofotometria, as amostras foram submetidas a testes de concentração a fim de verificar qual o melhor volume de amostra a ser utilizado, levando-se em conta tanto a linearidade de absorbância apresentada pelo aparelho quanto à cinética de inibição de ambas as enzimas propostas.

Para a análise espectrofotométrica das esterases foi aplicado 10mM de iodeto de acetiltiocolina, 50mM de DTNB e tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0), variando seu volume de acordo com a quantidade de amostra aplicada. Foi utilizado um volume de 20 a 80µL de amostra para AChE. Esta apresentou uma absorbância ideal para o procedimento em 60µL da amostra para ambas as espécies. No que diz respeito à carboxilesterase, o mesmo processo foi realizado, porém variando a concentração de 5 a 20µL, aplicados à mistura de 4,5mM de feniltioacetato e 50mM de DTNB, juntamente com o tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0), variando de acordo com a quantidade de amostra aplicada. Esta apresentou a melhor absorbância a 5µL de amostra, para ambas as espécies.

3.7. Análise dos dados

Os dados obtidos permitiram a comparação das frequências das bandas esterásicas entre fêmeas e machos das espécies analisadas e, também para as comparações interespecíficas. Para tanto, foi utilizado o teste de Qui-quadrado (X^2), com nível de significância de $P < 0,05$.

Para a realização dos cálculos de X^2 foram consideradas todas as bandas analisadas. Nas comparações interespecíficas foram utilizadas as médias das frequências das respectivas bandas esterásicas no hepatopâncreas.

Para análise estatística dos experimentos de exposição *in vivo*, entre o grupo controle e as concentrações utilizadas, nos diferentes tempos de exposição testados foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk's W e Cochran, para avaliar a distribuição dos dados ao longo da curva de normalidade e variância, respectivamente. Resultados com $p > 0,05$, em ambos os testes realizados, foram considerados de distribuição normal e variância homogênea, respectivamente, sendo assim considerados dados paramétricos. Para identificar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos controle e expostos, foi utilizado o teste estatístico ANOVA One-Way para dados paramétricos, complementado por Tukey como teste posterior para indicar quais grupos apresentaram diferença, e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Os testes que apresentaram valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padrão de esterases obtido por eletroforese

As técnicas de separação de proteínas, amplamente utilizadas até hoje, têm permitido descobrir numerosos polimorfismos protéicos em uma grande variedade de organismos. Diferentes formas moleculares de uma enzima (isoenzimas) têm sido descritas como específicas de um tecido, órgão, de uma fase do desenvolvimento ou de uma espécie (BECKMAN e JOHNSON, 1964; FUTUYMA, 1992).

Entre as enzimas altamente polimórficas incluem-se as esterases, cujas variações têm sido estudadas em diferentes organismos, desde bactérias até o homem (FRASCO et al., 2006; GUNNING, 2006).

No presente trabalho, esse sistema enzimático foi analisado em duas espécies de camarões palemonídeos (*M. amazonicum* e *M. jelskii*), objetivando contribuir para o conhecimento da biologia destes organismos, ainda desconhecida quanto a este aspecto.

Com relação ao padrão obtido no hepatopâncreas, foram visualizadas 12 bandas esterásicas nas duas espécies (Figura 8). A partir da extremidade mais anódica do gel estas bandas foram denominadas EST1 a EST12, e suas frequências constam da Tabela 1.

As bandas que apresentaram maior frequência foram a EST2, EST3, EST6, EST7 e EST9, nas duas espécies, com variação de 80,00% a 99,50%. As bandas EST1, EST4, EST5 e EST8 apresentaram frequências um pouco menores, variando de 33,33% a 53,33%. Já as bandas EST10 e EST11 apresentaram as frequências mais baixas, com variação de 6,66% a 26,66%.

A banda EST12 foi encontrada em 100,00% dos indivíduos, para as duas espécies. Também com alta frequência, a banda EST6 apresentou uma variação de 99,00 a 100,00%.

Não foram observadas diferenças qualitativas com relação à presença de bandas interespecíficas, e nem quanto ao sexo. Essas diferenças existem apenas nas frequências das mesmas. Provavelmente este achado esteja relacionado à importância fisiológica das esterases e do hepatopâncreas nos crustáceos (JOHNSTON et al., 1998; SOUSA; PETRIELLA, 2000), à alta proximidade filogenética entre as duas espécies (GUERRA et al., 2010), e o fato de tratarem-se de enzimas altamente conservadas evolutivamente (FRASCO et al., 2006; GUNNING, 2006).

Quanto à afinidade pelos substratos α e β naftil acetatos, as bandas encontradas nas duas espécies, em machos e fêmeas, coraram-se preferencialmente pelo α naftil acetato, tratando-se, portanto, de bandas alfa esterases, as quais coraram-se em preto. A exceção foi a banda EST 9, a qual corou-se pelo β naftil acetato, em tom de magenta, sendo, portanto, denominada banda beta esterase.

Com relação aos experimentos de variação de pH, é sabido que variações do mesmo no tampão de pré-incubação e coloração podem interferir qualitativa e quantitativamente na expressão das bandas esterásicas, provavelmente devido à hidrólise não-enzimática dos substratos (BECKMAN e JOHNSON, 1964; BITONDI e MESTRINER, 1983; CASTIGLIONI-RUIZ et al., 1997). Conforme o esperado, a partir de nossa experiência anterior em outros organismos, corroboram dados da literatura (OAKESHOTT et al., 1993, CASTIGLIONI-RUIZ et al., 1997; LAPENTA et al., 1998; NASCIMENTO; BICUDO, 2006), as enzimas esterásicas das espécies de *Macrobrachium* coraram-se preferencialmente e de forma mais intensa em pH 6,2.

Para complementar a análise dos padrões esterásicos do órgão analisado, em cada espécie, também foram realizados experimentos utilizando-se inibidores. De acordo com Oakeshott et al., (1993) e Nascimento e Bicudo (2002), a utilização destas substâncias permite a classificação das esterases em: carboxilesterases (inibidas pelo inseticida Malathion); colinesterases (inibidas por alguns organofosforados e sulfato de eserina); arilesterases (inibidas por reagentes sulfidrílicos como por exemplo o pOHMB) e as acetilesterases (não são afetadas por nenhum destes inibidores).

A classificação das esterases perante sua sensibilidade aos inibidores citados acima é de grande importância, pois permitiu inferência dos prováveis papéis fisiológicos das mesmas. Os dados referentes ao padrão de inibição das esterases obtidos no hepatopâncreas constam na Tabela 2.

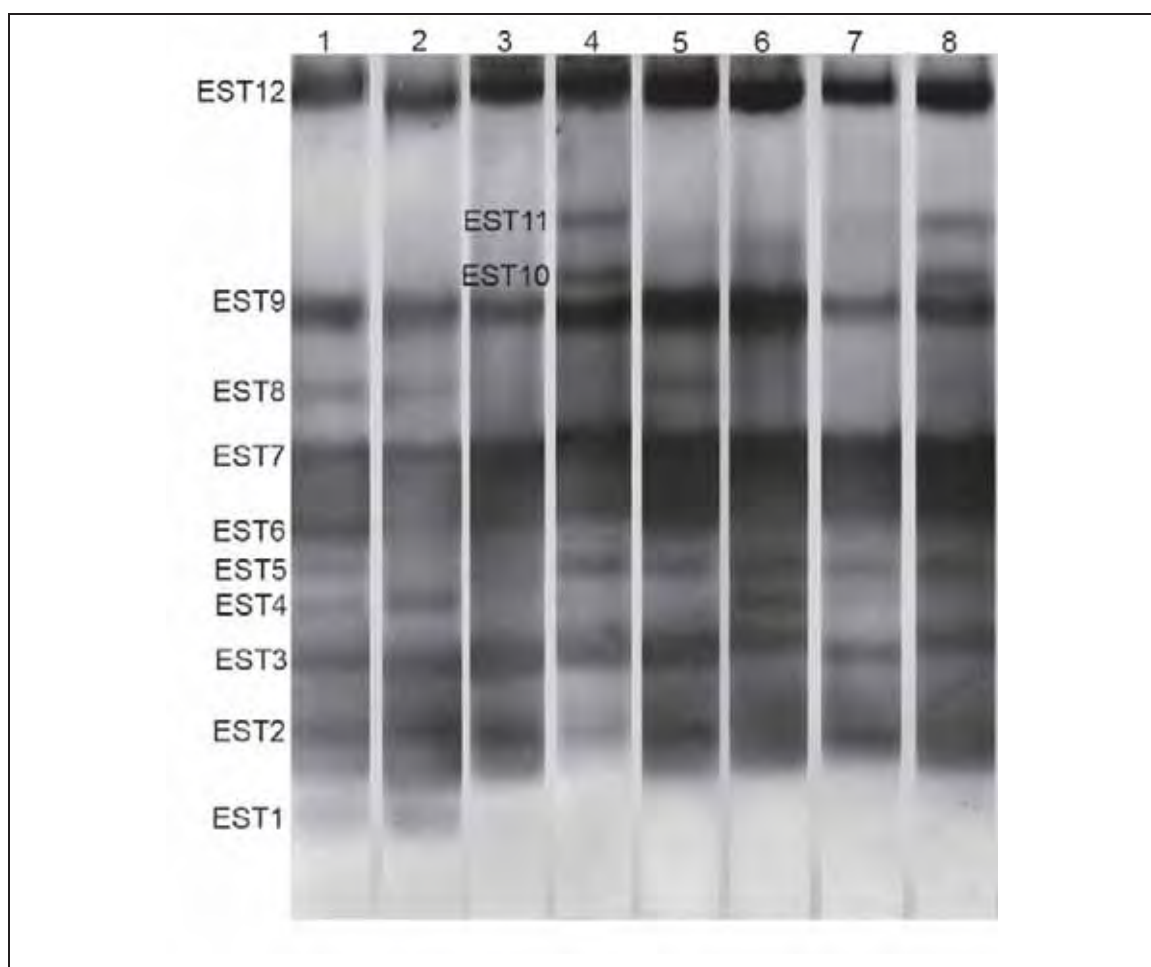


Figura 8. Gel de poliacrilamida a 10% mostrando as 12 bandas esterásicas encontradas no hepatopâncreas. Amostras de 1 a 4: *M. amazonicum* (1 e 2 fêmea, 3 e 4 macho). Amostras de 5 a 8: *M. jelskii* (5 e 6 fêmea, 7 e 8 macho).

Espécies	Sexo	Nº de indivíduos amostrados	Frequência de bandas (%)											
			EST 1	EST 2	EST 3	EST 4	EST 5	EST 6	EST 7	EST 8	EST 9	EST10	EST11	EST12
<i>M. jelskii</i>	F	705	53,33	90,00	100,00	40,00	53,33	100,00	90,00	50,00	93,33	20,00	13,33	100,00
	M	45	33,33	80,00	100,00	33,33	33,33	100,00	80,00	40,00	90,00	13,33	10,00	100,00
	T	750	43,33	85,00	100,00	36,66	43,33	100,00	85,00	45,00	91,66	16,66	11,66	100,00
<i>M. amazonicum</i>	F	620	50,00	90,00	93,33	50,00	50,00	99,00	93,33	50,00	90,00	13,33	10,00	100,00
	M	30	30,00	80,00	90,00	40,00	30,00	100,00	93,33	33,33	90,00	13,33	6,66	100,00
	T	650	40,00	85,00	91,66	45,00	40,00	99,50	93,33	41,66	90,00	13,33	8,33	100,00
TOTAL		1400												

Os dados relacionados ao uso de inibidores mostraram que as bandas EST1, EST2, EST4, EST5, EST6, EST8 e EST10 podem ser classificadas como acetilesterases, uma vez não foram inibidas por nenhum dos inibidores utilizados no presente estudo. A alta frequência de algumas destas bandas associadas a estes achados indicam papéis fisiológicos importantes para estas enzimas, provavelmente associados à degradação de feromônios, desintoxicação do organismo, em processos digestivos e, ainda, à produção e armazenamento de energia para a utilização em processos reprodutivos, uma vez que, conforme discutido anteriormente, são funções importantes deste órgão (WHEELER et al., 2009; FRANCESCHINI-VICENTINI et al., 2009).

