



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PAULA RAYANE DE SOUZA

Caracterização da acetilcolinesterase das brânquias e trato digestório da ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário Canal de Santa Cruz, PE-Brasil.

RECIFE
Fevereiro– 2016

PAULA RAYANE DE SOUZA

Caracterização da acetilcolinesterase das brânquias e trato digestório da ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário Canal de Santa Cruz, PE-Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de **Pós Graduação em Ciências Biológicas** da **Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos á obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas**.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Prof. Dr. Kelma Sirleide de Souza

RECIFE

Fevereiro – 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Paula Rayane de

Caracterização da acetilcolinesterase das brânquias e trato digestório da ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário Canal de Santa Cruz, PE-Brasil / Paula Rayane de Souza- Recife: O Autor, 2016.

56 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Kelma Sirleide de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexo

- 1. Ostracódeo 2. Acetilcolinesterase 3. Metais pesados I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Souza, Kelma Sirleide de (coorientadora) III. Título**

594.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-136

CARACTERIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE DAS BRÂNQUIAS E TRATO
DIGESTÓRIO DA OSTRÁ *Crassostrea rhizophorae* DO ESTUÁRIO CANAL DE SANTA
CRUZ, PE-BRASIL

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco

Data de aprovação: 26/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

(Universidade Federal de Pernambuco, UFPE)

Dra. Renata Cristina da Penha França

(Universidade Federal de Pernambuco, UFPE)

Dra. Helane Maria Silva da Costa

(Universidade Federal de Pernambuco, UFPE)

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar a cada dia força e luz para alcançar meus objetivos, sempre me abençoando.

Aos meus pais Paulo Souza e Lucineide Souza por todo amor, dedicação e apoio. E por terem me ensinado a essência da vida.

A minha irmã Raysse Souza, a amiga mais querida que tenho.

A Davi Silva pelo amor, carinho, paciência e companheirismo nestes anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela oportunidade de desenvolver este trabalho junto a ele.

A Kelma Souza uma pessoa admirável, que com muita paciência dedicou seu tempo para ajudar na realização deste trabalho, ensinando sempre. Muito obrigada!

A Caio Assis, por seu apoio na elaboração do trabalho e a Luciene conhecedora da área de estudo e quem muito me ajudou na coleta das ostras para o presente trabalho.

Aos companheiros de laboratório Labenz que são muitos, vale ressaltar, por isto que o melhor é não citar nomes pra não cometer o erro de esquecer alguém. Agradeço a todos desta família LABENZ.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

As pessoas que sempre torceram por mim.

RESUMO

A ostra nativa é um fruto do mar bastante consumido e por ser um bivalve de hábito filtrador é considerado um excelente bioindicador ambiental. Assim, o presente trabalho tem o objetivo de caracterizar parcialmente parâmetros cinéticos e físico-químicos da acetilcolinesterase de brânquias e vísceras de *Crassostrea rhizophorae* do Canal de Santa Cruz, localizado em Itamaracá e investigar o efeito *in vitro* de pesticidas e íons metálicos sobre sua atividade a fim de investigar seu potencial como biomarcador dessas substâncias. Acetilcolinesterase é uma enzima do grupo das serino-esterases que atua na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina garantindo a intermitência dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação neuronal. A inibição deste mecanismo ocorre devido aos efeitos da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos, bem como a íons metálicos e resulta em acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica gerando uma hiper-estimulação colinérgica. Desta forma, ostras foram coletadas, brânquias e vísceras retiradas separadamente e feito os homogenatos em Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. A partir destes homogenatos foram realizadas a determinação da atividade enzimática, temperatura ótima, estabilidade térmica, avaliação do efeito de inibidores específicos, pesticidas e o efeito de íons metálicos. Os resultados demonstraram que o pH ótimo foi de 8,0 e 8,5 para a enzima de brânquias e vísceras, respectivamente. Temperatura ótima de 70°C para AChE branquial e 75°C para AChE visceral. A enzima apresentou estabilidade térmica até 100°C em ambos tecidos. Os parâmetros cinéticos de V_{max} em brânquias e vísceras foram de 18.169 ± 0.52 mU/mg e 12.139 ± 0.31 mU/mg, respectivamente. O valor de K_m 0.502 ± 0.05 mM para as brânquias e 0.255 ± 0.04 mM para vísceras. Todos os pesticidas utilizados apresentaram efeito inibitório na atividade da AChE apresentando decréscimo significativo. Os íons Zn^{2+} ; Cu^{2+} ; Hg^{2+} ; Mn^{2+} ; Ba^{2+} e Al^{2+} em 0,1 mM inibiram a atividade nos dois tecidos de estudo, brânquias em 79%, 88%, 73%, 100%, 77% e 100% . E para vísceras uma inibição de 85%, 100%, 41%, 65%, 100% e 59% respectivamente. A AChE isolada nas brânquias de *C. rhizophorae* mostrou potencial biomarcador para o carbamato carbaril, e o íon Cu^{2+} . Esta enzima pode ser considerada uma ferramenta útil no monitoramento de toxicidade ambiental.

Palavras-chaves: Ostra do mangue. Acetilcolinesterase. Metais pesados. Pesticidas.

ABSTRACT

The native oyster is a sea fruit widely consumed and for being a strainer habit of bivalve is considered an excellent environmental bioindicator. Therefore, the aim for this study was partially characterize the kinetic parameters and physico-chemical of acetylcholinesterase gills and viscera of *Crassostrea rhizophorae* from the Canal Santa Cruz, Itamaracá and investigate the *in vitro* effect of pesticides and metallic ions on activity for investigate its potential as a biomarker of these substances. Acetylcholinesterase is an enzyme from the group of serine esterase which acts on the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine ensuring the burst of nerve impulses responsible for neuronal communication. This inhibition mechanism is due to the effects of exposure to organophosphorus and carbamate pesticides, as well as metal ions and results in the accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft generating a cholinergic overstimulation. Oysters were collected, gills and viscera removed separately and made homogenates with 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. Homogenates were centrifuged and subsequently to carry out the enzymatic activities, experiments the optimum temperature, thermal stability, trials with specific inhibitors, pesticides and the effect of metal ions. The results showed that the optimum pH was 8.0 and 8.5 for the enzyme gills and viscera, respectively. Optimum temperature of 70 ° C gill AChE and 75 ° C visceral AChE. The enzyme showed to be stable up to 100 ° C in both tissues. The kinetic parameters, V_{max} gills and viscera was 18.169 ± 0.52 mU/mg e 12.139 ± 0.31 mU/mg respectively. The value of K_m 0.502 ± 0.05 to the gills and 0.255 ± 0.04 mM for viscera. All pesticides used showed inhibitory effect on AChE activity presenting significant decrease. The ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} Ba^{2+} and Al^{2+} 0.1 mM inhibited the activity in both tissue study, gills 79%, 88%, 73%, 100%, 77% and 100%. Viscera 85%, 100%, 41%, 65%, 100% and 59% respectively. The AChE gills of *C. rhizophorae* showed potential biomarker for carbaryl carbamate, and copper ion Cu^{2+} , enzyme considered a useful tool in monitoring environmental toxicity.

Key words: Mangrove oyster. Acetylcholinesterase, Heavy metals. Pesticides.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Molécula de Acetilcolinesterase - AChE	10
Figura 2. Molécula de Acetilcolina	11
Figura 3. Desenho esquemático do ciclo de acetilcolina.....	11
Figura 4. Fórmula estrutural dos Organofosforados e Carbamatos	13
Figura 5. Principais rotas dos pesticidas em ecossistemas aquáticos.....	14
Figura 6. Área do sistema estuarino de Itamaracá.....	18
Figura 7. Foto de <i>Crassostrea rhizophorae</i>	20

Artigo Científico

Figura1. Atividade de AChE em Brânquias e Vísceras de <i>C.rhizophorae</i>	33
Figura 2. - Efeito de pH (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>C.rhizophorae</i>	34
Figura 3. Temperatura ótima (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>C.rhizophorae</i>	35
Figura 4. Estabilidade térmica (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>C.rhizophorae</i>	35
Figura 5. Atividade da AChE em <i>C. rhizophorae</i> em presença de concentrações crescentes (0-10 mM) dos inibidores seletivos: BW284c51 (A- Brânquias; B- Vísceras); neostigmine (C- Brânquias; D- Vísceras); eserine (E- Brânquias; F- Vísceras).....	36

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Sinais e sintomas dos envenenamentos por inseticidas organofosforados.	16
--	----

Artigo Científico

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de AChE em diferentes tecidos e espécies.....	34
Tabela 2. Valores de IC ₂₀ e IC ₅₀ estimados para <i>C.rhizophorae</i> na presença de inibidores seletivos.....	37
Tabela 3. Valores de IC ₂₀ , IC ₅₀ e Ki estimados para <i>C.rhizophorae</i> na presença de alguns íons metálicos.....	37
Tabela 4. Valores de IC ₂₀ , IC ₅₀ e Ki estimados para <i>C. rhizophorae</i> na presença de pesticidas organofosforados e carbamatos.....	38

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

CBs - Carbamatos

ChEs - Colinesterases

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTNB - Ácido 5,5' Ditiobis (2-nitrobenzóico)

IC20 - Concentração que inibi 20% da atividade enzimática

IC50 – Concentração que inibi 50% da atividade enzimática

Ki - Constante de inibição

Km- Constante de Michaelis-Menten

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPs - Organofosforados

Tris - Tris-hidróximetil-aminometano

USEPA - National Primary Drinking Water Standards

Vmax - Velocidade maxima de catálise atingida por uma enzima

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
2.1. Enzimas - Colinesterases.....	09
2.2. Pesticidas – Organofosforados e Carbamatos	12
2.2.1. Toxicidade e mecanismos de ação	13
2.3. Metais pesados	15
2.4. Canal de Santa Cruz.....	17
2.5. <i>Crassostrea rhizophorae</i> – Ostra do mangue	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Geral	21
3.2. Específicos	21
4. REFERÊNCIAS	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
6. ANEXO.....	43
6.1 Normas para redação de artigo científico - revista Aquatic Toxicology	43

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais são extremamente ricos e diversificados, sendo constituídos por inúmeros componentes bióticos e abióticos. As atividades cotidianas da população humana resultam, muitas vezes, na contaminação dos ecossistemas com compostos tóxicos de origem natural ou antropogênica que afetam o equilíbrio ambiental e consequentemente a respectiva biodiversidade e em particular a qualidade do ecossistema aquático. Este ecossistema apresenta um grande risco de contaminação, já que substâncias podem ser incorporadas por fenómenos de lixiviação, via efluentes ou via erosão, com a consequente distribuição na água, nos sólidos em suspensão, nos sedimentos e biota (FERNANDES et al., 2008).

As zonas costeiras tropicais abrigam grande diversidade de ecossistemas, entre eles o Manguezal, estendendo-se ao norte e sul do Equador (SNEDAKER et al., 1985). No Brasil, os manguezais ocorrem desde o Cabo Orange no Amapá, até a cidade de Laguna em Santa Catarina (SANTOS 2009). O Manguezal possui uma importância que abrange aspectos ecológicos, econômicos e sociais, destacando-se como uma área de produção, criação e reprodução de várias espécies biológicas, como os moluscos, peixes e crustáceos (ASMUS, 1996).

O manguezal do Canal de Santa Cruz, assim como a maioria dos manguezais brasileiros, ocorrem em ambientes estuarinos, estando, portanto, condicionados à dinâmica desses ambientes. (MACEDO et.al, 2000). Consideram a salinidade um dos fatores mais importantes a condicionar a vida nesses ambientes, pois ela varia conforme a mistura de água doce com a água do mar, cuja concentração salina diminui gradativamente à medida que, a partir do mar, se aproxima da desembocadura do rio ou mesmo se adentra rio acima.

O canal de Santa Cruz é um braço de mar em forma de “U” que separa a ilha de Itamaracá do continente, localizado a 50 Km ao norte de Recife, apresenta 22 km de extensão e uma profundidade de 4 a 5 metros. A expansão das atividades industriais e turísticas na região, além do elevado crescimento populacional humano e sobrepesca, colocam em risco o delicado sistema ecológico deste local. Os moluscos bivalves, por exemplo podem sofrer diretamente as consequências negativas da poluição, pois se alimentam por filtração de forma a bioacumular elementos como metais pesados e pesticidas, contaminantes que podem causar danos à saúde do próprio organismo bivalve.

A *Crassostrea rhizophorae* é um molusco bivalve pertencente à família Ostreidae (RIOS, 1994). Habita águas costeiras rasas, ocorrendo desde a faixa equatorial. Pode ser encontrada fixa às raízes aéreas das vegetações de mangue, ocorrendo também na faixa entre marés dos costões rochosos ou em bancos submersos. Considerada eurialina e euritêmica, desova intermitentemente ao longo do ano e é adaptada ao ambiente estuarino (GALVÃO et al., 2000; CHRISTO, 2006). Possui o corpo envolvido por duas conchas ou valvas articuladas em sua porção dorsal por um ligamento córneo. O corpo é composto por: conchas, músculo adutor, brânquias, manto, sistema digestivo, sistema circulatório e sistema nervoso.

A enzima acetilcolinesterase (AChE), do grupo das hidrolases, atua na hidrólise de ésteres de colina principalmente a acetilcolina. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal. Este neurotransmissor permanece armazenado em vesículas sinápticas e, quando um impulso nervoso chega no axônio terminal, é liberada pelo neurônio para a região sináptica, onde é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no próximo neurônio. Quando a ACh interage com os receptores regenera o impulso nervoso no neurônio, levando assim a continuidade da transmissão. Uma vez transmitido o impulso nervoso, é importante que o processo de interação da ACh com o receptor seja interrompido para evitar o excesso de transmissão nervosa, que pode levar a problemas de funcionamento do corpo (PATRICK, 2001). Então a enzima AChE recolhe o neurotransmissor ACh e realiza uma forte modificação na sua estrutura molecular.