A banda EST9, presente em alta frequência em ambos os sexos, foi levemente inibida pelo pOHMB, indicando tratar-se de uma arilesterase. Dados da literatura relacionam as arilesterases a funções importantes, tais como a degradação de hormônios e substâncias tóxicas (entre elas inseticidas organofosforados), e proteção contra estresse oxidativo causado por vários fatores (OAKESHOTT et al., 1993). Isto corrobora nosso resultado, uma vez que o hepatopâncreas também apresenta a função de metabolização de compostos endógenos (hormônios, por exemplo) e oriundos do ambiente (metabolismo de agroquímicos; WHEELLOCK et al., 2005).

O papel das arilesterases na degradação de inseticidas organofosforados está relacionado com alguns compostos específicos, tais como o paraoxon, o malaoxon e o clorpirifos-oxon (MACKNESS, 1989).

A paraoxonase é uma arilesterase, assim denominada por possuir alta afinidade pelo paraoxon. Com alta atividade no tecido hepático, já foi identificada em diversas espécies animais (MACKNESS, 1989). Contudo, em crustáceos estas enzimas nunca foram antes analisadas. Uma vez que, no presente trabalho, a EST9 apresentou alta frequência nas duas espécies analisadas (variando de 80,00% a 93,33%), e foi classificada como arilestarase, estudos posteriores que associem a presença e o grau de atividade desta enzima podem ser importantes na identificação de marcadores biológicos preditivos a cerca da qualidade da água ambiental, principalmente com relação à sua contaminação com estes tipos de inseticidas, amplamente utilizados pelo homem.

As bandas EST3 e EST7, presentes em altas frequências em ambos os sexos, foram moderadamente inibidas pelo malathion, indicando serem carboxilesterases. Estas enzimas estão envolvidas com a desintoxicação do organismo e, em várias espécies,

Tabela 2. Padrão de inibição e classificação das bandas esterásicas no hepatopâncreas nas espécies de *Macrobrachium* analisadas (-: ausência de inibição; +, ++, +++, +++++: graus de inibição em ordem crescente; Mth: malathion; Eser: sulfato de eserina; pOHMB: para-hidroximercuribenzoato; ND: banda não detectada).

BANDAS	ESPÉCIES						classificação
	<i>M. jelskii</i>			<i>M. amazonicum</i>			
	Mth	Eser	pOHMB	Mth	Eser	pOHMB	
EST1	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST2	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST3	+++	—	—	+++	—	—	carboxilesterase
EST4	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST5	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST6	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST7	++++	—	—	++++	—	—	carboxilesterase
EST8	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST9	—	—	++	—	—	++	arilesterase
EST10	—	—	—	—	—	—	acetilesterase
EST11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EST12	++	++	—	++	++	—	colinesterase

estão relacionadas com a degradação do hormônio juvenil, o qual controla a metamorfose, a oogênese, a vitelogênese e a produção de feromônios (WHITTAKER, 1984; OAKESHOTT et al., 1993; CASTIGLIONI-RUIZ et al., 1997; LIMA-CATELANI et al., 2004; GUNNING, 2006). Todos estes importantes papéis fisiológicos das carboxilesterases podem fazer parte das funções desenvolvidas pelo hepatopâncreas, corroborando nossos resultados.

A banda EST12 foi inibida levemente pelo malathion e pelo sulfato de eserina, sendo classificada como colinesterase. A alta frequência desta banda (presente em 100,00% dos indivíduos analisados) indica um papel fisiológico importante, provavelmente associado à atividade de condução neural e degradação de neurotransmissores, conforme discutido anteriormente.

A banda EST11 não pode ser classificada uma vez que não foi visualizada nestes experimentos, devido à sua baixa frequência.

Diferentes organismos possuem este sistema enzimático amplamente estudado geneticamente. Conforme descrito anteriormente, as esterases constituem um sistema enzimático conservado evolutivamente, com enzimas que apresentam importantes papéis fisiológicos. Entretanto, como o presente trabalho é pioneiro para estas espécies, e este sistema enzimático é pouco conhecido em crustáceos, dados da literatura comparativos, mais próximos baseiam-se em estudos de diversos insetos (*Drosophila melanogaster*: HEALY et al., 1991; *D. virilis*, *D. americana* e *D. novamexicana*: MCREYNOLDS, 1967; *D. mulleri* e *D. arizonensis* : LAPENTA et al., 1998; *D. saltans*: NASCIMENTO e BICUDO, 2002; *Haematobia irritans*: CASTIGLIONI-RUIZ et al., 1997).

Estudos de longa data, em *Drosophila melanogaster* identificaram 22 esterases, através da combinação de eletroforese em gel de poliacrilamida e focalização isoelétrica (HEALY et al., 1991). Em três espécies de *Drosophila* do grupo virilis (*D. virilis*, *D. americana* e *D. novamexicana*), McReynolds (1967) detectou 12 bandas esterásicas em oito populações naturais e duas linhagens mutantes mantidas em laboratório. Lapenta et al, (1998) detectou 17 bandas esterásicas em fêmeas e 20 em machos de *D. mulleri* e 13 em fêmeas e 17 em machos de *D. arizonensis*.

Nascimento e Bicudo, (2002), analisaram o padrão de esterases em 16 linhagens de quatro espécies de *Drosophila* pertencentes ao subgrupo *saltans*. A partir da alta variabilidade genética encontrada (34 bandas esterásicas), o padrão de mobilidade eletroforética e a utilização de inibidores (que permitiu a classificação das mesmas em

colinesterases, carboxilesterases e acetilesterases), foram inferidos 9 *loci* genéticos e traçada a provável relação filogenética entre essas espécies. Os dados encontrados corroboraram outros achados anteriores e auxiliaram no esclarecimento de dados conflitantes, baseados em polimorfismos cromossômicos e moleculares.

Em *Haematobia irritans*, Castiglioni-Ruiz et al. (1997) estudaram o padrão de esterases em quatro populações naturais deste importante parasita bovino, hematófago obrigatório na fase adulta, causador de sérios prejuízos à pecuária mundial. Nesta mosca, foram detectadas apenas oito bandas esterásicas. Segundo os autores, o número reduzido de variantes esterásicas estaria relacionado ao habitat e alimentação restritos desse organismo e, também, devido à ausência de barreiras que impeçam o fluxo gênico, uma vez que os rebanhos (hospedeiros) são numerosos e móveis.

Particularmente, o baixo grau de polimorfismo esterásico evidenciado no presente trabalho, entre as duas espécies analisadas, requer novos estudos capazes de aprofundar o conhecimento acerca dos aspectos bioquímicos, genéticos e evolutivos que controlam a expressão dos genes pertencentes à família das esterases nestas espécies.

4.2. Testes de inibição *in vitro*

Estudos de inibição *in vitro* foram realizados com o intuito de observar o efeito dos diferentes pesticidas diretamente sobre a enzima. Extratos protéicos obtidos a partir do hepatopâncreas dos camarões foram expostos a concentrações crescentes de cada xenobiótico (diazinon, clorpirifos e carbaril). Posteriormente, a cinética de inibição foi analisada em espectrofotômetro. Os resultados destes testes estão ilustrados nas Figuras 9 e 10 e serão descritos a seguir.

4.3. Padrões de inibição *in vitro* observados em *M. amazonicum*

4.3.1. Exposição ao Diazinon

A exposição ao Diazinon, realizada nas fêmeas de *M. amazonicum*, apresentou uma leve inibição de AChE, em relação ao controle, na concentração de 0,001mM do pesticida, mantendo 94% de sua atividade. Conforme esta concentração aumentou, a atividade desta enzima declinou, atingindo 33,41% em 10mM de concentração (Figura 9). Conforme observado na figura, não houve inibição total da atividade desta enzima.

Com relação aos machos, a mesma situação foi verificada, mas o processo de inibição da AChE ocorreu a partir da concentração de 0,01mM. As concentrações seguintes apresentam uma taxa de inibição crescente, sendo a menor atividade esterásica registrada à 10mM (25% em relação ao controle), como demonstrado na Figura 9.

É conhecido que as AChEs são sensíveis à ação de compostos OPs, como o Diazinon (FUKUTO, 1990; YEHIA, 2007). Contudo, no presente trabalho, não foi possível observar a inibição total da atividade da AChE nas espécies analisadas, uma vez que houve manutenção de atividade esterásica na maior concentração testada (10mM).

Solé et al. (2006), estudando a atividade das AChEs no crustáceo *Nephrops norvegicus*, também observaram uma maior atividade da enzima em fêmeas do que em machos, frente à exposição *in vitro* ao diazinon, nas mesmas concentrações que as testadas neste trabalhos. Segundo Solé e colaboradores, este fato ocorre devido a uma maior produção dessas enzimas nas fêmeas do que nos machos, o que poderia explicar o observado no presente estudo.

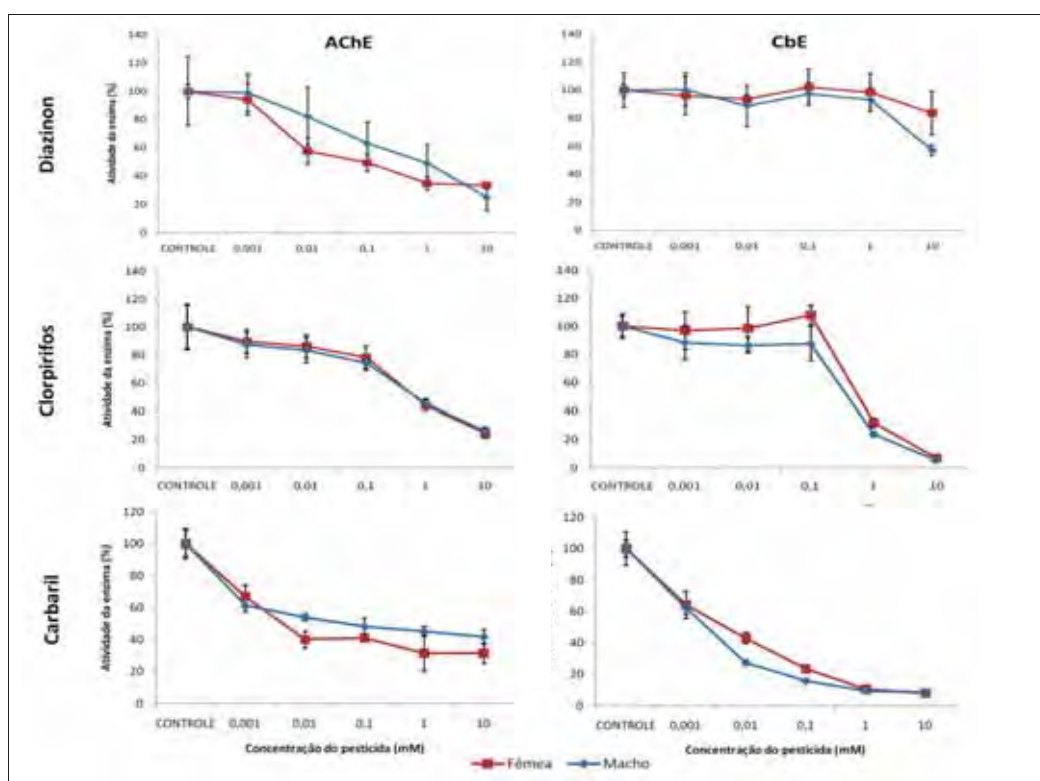


Figura 9. Cinética de inibição de AChE e CbE em fêmeas e machos de *M. amazonicum* expostos ao diazinon, clorpirifos e carbaril.

No que diz respeito à CbE, não se observa perda acentuada na atividade destas enzimas em fêmeas tratadas quando se compara com o controle, a qual manteve-se constante ao longo do gradiente de concentrações. Uma perda de atividade de aproximadamente 17% foi observada apenas na maior concentração (10mM) (Figura 9).