Neste estudo, a acetilcolinesterase será caracterizada quanto a parâmetros cinéticos, físico-químicos, como também a sua sensibilidade a alguns compostos que podem estar presentes no ambiente aquático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

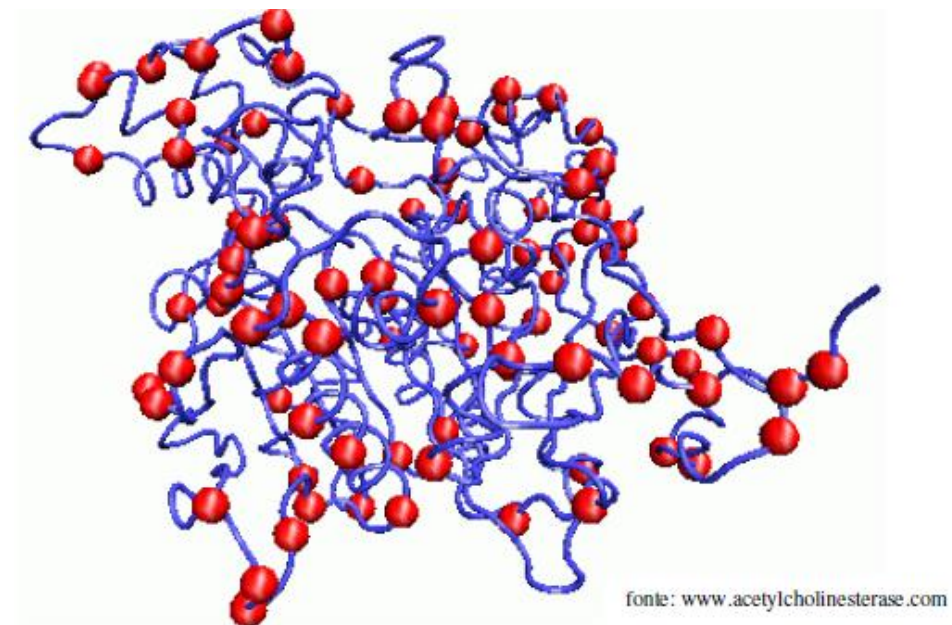
2.1. Enzimas - Colinesterases

Enzimas são proteínas que desempenham importante papel como catalisadores em diversas reações bioquímicas. São fundamentais para metabolismo biológicos dos seres vivos, visto que sem catálise, as reações não ocorreriam em uma escala de tempo útil. As colinesterases são as enzimas presentes no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados, atuando na regulação da transmissão dos impulsos nervosos entre os neurônios. Dentre elas,

destaca-se a acetilcolinesterase (AChE) (figura 1) que age na desativação do principal neurotransmissor do sistema nervoso, na maioria das espécies: a acetilcolina (ACh) (figura 2) (ASSIS, 2005).

A enzima acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina (Figura 3) que é liberado nas sinapses nervosas e na junção neuromuscular, a hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo a abertura de canais de íons Na^+ , e a consequente despolarização da membrana, o que irá proporcionar um potencial de ação, propagando o impulso (STENESH, 1998). Trata-se de uma reação reversível, com formação de colina e ácido acético que, por sua vez, são novamente utilizados para formação de acetilcolina.

Figura 1. Molécula de Acetilcolinesterase- AChE



A acetilcolina hidrolisada previne contínuas passagens de impulsos, o que é necessário para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular. Pois é importante que

este neurotransmissor seja degradado antes da chegada de um novo impulso elétrico. Em sua inibição ocorre um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos causado pela permanência dos canais de Na^+ abertos (STENESH, 1998).

Figura 2. Molécula de Acetilcolina

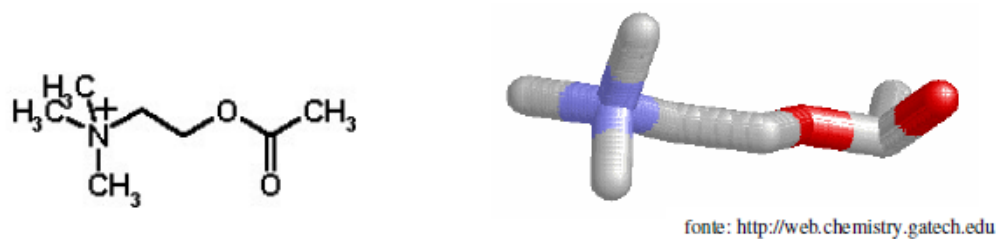
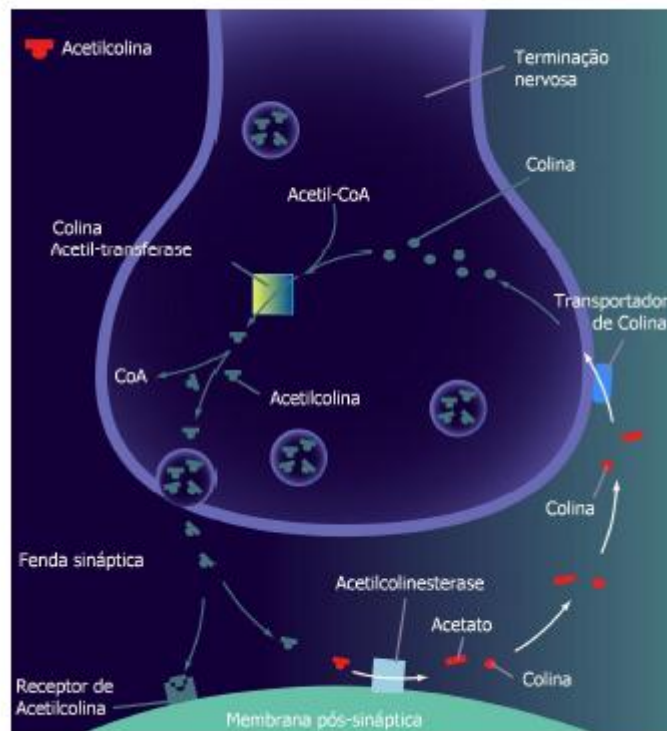


Figura 3. Desenho esquemático do ciclo da acetilcolina, é possível observar o papel da acetilcolinesterase desativando o excesso do neurotransmissor.



A AChE é frequentemente descrita como uma enzima perfeita porque suas propriedades catalíticas se conjugam para aproximar sua atividade do limite máximo de velocidade permitido pela própria difusão do substrato no meio circundante (TÕUGU, 2001). Esta enzima contém dois sítios catalíticos, um sítio esterásico e um sítio aniônico. O sítio esterásico da acetilcolinesterase situa-se dentro de uma cavidade estreita e é constituído de uma tríade catalítica formada pelos resíduos dos aminoácidos serina 200, histidina 440 e glutamato 327 (podendo variar ligeiramente suas posições). O peso molecular da acetilcolinesterase, assim como nas demais enzimas, oscila de acordo com a espécie em questão, embora exista registro de que cada monômero de unidade dessa enzima possua cerca de 70 a 80,00 kDa (OLIVEIRA, 2011).

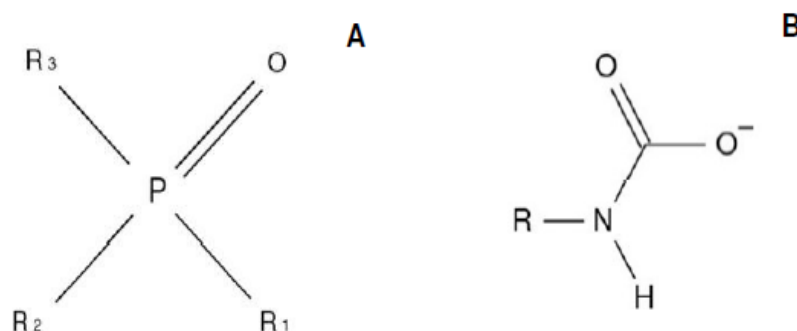
É descrito que a acetilcolinesterase é fortemente inibida por pesticidas do tipo carbamato e organofosforados, assim como também por metais (BAINY, 2006). Quando ela é inibida ocorre sérias consequências aos organismos expostos. Uma vez iniciada, a inibição tende à irreversibilidade, gerando quadros de intoxicação aguda ou crônica, dependendo do grau de exposição à substância. Um indivíduo agudamente intoxicado por qualquer inibidor de acetilcolinesterase pode morrer, pela super estimulação de seu sistema nervoso, convulsões e parada respiratória (TÕUGU, 2001).