Quanto aos machos, estes apresentaram maior sensibilidade a este pesticida. Contudo, esta inibição também foi baixa e limitou-se à concentração mais elevada, mantendo 60% da atividade enzimática (Figura 9).

Estes resultados corroboram os dados obtidos por Solé et al. (2006), no crustáceo *N. norvegicus*, onde não foi observada inibição significativa nas CbEs expostas ao diazinon. Entretanto, em peixes (*Merluccius merluccius*, *Micromesistius poutassou* e *Phycis blennoides*), os mesmos autores verificaram inibição destas enzimas frente a este composto. Segundo Solé e colaboradores, a concentração das CbEs em crustáceos é maior do que em peixes, o que explicaria a falta de inibição das mesmas nos primeiros.

Além disso, como será melhor abordado posteriormente, o diazinon necessita ser convertido em diazoxon antes de exercer seu efeito tóxico no organismo (KEIZER et al., 1995), assim a resistência da CbE destes indivíduos pode ser atribuída também a ausência de mecanismos para a metabolização do composto em diazoxon *in vitro*.

4.3.2. Exposição ao Clorpirifos

O mesmo procedimento foi aplicado para analisar os efeitos do Clorpirifos em fêmeas de *M. amazonicum*. Os resultados obtidos mostraram uma leve inibição de aproximadamente 11% na atividade da AChE na menor concentração (0,001mM) em relação ao controle. Até a concentração de 1mM, nenhuma perda brusca de atividade foi observada, com manutenção de 80% da atividade. Após esta concentração, houve declínio na taxa de atividade enzimática, atingindo apenas 20% em relação ao controle (Figura 9).

Da mesma forma, nos machos o padrão de inibição também foi gradual, apresentando a maior taxa inibitória entre 0,1 e 1 mM, declinando de 70 para 45% da atividade enzimática. Na concentração de 10mM, foi possível observar 20% de atividade catalítica enzimática em relação ao controle (Figura 9).

Dados da literatura, utilizando outros organismos expostos às mesmas concentrações (VIOQUE-FERNANDEZ et al., 2007) e concentrações mais elevadas do Clorpirifos (até 1000mM) (CALLAGHAN et al., 2001; OWEN et al., 2002;

GALLOWAY et al., 2002; COOPER e BIDWELL, 2006; GAGNAIRE et al., 2008; TONGBAI e DAMRONGPHOL, 2011), obtiveram inibição total da atividade das AChEs, o que corrobora os dados obtidos acerca da sensibilidade desta enzima ao clorpirifos em *M. amazonicum*. Contudo, o grau de sensibilidade das AChEs frente aos OPs pode variar de acordo com vários fatores, tais como o tipo de composto, a espécie em questão, entre outros.

É conhecido que os OPs atuam sobre as AChEs e diferentes mecanismos genéticos envolvendo a síntese destas enzimas podem ser responsáveis pela aquisição de resistência a estes compostos (SHANMUGAVELU et al., 2000; WEILL; LUTFALLA; MOGENSEN, 2004; WHEELLOCK et al., 2008).

Uma vez que a espécie em questão encontra-se inserida em um ambiente que tem sofrido severas alterações antrópicas, entre elas a contaminação da água por tais compostos, essa sensibilidade pode ser um fator preocupante à sobrevivência da mesma.

Outro fato que deve ser destacado diz respeito ao órgão utilizado. Ghedira et al. (2009), também observaram inibição significativa, mas não total, da atividade de AChE no hepatopâncreas do caranguejo *Carcinus maenas* quando exposto ao chlorpyrifos-ethyl, um organofosforado de ação semelhante ao clorpirifos, o que estaria relacionado à particularidades fisiológicas deste órgão, uma vez que a atividade esterásica medida no hepatopâncreas foi maior do que nos demais órgãos analisados (as brânquias, por exemplo). Nos crustáceos, o hepatopâncreas apresenta importância fisiológica considerável e, inclusive, está relacionado à desintoxicação de compostos xenobióticos, conforme já mencionado (JOHNSTON et al., 1998; SOUSA; PETRIELLA, 2000). Assim sendo, a manutenção da atividade das AChEs nas amostras de *M. amazonicum* analisadas, mesmo que baixa, pode refletir prováveis adaptações fisiológicas ao ambiente no qual as mesmas estão inseridas. Em adição, podemos sugerir este órgão como um potencial bioindicador da contaminação por clorpirifos.

Por outro lado, o clorpirifos não causou inibição das CbEs em concentrações de 0,1mM. Contudo, após essa concentração, foi possível observar uma perda de 70% de sua atividade catalítica, chegando praticamente à inibição enzimática total na concentração de 10mM (Figura 9). Esse padrão de inibição foi praticamente o mesmo para os dois sexos.

Outra observação interessante é o fato das CbEs de *M. amazonicum* possuírem uma maior sensibilidade ao clorpirifos em relação ao diazinon, conforme observado comparando-se os gráficos da Figura 9, principalmente nas maiores concentrações

testadas (acima de 0,1mM), mas isso pode ser devido ao fato do diazinon necessitar ser convertido em diazoxon antes de exercer um efeito tóxico no organismo, como sugerem alguns autores (KEIZER et al., 1995; JAMEC et al., 2007; KRETSCHMANN et al., 2011).

Wheelock et al., (2005) sugerem a existência de um mecanismo protetor de ação das CbEs em relação à atividade das AChEs. Com relação ao papel das esterases na desintoxicação de OPs, as CbEs seriam as primeiras enzimas a serem inibidas e, em seguida, as AChEs. Portanto, as CbEs teriam uma maior afinidade a estes compostos. Contudo, no presente trabalho, este fato apresentou um comportamento inverso. Ao analisarmos os gráficos das figuras 6, podemos notar claramente que a inibição das AChEs ocorreu primariamente, já nas menores concentrações (a partir de 0,001mM) enquanto que as CbEs apresentaram um declínio de atividade catalítica enzimática somente após a concentração de 0,1mM. A explicação para este fato poderia ser baseada em duas hipóteses: a) a maior atividade de CbEs no hepatopâncreas, em relação às AChEs; b) as CbEs teriam uma maior afinidade pelos OPs do que as AChEs, atuando, assim, como um sistema protetor a estas enzimas, o que manteria a integridade do impulso nervoso.

4.3.3. Exposição ao Carbaril

Analizando a cinética de inibição apresentada pelo Carbaril em fêmeas, podemos observar um padrão bastante diferenciado dos expostos anteriormente, uma vez que trata-se de um composto carbamato, ou seja, de ação química diferente, pois estabelecem uma ligação química reversível com as CbEs e inibem AChEs por carbamilação.

Já nas menores concentrações foi possível observar uma inibição acentuada na atividade esterásica da AChE. Na concentração de 0,001mM houve perda de aproximadamente 34% da atividade desta enzima. Na concentração de 0,01mM houve novo declínio e atividade, chegando a 40% em relação ao controle. No intervalo de concentrações de 0,01 a 0,1mM houve estabilização na atividade desta enzima, que declina novamente na concentração de 1 mM (aproximadamente 30% da atividade foi mantida). No intervalo de concentrações de 1 até 10mM houve nova estabilização, mantendo constante o valor de aproximadamente 30% da atividade enzimática (Figura 9).

Nos machos a cinética de inibição para este composto foi semelhante ao das fêmeas para as AChEs. Contudo, houve um leve declínio de atividade entre 0,01 e 10mM, mantendo aproximadamente 40% da atividade total em relação ao controle (Figura 9).

A estrutura química dos carbamatos é um fator determinante para sua reatividade com AChE (HEATH, 1961 apud PRINTES; GALLAGHAN, 2004). A configuração molecular, assim como a composição química destes pesticidas influenciam características como eletrofilicidade e hidrofobicidade, as quais estão diretamente relacionadas à taxa de inibição destas enzimas, e facilitam a interação destes compostos às enzimas (HEATH, 1961).

Em estudos realizados em *D. magna*, Printes e Callaghan (2004) observaram uma leve inibição na AChE quando expostos a baixas concentrações (200pM) do carbamato propoxur. Entretanto, esta perda de atividade enzimática já foi suficiente para promover alterações comportamentais e perda de mobilidade.

Bhavan e Geraldine (2002; 2009) também observaram um declínio de atividade de AChEs no hepatopâncreas de camarões *M. malcolmsonii* expostos ao Carbaril associado à alterações no metabolismo basal destes crustáceos, ocasionando uma crise no estoque e produção de energia destes espécimes. Ainda segundo estes autores, as alterações metabólicas são acompanhadas de alterações patológicas na microestrutura deste órgão, tais como: ruptura da lâmina basal, agregação e infiltração de hemócitos nos seios intersticiais e formação de túbulos necróticos.

Desta forma, os danos causados por este pesticida não se limitam apenas a atividade enzimática, mas também a alterações metabólicas e morfológicas irreversíveis nos organismos.

Com relação à cinética de inibição do Carbaril nas fêmeas de *M. amazonicum*, a CbE sofre uma inibição constante ao longo do gradiente de concentrações, perdendo por volta de 36% de sua atividade já na menor concentração do pesticida. Este processo inibitório continua em todas as concentrações testadas, até se aproximar do ponto de saturação na maior concentração (10mM). A cinética de inibição pode ser observada detalhadamente na Figura 9.

Nos machos as CbE apresentaram uma sensibilidade semelhante ao das fêmeas, onde a menor concentração já foi o suficiente para inibir aproximadamente 40% de sua atividade enzimática. O padrão de inibição foi constante até atingir 15% de atividade,

quando comparado ao controle. As maiores concentrações apresentaram atividades próximas do ponto de saturação, como pode ser observado na Figura 9.

A sensibilidade das CbEs frente ao carbaril tem sido estudada em outros organismos. Um trabalho realizado no peixe *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris; FERRARI et al., 2007), mostrou que a atividade das CbEs no fígado é inibida por este pesticida em concentrações subletais. Por outro lado a total inibição das CbEs em tecido hepático a torna ineficiente quanto a proteção do organismo contra o carbaril, lembrando que uma de suas principais funções é a de desintoxicação e/ou proteção contra agressores químicos exógenos.

As CbEs também apresentaram severa inibição quando expostos ao carbaril em um outro trabalho realizado por Vioque-Fernández et al., (2007), com o crustáceo *Procambarus clarkii*. A cinética de inibição observada no presente estudo (Figura 9), mostrou-se bastante semelhante ao padrão obtido em *P. clarkii*, reforçando nossos resultados.

4.4. Padrões de inibição *in vitro* observados em *M. jelskii*

Extratos protéicos do hepatopâncreas de *M. jelskii*, foram submetidos às análises de inibição *in vitro*, semelhantes às apresentadas para *M. amazonicum*. Os resultados serão apresentados a seguir.

4.4.1. Exposição ao Diazinon

As fêmeas desta espécie, quando submetidas às análises com Diazinon não apresentaram grande perda na atividade enzimática das AChE. As menores concentrações deste pesticida não inibiram esta enzima, e mesmo a maior concentração deste composto (10mM) apresentou apenas uma ligeira inibição, mantendo mais de 70% da atividade em relação ao controle (Figura 10).

Os machos de *M. jelskii* apresentaram um padrão de inibição semelhante. A AChE não demonstrou grande inibição nas menores concentrações, ao passo que na concentração de 1mM, a atividade desta enzima declinou aproximadamente 35% em relação ao controle. Já na maior concentração foi mantido aproximadamente 35% de sua atividade em relação ao controle (Figura 10).

Conforme já foi relatado em *M. amazonicum*, os machos parecem possuir uma maior sensibilidade a este pesticida. O efeito desta inibição em machos poderia ser explicado pela menor atividade da enzima neste órgão.