2.2 Pesticidas – Organofosforados e Carbamatos

A Lei nº 7.802 de 11.07.89 define: “Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos 24 setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantada, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes estimuladores e inibidores do crescimento” (BRASIL, 1989). Os pesticidas ditos como substâncias com ação tóxica incluem os, herbicidas, inseticidas, acaricidas, fugicidas, nematocidas e rodenticidas, que tem como ingredientes ativos compostos químicos formulados para prevenir, combater ou destruir espécies indesejáveis ou doenças que possam interferir na produção, no processamento, armazenamento e transporte dos alimentos, agro produtos, madeira e seus derivados.

Os organofosforados (OP) e carbamatos (CB) são as principais classes de pesticidas mais utilizadas no mundo para o controle de pragas e em campanhas de combate a vetores de doenças também conhecidos como inibidores da enzima Acetilcolinesterase, apresentam baixa solubilidade em água e são facilmente hidrolisáveis em ambientes alcalinos (WHO, 1986a ; 1986b). Os OPs são ésteres, amidas ou derivados tóxicos dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico ou fosfonotióico, enquanto as CBs são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico (Figura 4).

Figura 4. Fórmula estrutural dos Organofosforados (A) e Carbamatos (B)

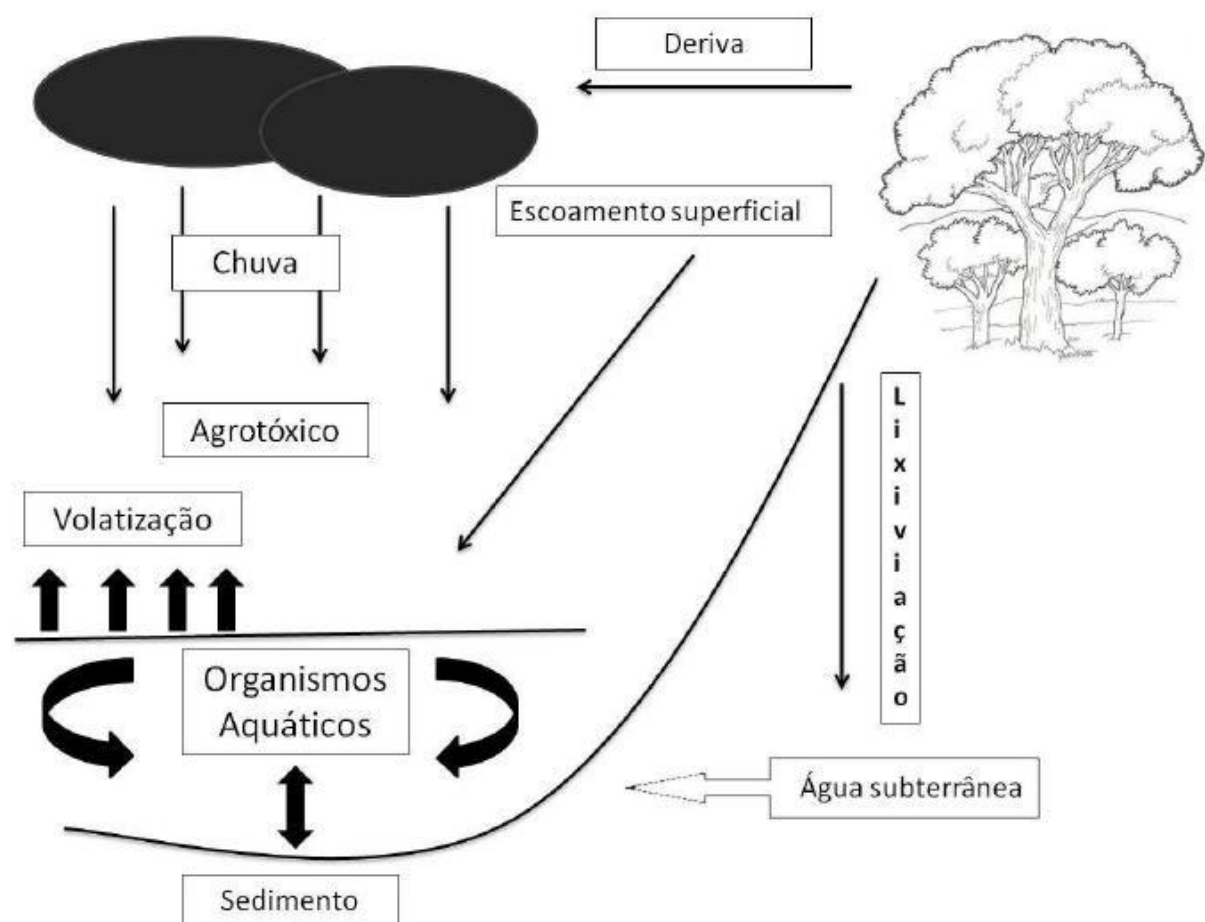


2.2.1 Toxicidade e mecanismo de ação

O uso de pesticidas ainda é a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento suficiente e de qualidade para a população (CALDAS; SOUZA, 2000). Mas, apenas 0,1% destas substâncias aplicadas atingem as pragas alvos, de forma que o restante desse material contendo o princípio ativo se espalha pelas imediações, contaminando ar e o solo (HART e PIMENTEL, 2002). Todos os pesticidas químicos apresentam em comum propriedade de bloquear processos metabólicos vitais nos organismos para os quais são tóxicos (BAIRD, 2002). Mesmo que empregados de modo correto, os pesticidas podem causar problemas de saúde pública ou ambiental. Uma possibilidade é a de causar desequilíbrio nos sistemas ecológicos, favorecendo o ataque de pragas desconhecidas, além do efeito indesejado em insetos polinizadores. Podem causar grande mortalidade de peixes e aves, que não são os alvos originalmente visados. Isto ocorre, pois os rios, lagos e mares são contaminados pelos pesticidas, que são levados pela lixiviação e pelo vento, a locais distantes do ponto de aplicação (Figura 5).

No prosseguimento da cadeia alimentar, os pesticidas chegam até aos alimentos e demais produtos de origem agroindustrial utilizado pelos homens. Particularmente pela alta toxicidade destes pesticidas em relação aos organismos aquáticos os recursos hídricos devem ser continuamente monitorados (BEAUVAIS et al., 2002).

Figura 5. Principais rotas dos pesticidas em ecossistemas aquáticos.



Fonte: Tomita e Beyruth, 2002.

Os organofosforados e carbamatos são absorvidos pelo organismo por via oral, respiratória e cutânea levando a um conjunto de sintomas característicos (Tabela 1). Alguns de seus metabólitos são capazes de provocar malformações congênitas, afetar a fertilidade e produzir efeitos genéticos tóxicos inclusive o câncer (WHO, 1986a, 1986b).