Se compararmos a cinética de inibição obtida nesta espécie, para este composto, àquela obtida em *M. amazonicum*, podemos notar um maior padrão de inibição da atividade esterásica em *M. amazonicum* (Figura 9) em relação à *M. jelskii* (Figura 10), um fato interessante, uma vez que tratam-se de espécies muito próximas filogeneticamente (GUERRA et al., 2010), sintópicas, e que foram coletadas na mesma área geográfica, supostamente submetidas às mesmas condições ambientais e pressões seletivas. Ainda, em estudos preliminares, as enzimas esterásicas de ambas as espécies apresentaram padrões semelhantes, tanto quantitativa quanto qualitativamente (LIMA et al., submetido à publicação).

De acordo com Keizer et al. (1995), o diazinon por si só não é capaz de inibir a AChE. O efeito tóxico baseado na inibição desta enzima requer uma oxidação preliminar deste pesticida em diazoxon, realizada por outros sistemas enzimáticos (como por exemplo, o citocromo P450). Assim, é razoável supor que a atividade de outros sistemas enzimáticos, os quais podem ser diferentes entre as espécies em questão, devem estar interferindo na cinética de inibição esterásica frente ao diazinon.

As fêmeas desta espécie, quando submetidas ao Diazinon, também não apresentaram grande perda na atividade enzimática das CbEs. As menores concentrações deste pesticida não inibiram esta enzima, e mesmo a maior concentração deste composto (10mM) apresentou apenas uma leve inibição, mantendo aproximadamente 80% da atividade em relação ao controle (Figura 10).

Os machos de *M. jelskii* apresentaram um padrão de inibição semelhante. As CbEs também não demonstraram grande inibição nas menores concentrações, ao passo que na concentração de 10mM, a atividade desta enzima declinou um pouco mais do que nas fêmeas (aproximadamente 70% em relação ao controle; Figura 10).

Conforme já discutido anteriormente para *M. amazonicum*, a baixa taxa de inibição das CbEs frente ao composto diazinon pode ser explicado por uma maior quantidade destas enzimas no hepatopâncreas destas espécies (SOLÉ et al., 2006), o que aumentaria a concentração necessária para a saturação da atividade enzimática. Além disso, a falta de metabolização do diazinon em diazoxon pelas enzimas monooxigenases do citocromo P450, também poderia influenciar na resistência destas enzimas.

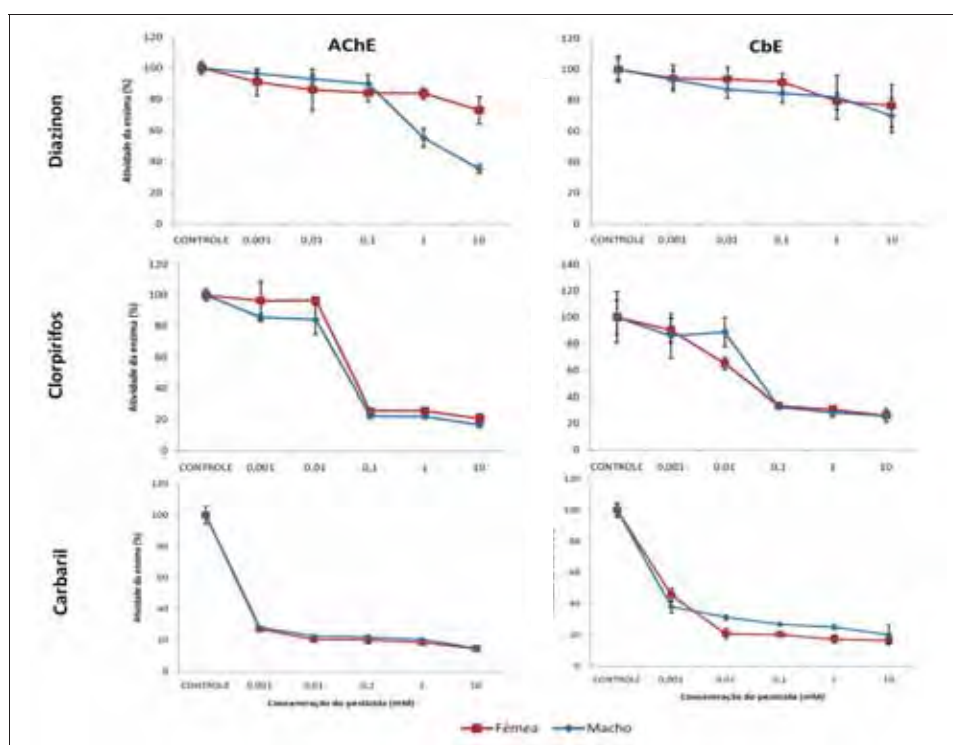


Figura 10. Cinética de inibição de AChE e CbE em fêmeas e machos de *M. jelskii* expostos ao diazinon, clorpirifos e carbaril.

4.4.2. Exposição ao Clorpirifos

Apesar de também se tratar de um organofosforado, o clorpirifos apresentou resultados distintos se comparado ao Diazinon. Nas duas menores concentrações (0,001 e 0,01mM) não há inibição de AChE, tanto em fêmeas quanto em machos (Figura 10). Porém, na próxima concentração (0,1mM) a atividade protéica diminuiu acentuadamente, para aproximadamente 25%, mantendo esse valor até a concentração final de 10mM.

A grande sensibilidade da AChE ao clorpirifos parece ser comum entre invertebrados. Ghedira et al. (2009) observaram resultados semelhantes em *Carcinus maenas*, expostos às mesmas concentrações testadas no presente trabalho. Outros estudos mostram resultados semelhantes em outros invertebrados, tais como: em insetos (CALLAGHAN et al., 2001), e moluscos (GALLOWAY et al., 2002; OWEN et al., 2002; COOPER e BIDWELL, 2006; GAGNAIRE et al., 2008).

A não inibição das AChEs por este composto, em baixas concentrações, pode ser explicada por uma provável defesa proporcionada pela CbE, como será explicado posteriormente.

Alterações na atividade da AChE causadas por clorpirifos foi observado em vários órgãos do molusco *Lamellidens marginalis* conforme constatado por Amanullah et al. (2010), entre os órgãos analisados o hepatopâncreas apresenta grande importância na resposta inibitória destas enzimas, além disso a AChE está envolvida na manutenção da integridade estrutural e funcional da membrana celular, desta forma pode-se dizer que o pesticida causa perturbações nas funções celulares normais, além da inibição desta enzima.

Tongbai e Damrongphol (2011), testaram as respostas *in vitro* da AChE ao clorpirifos e sua forma metabolizada (clorpirifos-oxon) em *Macrobrachium lanchesteri*, onde estas enzimas apresentaram sensibilidade a ambos, porém concentrações maiores do clorpirifos foram necessárias para a inibição enzimática em relação ao clorpirifos-oxon. Desta forma, podemos dizer que a toxicidade deste pesticida é potencializada a partir da sua biotransformação metabólica.

Devido à alta sensibilidade das AChEs do hepatopâncreas de *M. jelskii* podemos sugerir a utilização das mesmas como biomarcadores preditivos de altas concentrações de clorpirifos na água ambiental.

No que diz respeito à CbE de fêmeas, o padrão de inibição apresentou-se mais gradual, declinando constantemente a partir da menor concentração. A análise da cinética de inibição para esta enzima mostrou uma diminuição de atividade entre as concentrações de 0,001 a 0,1mM, inibindo aproximadamente 70% da atividade catalítica enzimática. Já nas maiores concentrações esta inibição foi menos acentuada, mantendo-se a aproximadamente 25% da atividade (Figura 10).

O padrão inibitório foi bastante parecido nos machos. Uma pequena inibição foi observada nas menores concentrações. A exposição a 0,1mM inibiu significativamente estas enzimas, atingindo aproximadamente 30% de sua atividade quando comparadas ao controle. Essa taxa de atividade enzimática foi mantida praticamente constante, mesmo nas maiores concentrações (Figura 10).

As concentrações onde não ocorreu inibição das AChEs, se sobrepõem às concentrações onde é possível notar taxas mais altas de atividade das CbEs (Figura 10). De acordo com dados da literatura, isto deve ocorrer devido ao sistema de interação de defesa CbE-AChE, conforme proposto por Tongbai e Damrongphol, (2011): devido à maior afinidade da CbE por este pesticida, sua velocidade de interação e, conseqüentemente, metabolização é maior, protegendo, de certa forma, a atividade da AChE, preservando-a na fenda sináptica.

Por outro lado, quando este sistema de defesa torna-se insuficiente observa-se um severo declínio na atividade da AChE. Estes resultados reafirmam a hipótese de um sistema de defesa intrinsecamente relacionado entre estas duas enzimas. Além disso, ambas as enzimas podem ser nomeadas como bons biomarcadores de contaminação por clorpirifos, uma vez que o diazinon não exibe ação sobre estas, mesmo se tratando de um composto organofosforado. Dessa maneira, o hepatopâncreas destes crustáceos possui grande potencial em estudos de contaminação por clorpirifos.

O trabalho de Tongbai e Damrongphol (2011) também reforça a idéia de um padrão comum de inibição entre os animais aquáticos, uma vez que resultados semelhantes foram observados em *M. jelskii*, no caranguejo *Carcinus maenas* (GHEDIRA et al. 2009), no salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (WHEELLOCK et al., 2005), em *Daphnia magna* (BARATA et al., 2004), e no anfípode *Hyalella azteca* (STEEVENS e BENSON, 1999).

4.4.3. Exposição ao Carbaril

O Carbaril exibiu uma inibição bastante singular para este grupo, tanto em fêmeas quanto em machos (Figura 10). Na menor concentração do pesticida houve uma perda de mais de 70% da atividade de AChE. Nas demais concentrações a inibição foi mais leve e as amostras expostas à maior concentração (10mM) mantiveram a atividade abaixo de 20%, quando comparados ao controle.

Observações feitas por Vioque-Fernández et al. (2009), mostraram que o carbaril não apresentou efeito inibitório na atividade da AChE no hepatopâncreas de *P. clarkii*, nas mesmas concentrações que as utilizadas no presente estudo, o que impossibilitou a utilização das mesmas como biomarcadoras para este praguicida na espécie estudada. Entretanto, no presente estudo, o contrário pode ser inferido para *M. jelskii*, uma vez que, em pequenas concentrações, esse composto foi capaz de diminuir consideravelmente a atividade desta enzima no hepatopâncreas destes crustáceos.

Trabalhos na literatura também relataram o efeito inibitório do carbaril em AChE em pequenas concentrações. Frasco et al. (2006) observou a inibição *in vitro* destas enzimas em *Palaemon serratus*, espécie da mesma família que as utilizadas no presente estudo, utilizando concentrações de 0,001 à 0,005mM. Em 1991, Bocquené e Galgani também observaram inibição de AChE por carbaril, nesta mesma espécie, porém em testes de exposição *in vivo*.

De acordo com Bhavan e Geraldine (2009), não apenas esterases são afetadas pelo carbaril em *Macrobrachium malcolmsonii*, proteínas solúveis também apresentaram níveis significativamente baixos no hepatopâncreas destes animais. Segundo os autores, o carbaril pode agir nos tecidos e alterar as concentrações iônicas intra e extracelulares e as taxas de desnaturação e síntese protéica.

Em outro trabalho realizado por Bhavan e Geraldine (2002), foi observado que além da inibição da AChE, a ação do carbaril se estendeu a outras macromoléculas biológicas, desencadeando processos de glicogenólise, proteólise e declínio nos níveis lipídicos, o que alterou severamente o metabolismo basal dos animais, gerando um colapso nos níveis energéticos do hepatopâncreas.

Como os danos causados por este pesticida não se limitam à atividade enzimática, uma identificação rápida e eficiente de contaminação por este pesticida é de grande importância para prever danos ambientais. Como foi sugerido no presente estudo, a utilização de animais aquáticos como bioindicadores no monitoramento ambiental pode ser bastante útil (TRAPÉ, 2003).

As CbEs apresentaram um padrão de inibição bastante semelhante às AChEs, perdendo aproximadamente 80% de sua atividade nas menores concentrações, comparada com o controle, para ambos os sexos. Nas concentrações maiores a taxa de atividade enzimática manteve-se constante (aproximadamente 20% em relação ao controle; Figura 10). Contudo, nos machos, na concentração de 0,01mM a taxa de inibição esterásica foi ligeiramente mais baixa (aproximadamente 30%).