O mecanismo de ação inibitório destes pesticidas se dá através da ligação com o sítio ativo da acetilcolinesterase, através da fosforilação (organofosforado) e da carbamilação (carbamatos) (QUINN, 1987). A inibição por carbamato é reversível e a regeneração da enzima leva de alguns minutos a horas. Contudo, a inibição por organofosforados se não houver tratamento pode ser irreversível. Na inibição com os organofosforados há o envolvimento principalmente do sítio esterasico, formando um complexo bastante estável. Já a ligação do carbamato com a AChE é instável. Além disso a regeneração da enzima carbamilada é relativamente mais rápida em relação a enzima fosforilada pelos OPs pois, os carbamatos interagem mais com o sub- sítio aniônico, assim como os substratos, aumentando a possibilidade de hidrólise.

2.3 Metais pesados

Os metais pesados são substâncias quimicamente reativas e bioacumuláveis, ou seja, os organismos não são capazes de eliminá-las. Esses elementos ocorrem naturalmente em pequenas concentrações, na ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por trilhão (ppt), no meio ambiente e na matéria viva (OLIVEIRA, 2011). Alguns metais tomam parte do metabolismo fisiológico, sendo considerados essenciais por atuarem como componentes funcionais, estruturais e regulatórios de numerosas biomoléculas no metabolismo, podendo ser classificados como: potencialmente tóxicos (ex.: arsênio, cádmio, mercúrio, chumbo), provavelmente essenciais (ex.: níquel, vanádio, cobalto) e essenciais (ex.: cobre, zinco, ferro, manganês).

Esses elementos tóxicos mesmo em baixas concentrações, quando ingeridos durante um longo período de tempo (TUZEN, 2007). Os metais pesados podem ser encontrados em seu estado elementar, o que indica que não sofreram modificações, ou em forma de complexos. Estes últimos são espécies químicas não degradáveis, por isso, uma vez colocados no meio ambiente somente podem distribuir-se no ar, água, ou solo, às vezes mudando seu estado de oxidação ou incorporando-se aos seres vivos (VOLESKY, 2001). Essas substâncias não são biodegradáveis e desta forma tendem a se acumular nesses compartimentos onde manifestam sua toxicidade (NUNES et al., 2014). Por este motivo, os metais pesados são alvos de preocupação por parte dos programas de monitoramento e legislação ambiental (MANSOURI et al., 2012).

Tabela 1- Sinais e sintomas dos envenenamentos por inseticidas organofosforados

Local	Sinais e sintomas
Sistema Nervoso Central	Distúrbios do sono, dificuldades de concentração, comprometimento da memória, ansiedade, agitação, convulsões, tremores, depressão respiratória, coma.
Sistema Nervoso Autônomo (efeitos muscarínicos)	No aparelho digestivo: perda de apetite, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, defecação involuntária. No aparelho respiratório: secreção bronquiolar, edema pulmonar. No sistema circulatório: bradicardia, bloqueio aurículo-ventricular. No sistema ocular: visão enfraquecida, pupilas puntiformes. No aparelho urinário: diurese freqüente e involuntária. Glândulas exócrinas: transpiração excessiva.
Sistema somático (efeitos nicotínicos)	Contração involuntária dos músculos, câibras, enfraquecimento muscular generalizado.

Fonte: Larini (1999)

No Brasil, a resolução 357/2005 do CONAMA no Ministério do Meio Ambiente e a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelecem limites máximos desses metais tóxicos em água superficial e água de consumo humano respectivamente. Entretanto, ainda não se exige a determinação das espécies químicas, relevante à biodisponibilidade produzida nas diferentes matrizes, nem sobre os efeitos subletais, avaliados pelos biomarcadores, destes metais nos organismos aquáticos. Por outro lado, a Resolução Conama 421/2010 relacionada ao material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras dispõe sobre as análises de metais em material oriundo do sedimento (sedimentos totais, ou suas frações - elutriado, água intersticial, interface água-sedimento) e recomenda a realização de ensaios ecotoxicológicos como complementar as análises físico-químicas.

A toxicidade dos metais pesados é muito alta. Sua ação direta sobre os seres vivos acontece através do bloqueio de atividades biológicas especificamente pela inativação

enzimática devido à formação de ligações entre o metal e alguns grupos funcionais das proteínas, causando danos irreversíveis em diversos organismos (VULLO, 2003).

2.4 Canal de Santa Cruz

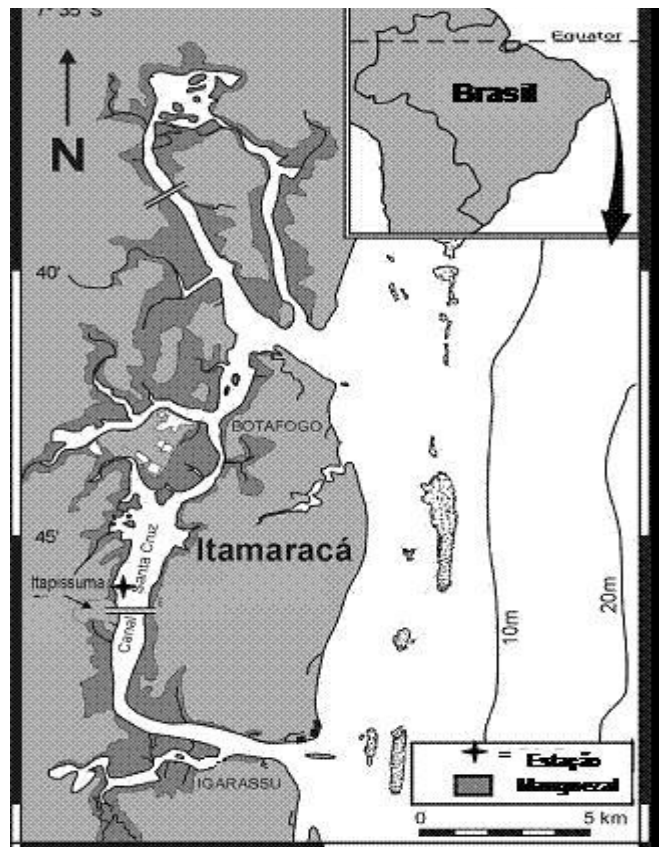
Os ambientes estuarinos são regiões costeiras semi-fechadas nas desembocaduras dos rios, sujeitas aos aportes dos rios e do fluxo marinho. Os nutrientes transportados pelos rios e a rápida troca entre as águas de superfície e sedimentos contribuem para uma produtividade biológica extremamente alta, sendo considerado um dos ecossistemas mais produtivos da Terra. Essa alta produtividade resulta da regeneração rápida e local dos nutrientes bem como dos aportes destes pelos rios e marés. Sua importância se estende aos ecossistemas marinhos através da sua exportação líquida de matéria orgânica, organismos e detritos particulados e dissolvidos (RICKLEFS, 2003).