Pelo exposto, a CbE não representa um sistema de defesa contra o carbaril, pelo contrário, sua sensibilidade pode ser equiparada a da AChE, pois mesmo concentrações pequenas causaram grande declínio de atividade enzimática. Conforme já foi descrito anteriormente, as CbEs interagem com OPs mais rapidamente do que as AChEs, pois a interação entre estes compostos e as CbEs ocorre fora do centro fosfórico do composto. Como o sistema de inibição do carbaril não ocorre por fosforilação e sim por carbamilação, o sistema de defesa não se efetiva tornando, assim, ambas as enzimas sensíveis ao pesticida (FUKUTO, 1990).

Esta cinética de inibição já é bem descrita na literatura. Vários trabalhos mostram o padrão inibitório do carbaril nos mais diversos grupos animais. Vioque-Fernández et al. (2009) comparando o efeito deste pesticida em caranguejos sob concentrações semelhantes às testadas neste trabalho, se observam que a CbE se apresenta pouco efetiva como biomarcador para o carbaril. Por outro lado, no presente estudo, esta enzima apresentou a mesma efetividade da AChE como biomarcadora.

Ferrari et al. (2006) também relatou inibição de CbE em *O. mykiss* (truta arco-íris) expostas ao carbaril, demonstrando que a mesma é dependente da concentração, assim como no presente estudo. Padrão semelhante foi observado por Barata, Solayan e Porte (2007), porém com o carbamato carbofuran, em *D. magna*.

Estes resultados também estão de acordo com Wheelock et al. (2008), que confirmaram a capacidade dos pesticidas carbamatos em inibirem tanto AChEs quanto CbEs. Esta afirmação pode ser aplicada para as duas espécies analisadas no presente estudo, pois estas exibiram inibição para ambas as enzimas. Em adição, como a sensibilidade de *M. jelskii* foi maior quando comparada a *M. amazonicum*, esta espécie pode ser considerada mais eficiente como um bioindicador de contaminação por carbaril.

4.5. Testes de exposição *in vivo*

Estudos de exposição *in vivo* foram realizados com o intuito de verificar a resposta metabólica apresentada pelas enzimas esterásicas sob efeito de diferentes pesticidas. Extratos protéicos obtidos a partir da homogeneização dos hepatopâncreas de *M. amazonicum* e dos camarões inteiros de *M. jelskii*, foram expostos às duas concentrações de cada praguicida, diazinon e carbaril (nas concentrações de 10 e 50µg/L), em dois períodos de exposição (dois e sete dias). Posteriormente, a cinética de inibição foi analisada em espectrofotômetro. Os resultados destes testes estão ilustrados nas Figuras 11 e 12 e serão descritos a seguir.

4.6. Padrões de inibição *in vivo* observados em *M. amazonicum*

4.6.1. Exposição ao diazinon

As fêmeas de *M. amazonicum* expostas por dois dias ao diazinon apresentaram inibição da atividade da AChE, estatisticamente significativa, apenas nas comparações entre o grupo controle e a maior concentração do pesticida (50µg/L). As análises envolvendo o grupo controle e a menor concentração do pesticida (10µg/L), e entre ambas as concentrações testadas, não apresentaram diferenças. Já no período de exposição por sete dias, as fêmeas apresentaram inibição estatisticamente significativa apenas em relação ao controle, para ambas as concentrações (Figura 11).

Na Figura 11 pode-se observar que a exposição destes indivíduos, por um curto período de tempo (dois dias), à baixa concentração do pesticida, não foi suficiente para causar uma inibição considerável de AChE. Entretanto, no mesmo período de exposição, utilizando-se uma concentração mais elevada do mesmo composto, foi observada uma inibição mais severa da atividade da enzima.

Ainda, a exposição a períodos de tempo maiores, causaram um padrão de inibição da AChE semelhante, em ambas as concentrações testadas. Assim, a toxicidade do diazinon, para estes animais, apresentou-se dependente da concentração e do tempo de exposição.

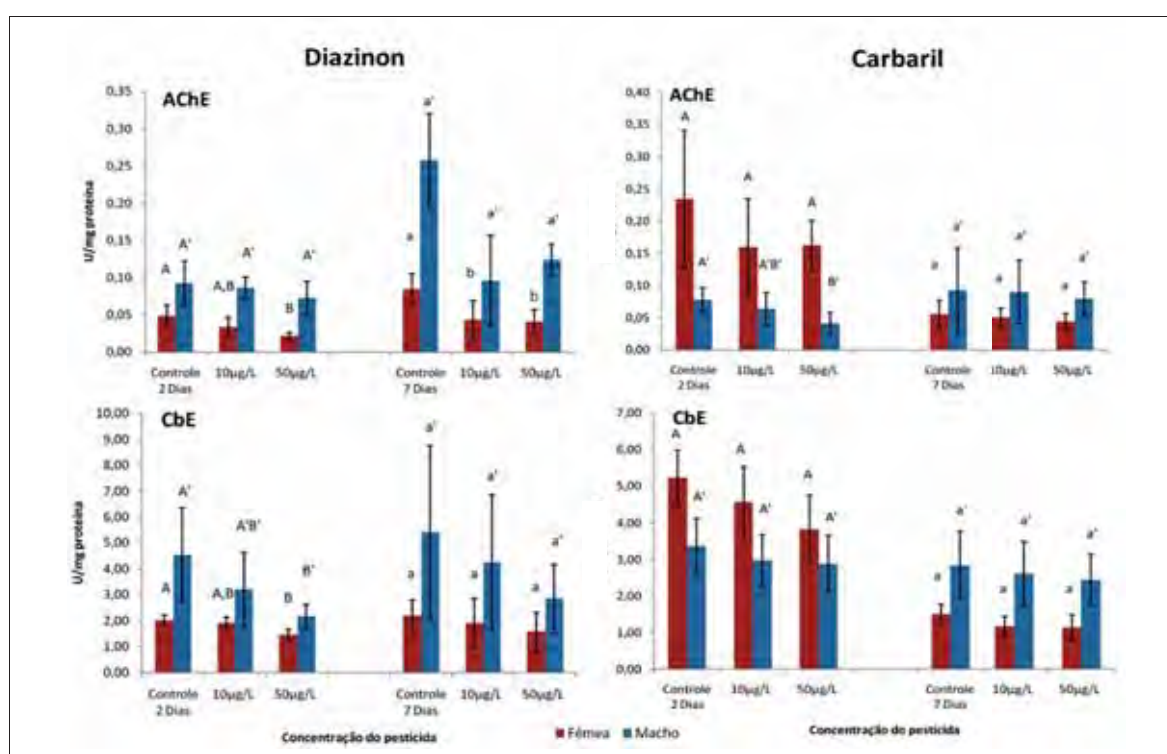


Figura 11. Cinética de inibição *in vivo* de AChE e CbE em fêmeas e machos de *M. amazonicum* expostos ao diazinon e carbaril. (A= fêmeas, 2 dias de exposição; A'= machos, 2 dias de exposição; a = fêmeas, 7 dias de exposição; a' = machos 7 dias de exposição).

Estes resultados estão de acordo com o proposto por Yehia et al. (2007), em estudos realizados em coelhos. Esses autores relataram a existência de uma variação no grau de atividade da AChE em relação à concentração do pesticida utilizado e ao tempo de exposição. Outros trabalhos também verificaram resultados semelhantes em estudos *in vivo*, utilizando o diazinon em diferentes organismos (Keizer et al., 1995, em peixes; Galindo-Reyes et al., 2000, em crustáceos; Weelock et al. 2005, em insetos).

De fato, dados da literatura reforçam a hipótese que a concentração do pesticida tem grande importância na toxicidade exercida sob o organismo. Contudo, a correlação tempo de exposição-concentração ainda é pouco descrita na literatura, o que indica a necessidade de mais estudos em diferentes espécies para uma melhor visão dos reais efeitos da contaminação ambiental por este composto.

Já os machos desta mesma espécie, expostos ao diazinon, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em todas as comparações analisadas (Figura 11). Pode-se sugerir que a menor sensibilidade ao pesticida seja fisiologicamente restrita aos machos e esteja associada às prováveis diferenças fisiológicas e comportamentais existentes entre os sexos (GARCÍA-DÁVILA, et al., 2000; TADDEI, 2006).

Ainda, a menor sensibilidade da AChE nos machos também poderia estar relacionada à ação de outros processos metabólicos que ocorrem *in vivo*, uma vez que os testes de exposição *in vitro* (Figura 9) mostraram inibição da AChE frente ao diazinon, em machos de *M. amazonicum*. Contudo, não existem dados disponíveis na literatura correlacionando um sistema enzimático específico de um sexo que possa corroborar este achado.

No que se refere à CbE em fêmeas de *M. amazonicum*, uma inibição estatisticamente significativa foi observada apenas na concentração de 50µg/L do diazinon, em relação ao controle, em dois dias de exposição. Resultados semelhantes foram observados em machos desta mesma espécie (Figura 11).

Em um experimento com tilápias (*Oreochromis niloticus*) Trídico et al. (2010), observaram resultados semelhantes, onde exposições ao diazinon, no período de dois dias, causaram um declínio considerável na atividade da CbE, ao passo que na exposição por sete dias, esta inibição não foi observada.

É conhecido que os pesticidas OPs são inibidores da CbE e esta é capaz de metabolizar tais compostos a partir de uma ligação química reversível, permitindo que a mesma retorne ao seu estado ativo (WHEELLOCK et al., 2008; TRÍDICO et al. (2010).

Assim, no presente estudo, a ausência de inibição da CbE no período de exposição de sete dias, poderia ser explicado devido à sua reativação.

4.6.2. Exposição ao carbaril

Com relação à exposição ao carbaril, as fêmeas de *M. amazonicum* não apresentaram inibição estatisticamente significativa na atividade de ambas às enzimas testadas, nos dois períodos de exposição e para as duas concentrações utilizados no presente estudo.

Apesar de o carbaril ser classificado pela ANVISA como um pesticida de risco alto a moderado para organismos vivos, no presente trabalho, sua toxicidade foi baixa nos testes *in vivo*, não causando alterações significativas na atividade das enzimas analisadas, diferentemente dos testes *in vitro*, onde observou-se uma inibição mais efetiva destas enzimas. Esta diferença nos padrões de inibição pode ser explicada pela capacidade do carbaril em interagir com diferentes macromoléculas biológicas, em diferentes tecidos, causando um colapso metabólico nos organismos vivos (BHAVAN e GERALDINE, 2002; 2009).

Com relação aos machos, os mesmos apresentaram inibição de AChE, estatisticamente significativa em relação ao controle, apenas na concentração de 50µg/L, para dois dias de exposição. Este achado pode ser explicado pelo modo de interação dos carbamatos com a AChE: o pesticida inibe esta enzima a partir da carbamilação de um resíduo de serina e, como esta reação é instável, logo em seguida, ocorre a descarbamilação da enzima, reativando-a (SOGORB e VILANOVA, 2002).

Diferenças na atividade da AChE entre machos e fêmeas, de peixes, já foi relatado por Solé et al. (2006), o que subsidiaria a hipótese de que especialidades fisiológicas ligadas ao sexo ou à biologia reprodutiva podem ser responsáveis pelas diferenças na atividade e, consequentemente, na inibição enzimática. Além disso, os níveis na atividade desta enzima também podem variar de acordo com o tipo do tecido estudado (CHANG et al., 2006). Como no presente trabalho foi utilizado apenas o hepatopâncreas, são necessários estudos que testem os efeitos deste pesticida em diferentes tecidos para a confirmação desta hipótese.

Em adição, de modo semelhante às fêmeas, nos machos também não foi observada inibição da CbE nos testes efetuados para este composto. Conforme já explicado, o carbaril pode atuar em diferentes macromoléculas biológicas e tecidos *in vivo*, diminuindo sua ação inibitória sobre a atividade das esterases.