O canal de Santa Cruz é centro do sistema estuarino de Itamaracá considerado um braço de mar em forma de “U” com extensão de 22 km, que separa a Ilha de Itamaracá do continente e está localizado a cerca de 50 km ao norte de Recife, Pernambuco (FLORES MONTES, 1996). Entre as latitudes 7° 34’ S e 7°55’ S e longitudes 34° 49’ W e 34° 52’ W (Figura 6). O estuário ocupa uma área de 877 Km², com uma largura máxima de 1,5 Km. Sua profundidade é entre 4 e 5 metros, aproximadamente. Com maiores profundidades na parte norte. A penetração de água oceânica se dá ao Norte pela Barra de Catuama e ao Sul pela Barra Sul, onde se encontra a coroa do Avião. Desembocam no Canal um conjunto de rios e riachos, sendo os principais rios: Itapessoca, Carrapicho, Itapirema, Arataca, Riacho Jardim, Palmeira, Botafogo, Cumbe, Catuá, Itapicuru, Tabatinga, conga, Bonança, Utinga e Igarassu. . Isto faz com que o Canal de Santa Cruz englobe um conjunto de pequenos estuários.

Distingue-se na área duas estações pluviométricas: uma seca, compreendida entre os meses de setembro a janeiro, com precipitações média abaixo de 100 mm, e outra chuvosa, compreendida entre fevereiro a agosto, com precipitação de aproximadamente 400 mm. As características hidrológicas do Canal de Santa Cruz, variam com a época do ano e com as condições meteorológicas locais (MARA, 1992). De maneira geral, no período chuvoso, grande quantidade de água doce, proveniente dos rios adjacentes, penetram no Canal, alterando a salinidade, temperatura, transparência, oxigênio dissolvido e pH (para menos) e elevando os valores de sais nutrientes: nitritos, nitratos e fosfatos (MACÊDO et al, 1998).

O sistema estuarino de Itamaracá pode ser classificado segundo Medeiros & Kjerfve (1993), como tipo estuário-lagoa (tipo1), por apresentar um fluxo líquido de águas dirigidas para o mar (da superfície ao fundo) e um transporte de sais predominantemente à montante, dominado por processos difusivos. O fundo do Canal apresenta areia de quartzo que forma bancos, principalmente nas barras Norte e Sul, sendo que na região mais próxima ao rio Congo, a lama é escura, redutora e mais densa. As margens lamacentas do Canal são ocupadas por manguezal, com uma vegetação representada pelas espécies: *Rhizophora mangle* “mangue-vermelho”, *Laguncularia racemosa* “mangue-branco”, *Avicennia shuaeriana* “mangue-siriuba” e *Conocarpus erectus* “mangue-botão”(KEMPF,1970).

Figura 6. Área estudada, sistema estuarino de Itamaracá, PE- Brasil.



2.5. *Crassostrea rhizophorae* – Ostra do mangue

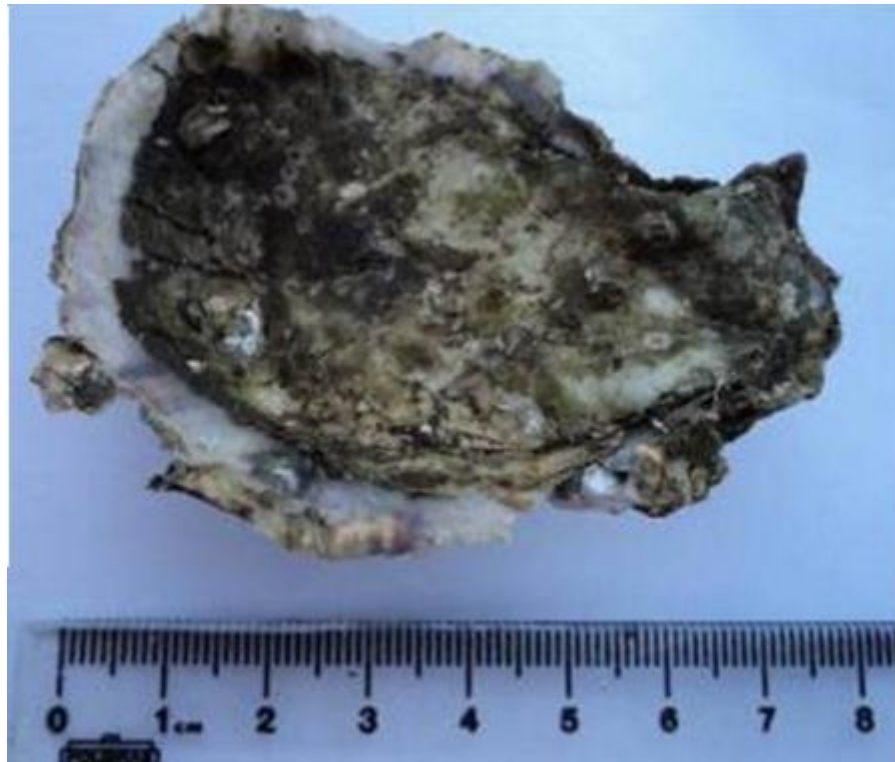
A ostra-do-mangue, *C. rhizophorae* (Figura 7), também conhecida como ostra nativa, pertencente ao reino Animalia, filo Molusca, classe Bivalvia, ordem Ostroidea, família Ostreidae, Gênero *Crassostrea*. Habita regiões costeiras e pode ser encontrada fixa às raízes aéreas das vegetações de mangue, ocorrendo também na faixa entre marés dos costões rochosos ou em bancos submersos (QUEIROZ; JÚNIOR, 1990).

São animais dióicos e ovíparos, mas não apresenta dimorfismo sexual. São filtradores, com capacidade de filtração em torno de 90 a 100 litros de água do mar por dia (CASASBELLAS, 1991). A regulação da taxa de filtração é influenciada, não só pela concentração de partículas, mas também em função do seu tamanho. As partículas podem ser rejeitadas, refluídas pela parte posterior direita das brânquias (na forma de pseudofezes) ou filtradas nas brânquias. Pela ação dos cílios branquiais, estas são conduzidas aos palpos labiais, onde são selecionadas de acordo com o seu tamanho e levadas à boca, digeridas no estômago e absorvidas no intestino, sendo o material rejeitado (fezes) expulso pelo ânus (COSTA, 1985; BORGES, 1989).

Estudos realizados por (SPITTLER et al. 1989) demonstraram que as ostras *C. rhizophorae* podem ingerir partículas de vários tamanhos, desde muito pequenas (menores de 1 μm) até partículas com 98 μm . Os bivalves possuem habilidade limitada para metabolizar agentes como bactérias e metais pesados, por apresentarem processo de digestão restrito a uma concentração limite do alimento disponível (OSTINI E GELLI, 1994).

Alterações nas condições físicas e químicas do meio podem causar a mobilização de alguns elementos como os metais depositados nos sedimentos e a liberação de formas mais biodisponíveis para a coluna d'água, favorecendo assim a assimilação destes pela biota, podendo atingir a ostra mediante processos de bioacumulação, e biomagnificação. Estes elementos podem interferir no metabolismo da ostra, na redução do seu crescimento e desenvolvimento provocando danos ao sistema nervoso.

Figura 7. Foto de *Crassostrea rhizophorae*



Fonte: acervo pessoal

Estes moluscos destacam-se por serem organismos sésseis, eurihalinos, osmoconformadores, resistentes a variações ambientais e abundantes com ampla distribuição ao longo a costa e estuários em diferentes latitudes. Como são organismos filtradores, podem acumular em seus tecidos uma grande variedade de compostos químicos como metais pesados e microrganismos presentes na água do mar (VIEIRA et al., 2004). Além de poderem ser veículos ou agentes de doenças parasíticas, bacterianas e virais. Autores sugerem a utilização destes animais bivalves para estudos da contaminação aquática (BAINY et al., 2000; CHEUNG et al., 2001; GOWLAND et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar a enzima Acetilcolinesterase do tecido branquial e visceral da ostra *Crassostrea rhizophorae* coletadas no complexo estuarino Canal de Santa Cruz no litoral do Estado de Pernambuco - Brasil.