4.7. Padrões de inibição *in vivo* observados em *M. jelskii*

4.7.1. Exposição ao diazinon

As fêmeas de *M. jelskii* expostas ao diazinon, no período de dois dias, apresentaram uma inibição estatisticamente significativa na atividade de AChE, na concentração de 50µg/L, tanto em relação ao controle quanto à concentração de 10µg/L. Após sete dias de exposição não houve inibição significativa nas concentrações testadas (Figura 12), mesmo a atividade desta enzima ter sido menor em sete dias do que o valor aferido em dois dias de exposição.

A não inibição da AChE no período de exposição maior poderia ser explicado a partir da sua reativação após um período de exposição inicial. De fato, Johnson et al., (2000) verificaram que, no homem, a reativação da AChE inibida pelo diazinon ocorre após um período de cerca de 30 horas após sua exposição ao pesticida.

É importante salientar que em *M. amazonicum* houve inibição da AChE no período de sete dias, para este composto, em ambas as concentrações testadas, diferentemente do observado em *M. jelskii*. Contudo, esta diferença no padrão de inibição da AChE não pode ser atribuída, no presente estudo, à diferenças interespecíficas no padrão de atividade esterásica, uma vez que o extrato protéico obtido a partir da homogeneização de *M. jelskii* utilizou o animal inteiro. Sendo assim, é razoável supor que outros tecidos devem apresentar atividade de AChE.

Com relação aos machos, não houve inibição da AChE em nenhuma das comparações analisadas (Figura 12), o que pode ser devido à existência de adaptações fisiológicas ligadas ao sexo e aos processos reprodutivos (GARCÍA-DÁVILA, et al., 2000; SOLÉ et al., 2006; TADDEI, 2006).

No que diz respeito à CbE, nas fêmeas não houve inibição estatisticamente significativa nas duas concentrações testadas, em ambos os períodos de exposição. Já os machos apresentaram um padrão de inibição significativa entre a concentração de 50µg/L e o controle, tanto em dois quanto em sete dias de exposição (Figura 12), o que também pode ser atribuído ao sexo (GARCÍA-DÁVILA, et al., 2000; SOLÉ et al., 2006; TADDEI, 2006).

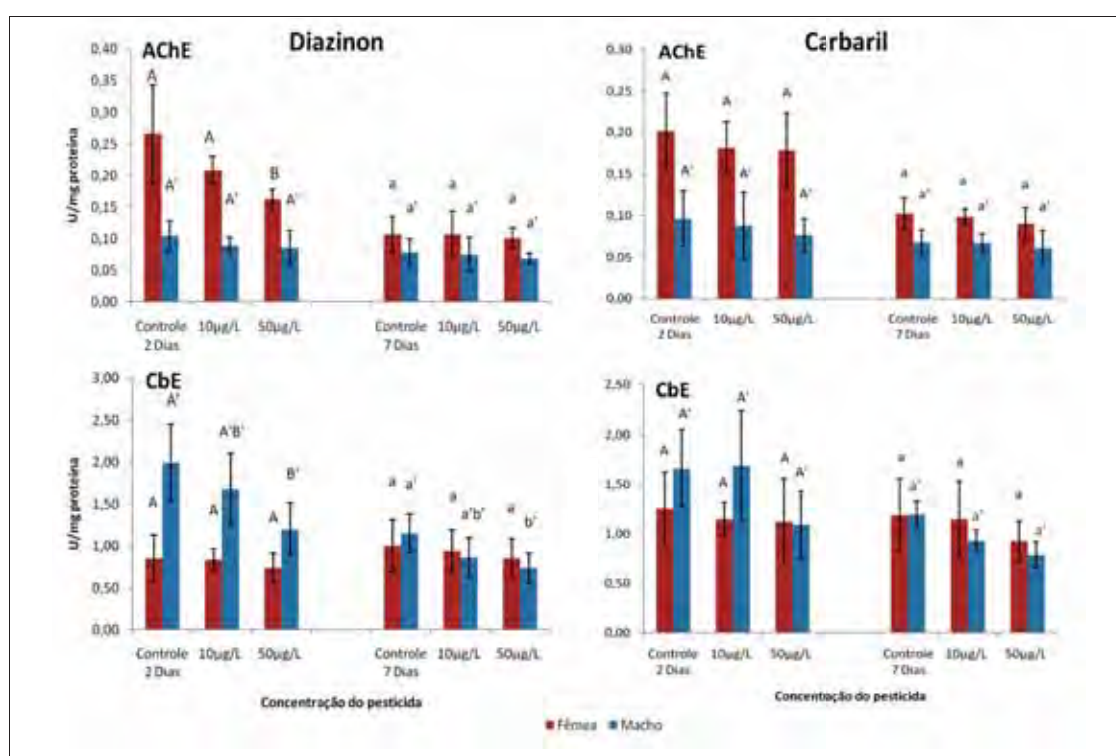


Figura 12. Cinética de inibição in vivo de AChE e CbE em fêmeas e machos de *M. jelskii* expostos ao diazinon e carbaril. (A= fêmeas, 2 dias de exposição; A'= machos, 2 dias de exposição; a = fêmeas, 7 dias de exposição; a' = machos 7 dias de exposição).

Com relação à não inibição da CbE nos machos, na concentração mais baixa (10µg/L), pode-se sugerir que neste grupo esse fenômeno seja dependente da concentração do composto utilizada nos testes, conforme sugerido por Denton et al. (2003). Esses autores realizaram um estudo semelhante utilizando o peixe *Pimephales promelas*, submetidos às concentrações de 10 µg/L, 30 µg/L e 50µg/L de diazinon por períodos de dois e quatro dias de exposição. As taxas de inibição apresentadas pela CbE foram significantes apenas nas maiores concentrações.

4.7.2. Exposição ao carbaril

Quanto aos indivíduos expostos ao carbaril, tanto machos quanto fêmeas não apresentaram inibição significativa para ambas as enzimas analisadas, em nenhuma das variáveis testadas (Figura 12).

Conforme já discutido anteriormente, o carbaril é um pesticida capaz de interagir com diversas macromoléculas de diferentes tecidos (BHAVAN e GERALDINE, 2002; 2009), o que parece diminuir sua ação sobre as enzimas analisadas nos testes *in vivo*.

Um outro aspecto importante a ser ressaltado diz respeito à comparação dos resultados obtidos nos experimentos de exposição *in vitro* (Figura 10) e *in vivo* (Figura 12). Observou-se que *in vitro* ocorreu uma inibição acentuada de ambas as enzimas expostas ao carbaril, ao contrário dos experimentos *in vivo*.

Esta diferença no padrão de inibição pode ser explicada pela metodologia aplicada: nos experimentos de exposição *in vitro* foi utilizado apenas tecido hepatopancreático, enquanto que nos experimentos de exposição *in vivo*, foi utilizado o animal inteiro, devido ao seu tamanho diminuto. Dessa forma é comum que a atividade enzimática seja maior em experimentos onde foram utilizados indivíduos inteiros, pois diversos tecidos (nervoso e muscular, por exemplo), também apresentam alta atividade esterásica (HILDEBRAND et al., 1974; BEHRA et al., 2002; LIMA et al., submetido à publicação).

4.8. Considerações Finais

De acordo com McDowell e Prakash (1976) uma das mais importantes questões da biologia evolutiva reside na quantidade de variação genética que existe nas populações e espécies, do seu significado e de como ela é mantida nas mesmas. Muitos trabalhos têm se voltado ao estudo de polimorfismos genéticos em diferentes populações e espécies e às modificações na sequência de aminoácidos das proteínas e enzimas ao longo da evolução, evidenciando a grande quantidade de variação genética existente nos organismos.

Os dados obtidos no presente estudo são pioneiros nesses crustáceos e permitiram avaliar a variabilidade genética das enzimas esterásicas dos camarões *M. amazonicum* e *M. jelskii* e, particularmente, o comportamento das AChEs e CbEs na presença de importantes compostos praguicidas amplamente utilizados em nossa região, e, ainda, contribuir para o conhecimento da biologia desses crustáceos ainda pouco estudados.

De acordo com Wheelock et al. (2008) ainda há muito a ser definido acerca das esterases, compreendendo, assim, uma área ainda bastante aberta à pesquisas que visem tanto à aplicação da atividade destas enzimas no monitoramento ambiental, quanto à sua importância fisiológica, evolutiva e adaptativa.

Atualmente vem crescendo o interesse por uma melhor compreensão do papel fundamental das enzimas esterásicas em processos de resposta metabólica, a contaminação e a desintoxicação em diferentes organismos. O padrão de atividade esterásico poderia ser utilizado para identificar contaminantes ambientais, estimar os efeitos tóxicos em potencial de novos compostos, além de permitir o monitoramento ambiental utilizando organismos biomarcadores.

Outros estudos utilizando diferentes sistemas enzimáticos envolvidos nas respostas metabólicas causadas, por exemplo, por estresse oxidativo, devem fornecer a complementação necessária aos dados obtidos no presente trabalho e permitir um melhor conhecimento dos aspectos relacionados às respostas fisiológicas causadas por estresse ambiental e que possam, ainda, serem preditivos a cerca da qualidade da água ambiental onde as mesmas habitam.

5. CONCLUSÕES

A análise do padrão da variabilidade genética das enzimas esterásicas dos camarões *M. amazonicum* e *M. jelskii* e a atividade das AChEs e CbEs, *in vitro* e *in vivo*, na presença de compostos praguicidas OPs e CM, permitiu concluirmos que:

1) As bandas que apresentaram maior frequência foram a EST2, EST3, EST6, EST7 e EST9, nas duas espécies, com variação de 80,00% a 99,50%, a banda EST12 foi encontrada em 100,00% dos indivíduos, para as duas espécies. As bandas EST1, EST4, EST5 e EST8 apresentaram frequências um pouco menores, variando de 33,33% a 53,33%. Já as bandas EST10 e EST11 apresentaram as frequências mais baixas, com variação de 6,66% a 26,66%.

2) as semelhanças entre as frequências das bandas esterásicas, nas duas espécies, podem estar relacionadas a importância fisiológica das esterases e do hepatopâncreas, a alta proximidade filogenética entre as duas espécies, e ao fato de tratarem-se de enzimas altamente conservadas evolutivamente.

3) o pH 6,2 apresentou-se como o mais efetivo para o processo de coloração das esterases para as duas espécies de *macrobrachium* testadas.

4) as fêmeas de *M. amazonicum* expostas *in vitro* ao diazinon apresentaram uma maior atividade de AChE em relação aos machos, o que pode indicar uma maior produção dessas enzimas nas fêmeas.

5) em *M. amazonicum*, a CbE não foi inibida, *in vitro*, pelo diazinon, provavelmente, este composto necessita de mecanismos de metabolização que o convertam em diazoxon, para que assim possa inibir esta enzima.

6) com relação ao clorpirifos, as AChEs de *M. amazonicum* apresentaram sensibilidade a este composto sem necessidade de metabolização; as CbEs demonstraram uma maior sensibilidade pelo clorpirifos do que ao diazinon.

7) a estrutura química dos carbamatos pode ser a principal responsável pela acentuada inibição na atividade das AChEs e das CbEs, em fêmeas e machos de *M. amazonicum* expostos *in vitro* ao carbaril, pois esta estrutura facilitaria a interação deste composto com as enzimas.

8) a maior inibição apresentada pela AChE em machos de *M. jelskii* expostos ao diazinon, *in vitro*, sugere uma menor atividade desta enzima no hepatopâncreas dos machos em relação a fêmeas, o que reflete aspectos fisiológicos diferenciados deste órgão, nos dois sexos.

9) a pouca inibição apresentada pela AChE e pela CbE, *in vitro*, em ambos sexos de *M. jelskii* pode ser devido a necessidade de o diazinon ser metabolizado em diazoxon, sob ação de outros sistemas enzimáticos para exercer seu efeito tóxico mais acentuadamente.

10) as AChEs e CbEs de fêmeas e machos de *M. jelskii* expostos *in vitro* ao clorpirifos apresentaram-se acentuadamente sensíveis a altas concentrações deste pesticida. Além disso, estas enzimas apresentaram maior sensibilidade frente a este composto quando comparado ao diazinon.

11) um sistema de interação de defesa CbE-AChE parece ocorrer em machos e fêmeas de *M. jelskii* quando expostos *in vitro* ao clorpirifos, onde a CbE protege a AChE contra os efeitos deste composto.

12) a CbE parece não representar um sistema de defesa contra o carbaril, pois estas apresentaram sensibilidade semelhante a AChE nos testes *in vitro* realizados com machos e fêmeas de *M. jelskii*.

13) testes de exposição *in vivo* com fêmeas de *M. amazonicum* mostraram que a toxicidade do diazinon em AChE apresenta-se dependente tanto da concentração quanto do tempo de exposição, para estas fêmeas; os machos desta espécie não apresentaram sensibilidade a este composto, o que pode estar associado a diferenças fisiológicas e comportamentais existentes entre os sexos e, ainda, à ação de outros processos metabólicos que ocorrem *in vivo*.

14) as CbEs de machos e fêmeas de *M. amazonicum* expostos *in vivo* ao diazinon apresentam reativação por volta de sete dias após a exposição inicial.

15) fêmeas de *M. amazonicum* não apresentaram sensibilidade ao carbaril, em nenhuma das enzimas testadas, quando expostas *in vivo*. Enquanto que *in vitro* apresentaram uma inibição muito mais efetiva. Esta diferença nos padrões de inibição sugere que o carbaril possa interagir com diferentes macromoléculas biológicas e em diferentes tecidos.

16) a AChE de machos de *M. amazonicum*, apresentam reativação após um período de dois dias da exposição inicial, *in vivo*, ao carbaril.

17) a AChE de fêmeas de *M. jelskii* expostas ao diazinon, apresentam reativação após um período de dois dias da exposição inicial.

18) prováveis adaptações fisiológicas ligadas ao sexo e a processos reprodutivos podem ter proporcionado a falta de sensibilidade da AChE nos machos de *M. jelskii* expostos ao diazinon.

19) no que diz respeito à CbE de *M. jelskii in vivo*, as fêmeas não foram sensíveis ao diazinon. Ao passo que os machos apresentaram um padrão de inibição dependente da concentração do composto, o que também pode ser atribuído a adaptações fisiológicas e reprodutivas ligadas ao sexo.

20) AChE e CbE, tanto de machos quanto de fêmeas de *M. jelskii*, não apresentaram sensibilidade, *in vivo*, ao carbaril, o que reforça a hipótese de que este composto possa interagir com diferentes macromoléculas, em diferentes tecidos, diminuindo sua ação sobre estas enzimas.

21) diferenças na metodologia empregada em análises *in vitro* e *in vivo* podem ser as principais responsáveis pelas diferenças observadas no padrão de inibição para ambas as enzimas expostas ao carbaril, em *M. jelskii*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. ANVISA, 2010.

AMANULLAH, B.; STALIN, A.; PRABU, P.; DHANAPAL, S. Analysis of AchE and LDH in mollusc, *Lamellidens marginalis* after exposure to chlorpyrifos. **Journal of Environmental Biology**. p. 417-419, 2010.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 6, p. 158-170, 2003.

ARUN, S.; RAJENDRAN, A.; SUBRAMANIAN P. Subcellular/tissue distribution and responses to oil exposure of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and glutathione S-transferase in freshwater prawns (*Macrobrachium malcolmsonii*, M. lamarrei lamarrei). **Ecotoxicology**, v. 4, p. 341-346, 2006.

AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. (org). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**., São Carlos: Rima, 2003.

BARATA, C.; DAMASIO, J.; ANGEL-LÓPEZ, M.; KUSTER, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ D.; CARMEN-RIVA, M.; RALDÚA, D. Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. **Environ Toxicol Chem**. v. 26, p. 370-379, 2007.

BARBOSA, J.S. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73 (3), p. 320-325, 2010.

BARNES, R.D, RUPER, E.E. **Zoologia dos Invertebrados**. Ed. 6. Editora Roca, 2005.

BECKMAN, L; JOHNSON, F.M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. **Hereditas**, v. 51, p. 212-220, 1964.

BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C; VONESCH, J.L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRÄHLE, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. **nature neuroscience**, v. 5, n. 2, 2002.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Biochemical Stress Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. p. 27-41, 2001.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Carbaryl-induced alterations in biochemical metabolism of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. **J Environ Biol.**, v. 23, p. 157-62, 2002.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic Toxicology**. p. 331-339, 2000.

BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Journal of Environmental Biology**, 2009.

BITENCOURT, F. ; FRIGHETTO, R. T. S. ; QUEIROZ, J. F. ; LOSEKANN, M. E. ; LUIZ, A. J. B. ; ALMEIDA, E. A. . PROD and BROD modulation in Nile tilapia after exposure to 17 β -estradiol. **Journal of Life Sciences**, v. 5, p. 35-38, 2011.

BITONDI, M.M.G.; MASTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. **Biochem. Genet.**, v. 21, n. 9-10, p. 985-1002, 1983.

BOCQUENÉ, G; GALGANI, F. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection of effects. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 22, p. 337-344, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n.72, p. 248-254, 1976.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ.**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CALLAGHAN, A.; HIRTHER, G.; FISHER, T.; CRANE, M. Effect of shortterm exposure to chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 50, p. 19-24, 2001.

CASTIGLIONI-RUIZ, L.; BICUDO, H.E.M.C.; CERON, C.R. Esterase patterns in four Brazilian populations of *Haematobia irritans*. **Cytobios**, v. 90, p.81-94, 1997.

CERON, C. R.; SANTOS, J.R.; BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in a embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**, V. 15, n. 01, p. 201-203, 1992.

CERON, C.R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. Instituto de Biociências/USP, Ribeirão Preto (SP). (Tese de Doutorado), 1988.

CHANG, C.C.; LEE, P.P; HSU, J.P.; YEH, S.P.; CHENG, W. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. **Aquaculture**, n. 253, p. 653 – 666, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ficha de Informação de Produto Químico**. CETESB, 2010.

COOPER, N.L.; BIDWELL, J.R. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. **Aquatic Toxicology**. v. 76, p. 258–267, 2006.

DENTON, D.L.; WHEELLOCK, C.E.; MURRAY, S.A.; DEANOVIC, L.A.; HAMMOCK, B.D.; HINTON, D.E. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 22, p. 336-341, 2003.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; PECHÉN DE D'ANGELO, A.M. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 88, p. 134–142, 2007.

FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; RIBEIRO, K.; PAPA, L.P. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Int. J. Morphol.**, v. 27,n. 01, p. 121-128, 2009.

FRASCO, M.F.; ERZEN, I.; STOJAN, J.; GUILHERMINO, L. Localization and properties of cholinesterases in the common prawn a kinetic-histochemical study. **Biol Bull.**, v.218, p.1-5, 2010.

FRASCO, M.F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Cholinesterase from the prawn eyes. **Aq. Tox.**, v.77, p.412-21, 2006.

FUKUTO, R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. **Environmental Health Perspectives.** v. 87, p. 245-254, 1990.

FUTUYMA, D.J. Variação. In: FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva.** 2 ed. Ribeirão Preto: SBG/CNPq, 1992.

GAGNAIRE, B.; GEFFARD, O.; BENOIT, X.; MARGOUM, C.; GARRIC, J. Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774). **Chemosphere.** v. 71, p. 553–560, 2008.

GALINDO-REYES A., J.G.; DALLA VENEZIA, L.; LAZCANO-ALVAREZ, G.; RIVAS-MENDOZA, H. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. **Chemosphere**, n.40, p. 233-237, 2000.

GALLOWAY, T.S.; MILLWARD, N.; BROWNE, M.A.; DEPLEDGE, M.H. Rapid assessment of organophosphorous / carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquatic Toxicology.** v. 61, p. 169–180, 2002.

GARCÍA-DÁVILA, C.R.; ALCANTÁRA, F.B.; VASQUEZ, E.R.; CHUJANDAMA, M.S. Biologia reprodutiva do camarão *Macrobrachium brasiliense* (HELLER, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) em igarapés de terra firme da Amazônia peruana. **Acta Amazonica**, n. 30, v. 4, p. 653-664, 2000.

GHEDIRA, J.; JEBALI, J.; BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; CHOUBA, L.; BOUSSETTA, H. Acute effects of chlorpyrifos-ethyl and secondary treated effluents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in *Carcinus maenas*. **Journal of Environmental Sciences.** V. 21, P. 1467–1472, 2009.

GUERRA, A.L.; LIMA, A.V.B.; TADDEI, F.G.; CASTIGLIONI, L. Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. **Genetics and Molecular Research**. v.9 4ed. 2317-2327, 2010.

GUNNING, R.V. Inhibition of carbamate-insensitive acetylcholinesterase by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera*. **J. Mol. Neurosci.**, v. 30, p. 21-22, 2006.

HEALY, M.J., et al. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem.Genetics**, v. 24, n. 7, p. 365-388, 1991.

HEATH, D.F. 1961. Organophosphorus Poisons. **Pergamon**, London, UK. In PRINTES, L.B.; CALLAGHAN, A. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in daphnia magna exposed to anticholinesterase insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1241–1247, 2004.

HILDEBRAND, J.G.; TOWNSEL, J. G.; KRAVITZ, E. A. Distribution of acetylcholine, choline, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in regions and single identified axons of the lobster nervous system. **Journal of Neurochemistry**. v. 23, n. 5, p. 951-963, 1974.

JEMEC, A.; DROBNE, D.; TIŠLER, T.; TREBŠE, P.; ROŠ M.; SEPČIĆ, K. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 144, p. 303–309, 2007.

JOHNSON, M.K.; JACOBSEN, D.; MEREDITH, T.J.; EYER, P.; HEATH, A.J.; LIGTENSTEIN, D.A.; MARRS, T.C.; SZINICZ, L.; VALE, J.A.; HAINES, J.A. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. **Emergency Medicine**, v. 12, p. 22–37, 2000.

JOHNSTON, D.J.; ALEXANDER, G.C.; YELLOWHES, D. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Theraps orientalis*. **Journal Crustacean Biol.**, v. 18, p. 271-278, 1998.

KAMRIN, M. A. **Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate**. Library of Congress, 1997.

KEIZER, J.; D'AGOSTINO, G.; NAGEL, R.; VOLPE, T.; GNEMID, P.; VITTOZZI, L. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. **The Science of the Total Environment**. v. 17, p. 213-220, 1995.

KRETSCHMANN, A.; ASHAUER, R.; HITZFELD, K.; SPAAK, P.; HOLLENDER, J.; ESCHER, B.I. Mechanistic Toxicodynamic Model for Receptor-Mediated Toxicity of Diazoxon, the active Metabolite of Diazinon, in *Daphnia magna*. **Environ. Sci. Technol.** v. 45, p. 4980–4987, 2011.

LAPENTA, A.S.; BICUDO, H.E.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, v. 96, p.95-107, 1998.

LI, W.F.; COSTA, L.G.; RICHTER, R.J.; HAGEN, T.; SHIH, D.M.; TWARD, A.; LUSIS, A.J.; FURLONG, C.E. Catalytic efficiency determines *in vivo* efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. **Pharmacogenetics**. v. 10, p. 767-779, 2000

LIMA, A.V.B; GUERRA, A.L., ALMEIDA, E.A.; TADDEI, F.G.; CASTIGLIONI, L. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three *Macrobrachium* (Palaemonidae) species. (submetido a publicação)

LIMA-CATELANI, A.R.A.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation during development, revealed by esterase patterns of *A. aegypti*. **Biochem. Gen.**, v. 42, p. 69-84, 2004.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; FERRERO, E.A. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *P. elegans*. **Arch. Env. Con. Tox.**, p. 167 -176, 2000.

LORENZON, S.; PACUAL, P.G.; FERRERO, E.A. Lipopolysaccharide-induced hyperglycaemia is mediated by CHH release in crustaceans. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 108, p. 395 -405, 2002.