3.2 Específicos

- ✓ Definir as propriedades físico-química da acetilcolinesterase presente nas brânquias e vísceras de *C. rhizophorae*;
- ✓ Definir a velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis - Menten (K_m) da AChE de *C. rhizophorae*
- ✓ Analisar o efeito de pesticidas (organofosforado e carbamato) sobre a atividade da enzima em estudo;
- ✓ Analisar o efeito de íons sobre a atividade da AChE;
- ✓ Calcular a constante de inibição (K_i), o IC20 e o IC50 dos pesticidas e íons que apresentarem inibição significativa.

4. REFERÊNCIAS

ACETYLCHOLINESTERASE. **Official website of Aceylcholinesterase**. 2015.

ASMUS, M. L. **Análise e Usos do Sistema Estuário da Lagoa dos Patos**. In: Simpósio Brasileiro de Oceanografia 3. São Paulo, 2006.

ASSIS, C.R.D. **Efeito do diclorvós sobre a acetilcolinesterase em juvenis de tambaqui, *Collossoma macropomum* (cuvier, 1818)**. Monografia da especialização em Gestão e Controle Ambiental. Universidade de Pernambuco, Recife 2005.

BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**. v. 50, p. 411-416, 2000.

BAINY, A.C.D. *et al* . In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Revista Biotemas**, v. 19, 2006

BAIRD C. Química Ambiental. 2.ed. Porto Alegre, **Bookman**, 622p, 2002

BEAUVAIS. S . L.; COLE. K. J.; ATCHISON. G. J; COFFEY. M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Water, Air, and Soil Pollution**. v.135.p 249-264. 2002.

BORGES, M. T. M. **Sobre a nutrição de Moluscos Bivalves em cultura controlada, com especial referência aos aspectos qualitativos**. Séries Monografias: Instituto de Zoologia Dr. Augusto Nobre. Universidade do Porto, Portugal, 1989.

BRASIL, Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre o tratamento de embalagens e resíduos de agrotóxicos e dá outros tratamentos**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil/03/Leis/17802.htm> . Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pública**, v.34, n 5, p. 529-37, 2000.

CASASBELLAS, M.A.C. Depuración de Moluscos, Xunta de Galicia, v. 18, p.60, 1991.

CHEMISTRY. gatech. **Official website of Chemistry gatech**. 2015.

CHEUNG, C.C.C.; ZHENG, G.J.; LI A.M.Y.; RICHARDSON, B.J.; LAM, P.K.S. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidant responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**. v. 52, p.198-203, 2001

CHRISTO, S.W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo**. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Ciências, área de concentração Zoologia), Universidade Federal do Paraná, 146 p., 2006.

COSTA, P. F. **Biologia e tecnologia para o cultivo de ostras**. In: Brasil. Ministério da Marinha. Instituto Nacional de Estudos do Mar, Manual de Maricultura. Rio de Janeiro, cap. VIII, parte B, 36 p., 1985.

FERNANDES, C., Fontainhas-Fernandes, A, Cabral, D., & Salgado, M. A. **Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz-Paramosn lagoon, Portugal**. Environmental Monitoring and Assessment, 136 (1-3), 267-275, 2008

FLORES MONTES, M. J. **Variação nictemeral do fitoplâncton e parâmetros hidrológicos no canal de Santa Cruz, Itamaracá, PE**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia. Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996

GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B. **Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliana* de manguezais do estuário de Cananéia-SP**. Boletim do Instituto de Pesca, v.26, n.2, p.147-162, 2000

GOWLAND, B.T.G.; McINTOSH, A.D.; DAVIES, I.M.; MOFFAT, C.F.; WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**. v. 54, p. 231-235, 2002

HART, K. A.; PIMENTEL, D. Environmental and economic costs of pesticide use. In: **Enciclopedia of Pest Management**. Pimentel D. ed.; Marcel Dekker: New York, NY, 237-239, 2002.

KEMPF, M. **Nota preliminar sobre os fundos costeiros da região de Itamaracá (Norte do Estado de Pernambuco, Brasil)**. Trabalhos oceanograficos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, v.9 p. 95-111, 1970.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo. Editora Manole. 230, p. 1999

LEVINTON, J.S. 2001. **Marine biology -function, biodiversity and ecology**. Oxford: University Press Inc., 420p

MACÊDO, S. J.; FLORES MONTES, M. J. ; KOENING, M. L.; LINS, I. C. **Phytoplankton Nyctemeral Variation at the Santa Cruz Channel, Itamaracá- Pernambuco, Brazil**. Anais Acad. Bras., Rio de Janeiro, v. 70 p. 857-871, 1998.

MACEDO, S. J.; MONTES, M. J. E.; LINS, I. C. "**Características abióticas da área**". In BARROS, H. M.; ESKINAZI-LEÇA, E; MACEDO, S. J. & LIMA, T. (eds.) Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Recife: Editora Universitária, p. 7-25, 2000

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233711412425>

MARA (**Ministerio de Agricultura e Reforma Agraria**) Normal Climatologia. Estação Curado,. Climate tables. Dept Nac de Meteorologia, Centro Regional de Meteorologia e Climatologia de Recife, Brazil, 1992.

MEDEIROS, C. & Kjerfve, B. Hydrology of a Tropical Estuarine System: Itamaracá, Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. V. 36 p. 495-515, 1993.

NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVES, F., 2014. Combination effects of anticholinesterases in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. **Environ Sci Pollut Res** 21:6258–6262, 2014.

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

OSTINI, S. GELLI, V. **Manual técnico de mitilicultura**. Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo. São Paulo: SAASP, 1994.

QUEIROZ, C.; JÚNIOR, N.S. **Cultivo de ostras**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Ed. ACARESC. 1990

QUINN, D. M.. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. **Chemical Reviews**, V. 87, p. 955-979, 1987.

RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. Ed. Fundação Universidade do Rio Grande. Rio Grande. 492p, 1994.

Sedmak J.J. & Grossberg S.E. (1977) A rapid sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, 79, 544-552.

SNEDAKER, S.C. **Oil spill in mangrove**. Boletim de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales, v. 143, p. 423-442, 1985.

SPITTLER, P.; CRUZ, A.; RODRIGUEZ, J. La selección del tamaño de las partículas por el ostión *Crassostrea rhizophorae*. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 10 p. 63, 1989.

STENESH, J. 1998 Plenum .In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR), **Biochemistry** 1998.

TOMITA, R, Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de ambientes aquáticos. **O Biológico**, V. 64, 135-142, 2002.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents**, v.1, p.155-170, 2001.

TUZEN, M.; SOYLAK, M. Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey. **Food Chemistry**, v.101, p.1378-1382, 2007

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. São Paulo, Varela, 47p. 2004.

VULLO, D.L.; Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente, **Química Viva**, v. 2, n. 3, 2003.

VOLESKY, B.; Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 203-216, 2001.