MACHADO, C.E.M. Estações experimentais de Biologia e Psicultura em represas da CESP. **Technical Report**, 12 pp, 1966.

MACKNESS, M.I; WALKER, C.H.; ROWLANDS, D.G.; PRICE, N.R. Esterase activity in homogenates of three stain of rust red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 740, n. 1, p. 65-68, 1983.

MAGALHÃES, C. Abbreviated development of *M. jelskii* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from the Rio Solimões floodplain, Brazil, reared in the laboratory. **Nauplius**, v. 8, p. 1-14, 2000.

MAGALHÃES, C.; BUENO, S.; BOND, G.; VALENTI, W.C.; SILVA, H.M.; KIYOARA, F.; MOSSOLIN, E.C.; ROCHA, S. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in state of São Paulo, Brazil: records and causes of their introduction. **Biod. and Conserv.**, v. 14, p. 1929-45, 2005.

McDOWELL, R. E.; PRAKASH, S. Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudoobscura*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 73, n. 11, p. 4150-4153, 1976.

McREYNOLDS, M.S. Homologous esterase in three species of virilis group of *D. melanogaster*. **Genetics**, v. 315, p. 527-540, 1967.

MERLIN, C., et al. Antennal esterase cDNAs from two pest moths potentially involved in odourant degradation. **Insect Mol. Biol.**, v. 16, p. 73-81, 2007.

MELO, G.A.S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Editora Loyola, 2003.

MOSSOLIN, E.C.; BUENO, S.L. Relative Growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 76, n. 3, p. 363-376, 2003.

NASCIMENTO, A.P.; BICUDO, H.E.M.C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (saltans group). **Genetica**, v. 114, p. 41-51, 2002.

NASCIMENTO, A.P.; BICUDO, H.E.M.C. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (saltans group): intraspecific and interspecific variations in the development. **Genetica**, v. 126, p. 265-276, 2006.

NOGUEIRA, L.; RODRIGUES, A.C.F.; TRÍDICO, C.P.; FOSSA, C.E.; ALMEIDA, E.A. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 243-255, 2011.

NUNES, B. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 212, p. 29-59, 2011.

OAKESHOTT, J.G, et al. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v.90, p.239-268, 1993.

OAKESHOTT, J.G. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *L. cuprina* with comparisons to orthologues in other Diptera. **Biochem. Genetics**, v.35, p.17-40, 1997.

OMKAR, A., SHUKLA, G.S. Dichlorvos intoxication in a freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei* (H. Milne Edwards). **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 9, p. 392-6, 1985.

OWEN, R.; BUXTON, L.; SARKIS, S.; TOASPERN, M.; KNAP, A.; DEPLEDGE, M. An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) ziczac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44, p. 1010–1017, 2002.

PORTO, A.C. **Estrutura Populacional e Biologia Reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1892) (Crustacea, Decapoda, Palemonidae), na Bacia Hidrográfica do Rio Meia Ponte, Bela Vista de Goiás - GO, Brasil.** . Instituto de Biociências/UNESP, Campus de Jaboticabal, 1998.

PRINTES, L. B.; CALLAGHAN, A. Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia*: Um Bom Biomarcador de Avaliação Ambiental?. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** V.1, p. 89-92, 2006.

PRINTES, L.B.; CALLAGHAN, A. a comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in daphnia magna exposed to anticholinesterase insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 23, n. 5, p. 1241–1247, 2004.

REDDY, M.S.; JAYAPRADA, P., RAO, K.V. Impact of methylparathion and malathion on cholinergic and non-cholinergic enzyme systems of penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. **Biochem. Int.**, v. 22, p. 769-79, 1990.

RODRIGUES, F.A.C.; et al. Ecogenotoxicologia dos Agrotóxicos: Avaliação Comparativa Entre Ecossistema Agrícola e Área de Proteção Ambiental. Curitiba: **Revista de Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. p. 73-84, 2005.

SARKAR, A. et al. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicol.**, v. 15, n. 4, p. 333-340, 2006.

SCHLENK D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Mar Pollut Bull.**, v. 39, p. 48-53, 1999.

SHANMUGAVELU, M.; BAYTAN, A.; CHESNUT, J.; BONNING, B. A novel protein that binds JH in fat body tissue and pericardial cells the tobacco hornworm. **J. Biol Chem.**, p. 1802-1806, 2000.

SILVA, J.M.; SANTOS, J.R. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambientes Aquaticos. **Oecol. Bras.**, 2007.

SOGORB M.A.; VILANOVA E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, n. 128, p. 215–228, 2002.

SOLÉ, M.; GARCÍA DE LA PARRA, L.M.; ALEJANDRE-GRIMALDO, S.; SARDÁ F. Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**. v. 52, p. 1708–1716, 2006.

SOUSA, L.G.; PETRIELLA, A.M. Histology of the hepatopancreas of the freshwater *P. argentines*. **Biol.**, v. 24, p. 189-195, 2000.

SOUSA-POLEZZI, R.C.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation along time in a brazilian population of *Aedes aegypti* detected by changes in the esterase patterns. **Genetica**, v. 125, p. 43-53, 2005.

STEEVENS, J.A; BENSON, W.H. Toxicological interactions of chlorpirifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyalella azteca*. **Toxicological sciences**. v. 52, p. 168-177, 1999.

STEGEMAN, J.J. et al. Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. **Mol Pharmacol.**, v. 47, n. 2, p. 296-306, 1995.

STRINGUETTI, C.; GUILHERMINO, L.; SILVA, E. M. Cholinesterase Activity in the Head of Wild *Poecilia reticulata* from Bahia, Brazil: Biochemical Characterization, Effects of Sample Storage and Normal Range of Activity. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 3, p. 57-63, 2008.

TADDEI, F. G. **Biologia populacional: crescimento e reprodução dos camarões palemonídeos *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) e *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) na região noroeste do Estado de São Paulo.** IB/UNESP, Campus de Botucatu. (Tese de Doutorado), 2006.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Divulgação Técnica Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático. São Paulo: **Biológico**, p.135-142, 2005.

TONGBAI, W.; DAMRONGPHOL, P. Bioactivation of chlorpiriphos in the Riceland Prawns, *Macrobrachium lanchesteri*. **Journal of Biological Sciences**, v. 11, 3 ed., p. 275-281, 2011.

TORLONI, C.E.C et al. A pescada-do-Piauí *Plagioscion squamosissimus* nos reservatórios da CESP. **CESP**, SP, 23pp, 1993.

TRAPÉ, A. Z. **Efeitos toxicológicos e registro de intoxicações por agrotóxicos.** Campinas, 2003.

TRÍDICO, C.P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pirene and Diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010.

VALENTI, W.C. Carcinicultura de água doce. São Paulo. **FAPESP**. 383p., 1998.

VALENTI, W.C. **Estudo populacional de camarões de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Palaemonidae).** Instituto de Biociências/UNESP, Campus de Jaboticabal. (Dissertação de Mestrado), 1984.

VAN DER OOST, R. et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environm Toxicol Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VELDSEMA-CURRIE, R.D. Some components of the cholinergic system in the prawn *P. varians* (Leach). **Biochem. J.**, v. 135, p. 673-682, 1973.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. **Biomarkers**, 2009.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALVES DE ALMEIDA, E.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p. 404-412, 2007.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Ltd, 1996.

WEILL, M.; LUTFALLA, G.; MOGENSEN, K. Insecticide resistance in mosquitoes vectors. **Nature**, v. 453, p.136-7, 2004.

WHEELER, M.M.; TARVER, M.R.; COY, M.R.; SCHARF, M.E. Characterization of four esterase genes and esterase activity from the gut of the termite *Reticuliterme flavipes*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 23, p. 170-183, 2009.

WHELOCK M. J.; SHINTANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; K., JOHNSON. Cadherin switching. **Journal of Cell Science**. 121, 727-735, 2008.

WHELOCK, C.E.; EDER, K.J.; WERNER, I.; HUANG, H.; JONES, P.D.; BRAMMELL, B.F.; ELSKUS, A.A.; HAMMOCK, B.D. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**. v. 74 p. 172–192, 2005.

WHITTAKER, T.R.F. Cholinesterase. In: BERGMAYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 3. Ed. Florida: **Verlag Chemie**, v. II, cap. 1.4, p. 52-74, 1984.

WU, J.P.; CHEN, H.C.; HUANG, D.J. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp. **Chemosphere**, v. 73, p. 1019-1026, 2008.

YEHIA, M.A.H.; EL-BANNA, S.G.; OKAB, A.B. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 59, p. 215–225, 2007.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZOU, H.; JUAN, C.; CHEN, S.; WANG, H.; LEE, C. Dopaminergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone and glucose levels in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. **J. Exp. Zool.**, v. 298, p. 44 -52, 2003.

7. ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25056-1	Data da Emissão: 22/09/2010 09:08
Dados do titular	
Nome: Alexandre Vidotto Barboza Lima	CPF: 337.446.748-27
Título do Projeto: ANÁLISE DO PADRÃO DE ATIVIDADE ESTERÁSSICA NO HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÕES PALEMONÍDEOS EXPOSTOS A DIFERENTES PESTICIDAS	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S. J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Padronização da metodologia	08/2010	12/2010
2	Coleta por espécimes	08/2010	11/2011
3	Obtenção e análise dos resultados	05/2010	12/2011
4	Levantamento bibliográfico	08/2010	03/2012
5	Defesa da dissertação	03/2012	03/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo deverão ser feitas por pessoa natural ou jurídica brasileira, em todo o território nacional, que implique o deslocamento de recursos humanos e materiais, sendo por objeto coleta de dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e parte da colônias (ou sítio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento ao responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não conservado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.bama.gov.br (Serviço on-line - Licença para Importação ou Exportação de Fauna e Flora - CITES e não CITES). Em caso de material conservado, consulte www.icmbio.gov.br/licitacao/-/pt-br .
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de população do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade e firmar o CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobrepesca ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fabiano Gazi Tadini	Coordenador	202.753.668-24	242331701 SSP-SP	Brasileira
2	Diante Bruno Avanzo Rosan	Estagiário	378.522.788-19	46065109-3 SSP-SP	Brasileira
3	Lilian Castiglioni	Orientadora	169.627.026-39	19366773-3 SSP-SP	Brasileira
4	Ana Letícia Guerra	Coordenadora	353.562.248-70	44.116.378.6 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	Represa Barra Mansa (Mecurupa-SP) e IBILCE-UNESP	Fora de UC

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta de animais silvestres in situ	Macrobrachium amazonicum, Macrobrachium jelskii

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sistema/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57652493



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25056-1		Data da Emissão: 22/09/2010 09:08	
Dados do titular			
Nome: Alexandre Vidotto Barboza Lima		CPF: 337.446.748-27	
Título do Projeto: ANÁLISE DO PADRÃO DE ATIVIDADE ESTERÁSICA NO HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÕES PALEMONÍDEOS EXPOSTOS A DIFERENTES PESTICIDAS			
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S. J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04	
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Macrobrachium amazonicum, Macrobrachium jelskii	
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Macrobrachium amazonicum ("Qtd": 400), Macrobrachium jelskii ("Qtd": 400)	
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Macrobrachium amazonicum, Macrobrachium jelskii	
* Qtd: de indivíduos por espécie/localidade/área de conservação, a serem coletados/durante 120 dias.			
Material e métodos			
1	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Peneira	
Destino do material biológico coletado			
1	Nome local destino	Tipo destino	
1	UNESP CAMPUS S. J. R. PRETO	criadouro científico	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57652493



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25056-1	Data da Emissão: 22/09/2010 09:08
Dados do titular	
Nome: Alexandre Viriato Barboza Lima	CPF: 337.446.748-27
Título do Projeto: ANÁLISE DO PADRÃO DE ATIVIDADE ESTERÁSSICA NO HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÕES PALEMONÍDEOS EXPOSTOS A DIFERENTES PESTICIDAS	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtd.	Tipo de amostra	Qtd.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57652493



Página 3/3