WHO.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria** 63, Ginebra, 1986a.

WHO.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbamate pesticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria** 64, Ginebra, 1986b.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Caracterização da Acetilcolinesterase do tecido de ostra *Crassostrea rhizophorae* e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade

Este artigo será submetido á revista internacional Aquatic Toxicology



Qualis: A1

ISSN: 0166-445x

Fator de Impacto: 3.333

Caracterização da Acetilcolinesterase do tecido de ostra *Crassostrea rhizophorae* e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade

Paula Rayane de Souza, Kelma Sirleide de Souza, Caio Rodrigo Dias Assis, Ranilson de Souza Bezerra.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor correspondente:

Ranilson de Souza Bezerra.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco,

50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil

Tel.: + 55 81 21268540;

Fax: + 55 81 21268576.

E-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

Esta contribuição objetivou caracterizar parcialmente parâmetros cinéticos e físico - químicos da acetilcolinesterase presentes nos tecidos de *Crassostrea rhizophorae* e investigar o efeito *in vitro* de pesticidas e íons metálicos sobre sua atividade a fim de avaliar seu potencial como biomarcador. O pH ótimo encontrado foi de 8,0 e 8,5 para a acetilcolinesterase de brânquias e vísceras, respectivamente. A temperatura ótima de 70°C para AChE branquial e 75°C para AChE visceral. A enzima apresentou ser estável até 100°C nos dois tecidos. Os parâmetros cinéticos de V_{max} em brânquias e vísceras foi de 18.169 ± 0.52 mU/mg e 12.139 ± 0.31 mU/mg, respectivamente. O valor de K_m 0.502 ± 0.05 mM para as brânquias e 0.255 ± 0.04 mM para vísceras. Todos os pesticidas usados mostraram efeito inibitório na atividade da AChE apresentando decréscimo significativo. Os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+} em 0,1 mM inibiram a atividade nos dois tecidos de estudo, brânquias em 79%, 88%, 73%, 100%, 77% e 100% . E nas vísceras em 85%, 100%, 41%, 65%, 100% e 59% respectivamente. A AChE de brânquias da *C. rhizophorae* mostrou potencial biomarcador para o carbamato carbaril, e o íon Cu^{2+} . E a AChE de vísceras para o carbamato carbofuran. Sendo esta enzima, considerada uma ferramenta útil no monitoramento de toxicidade ambiental.

Palavras – chaves: Ostra do mangue. Acetilcolinesterase. Metais pesados e Pesticidas.

1. Introdução

A acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervoso que está presente nos sistemas nervosos central e periférico, promovendo a hidrólise da ACh nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas. É a enzima mais eficiente em hidrolisar ésteres de colina e sua eficiência catalítica bem como sua alta reatividade com vários inibidores covalentes e não covalentes são determinadas pela arquitetura funcional única do seu sítio ativo (Matos, 2012).

A inibição do seu mecanismo ocorre devido aos efeitos da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos, bem como a íons metálicos e resulta em acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica gerando uma hiper-estimulação colinérgica (Nunes et al., 2014). A inibição por metais se dá pela ligação dos metais a enzima que ocorre através de ligações com grupamentos tióis proteicos, alterando de maneira irreversível o estado de hidratação do sítio ativo (Marques et al., 2011). Já a inibição do pesticida se dá pela interação com o sítio esterásico da AChE, diferindo apenas no tipo de ligação – fosforilação para organofosforado e carbamilação para carbamatos, impedindo a ligação do substrato (Assis et al., 2011).

Estes poluentes apresentam alta toxicidade, não se degradam de forma natural e acumulam-se nos tecidos vivos, causando vários distúrbios e doenças (Ibrahim et al., 2010). Nos animais, os metais pesados tóxicos atuam em reações altamente específicas, enzimáticas em sua maioria, e alterações no sistema que envolve essas reações, resultando em efeitos negativos. Monitorar e controlar a presença destas substâncias no meio ambiente é necessário uma vez que esses compostos têm se tornado um problema de saúde humana e ambiental (Assis et al., 2010).

A ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* também conhecida como ostra nativa é um molusco bivalve considerada um excelente bioindicador de contaminação aquática devido as suas características, tais como: o hábito sésil, filtrador, cosmopolita, abundante e resistente a variações ambientais. Desta forma a análise dos efeitos biológicos dos poluentes que contaminam o ambiente estuarino pode ser realizada a partir do estudo de biomarcadores bioquímicos, como as enzimas, que apresentam um alto grau de especificidade e rapidez na resposta as alterações da substância alvo (Vieira *et al.*, 2004). Este bivalve apresenta uma capacidade de filtração em torno de 90 à 100 L de água por dia (Casasbellas, 1991). A regulação da taxa de filtração é influenciada, não só pela concentração de partículas, mas também em função do seu tamanho. As partículas podem ser rejeitadas, refluídas pela parte

posterior direita das brânquias ou filtradas nas brânquias. Pela ação dos cílios branquiais, estas são conduzidas aos palpos labiais, onde são selecionadas de acordo com o seu tamanho e levadas à boca, digeridas no estômago e absorvidas no intestino (Borges, 1989).

Como a estrutura da acetilcolinesterase apresenta variações inter e intraespecíficas, naturais e mutagênicas, é justificável a necessidade de caracterizar a sua atividade em diversas espécies, bem como também verificar sua sensibilidade a alguns compostos. Por isso, a relevância deste estudo com a espécie *Crassostrea rhizophorae* considerada uma importante bioindicadora de contaminação ambiental.

2. Materiais e métodos

2.1. Coletas dos espécimes e extração enzimática

Ostras foram coletadas em Vila Velha no complexo estuarino do canal de Santa Cruz localizado no litoral Norte de Pernambucano. Foram coletadas 80 ostras, de mesmo tamanho (comprimento de concha $\pm$ 4cm) no período seco (verão). Estes espécimes foram encaminhados para o Laboratório de Enzimologia (LABENZ) no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em temperatura ambiente onde foram abertas as valvas e extraídos órgãos, separando vísceras e brânquias. E feita a homogeneização em tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,0, em uma concentração de 200 mg de tecido/mL de tampão com posterior centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C para a remoção de restos celulares. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes intitulados como extratos brutos.

2.2 Atividade de Acetilcolinesterase e dosagem protéica

Foram determinadas segundo (Ellman et al. 1961), ensaio feito em quadruplicata. A atividade foi realizada incubando em microplaca 20 μ L do sobrenadante adicionado 200 μ L de reagente cromogênico DTNB 0,25 mM e 20 μ L dos substratos acetilcolina (62 mM) adicionadas imediatamente antes da leitura a 405 nm em um tempo de 180 segundos. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de substrato por minuto. O teor de proteína foi estimada de acordo com (Sedmack e Grossberg 1978).

2.3. Parâmetros cinéticos

A Constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram estimadas por ensaio da atividade enzimática em concentrações crescentes de acetilcolina (0,8 - 20,8 mM de concentração final). As atividades foram ajustadas a uma regressão não linear, utilizando o software MicroCal™ Origin® Versão 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, EUA).

2.4. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros analisados foram pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica. O pH ótimo foi determinado ensaiando a atividade da enzima por 180s em uma faixa de pH que variou de 4,0 - 9,5 utilizando os tampões: citrato-fosfato (4,0 - 7,5) , Tris-HCl (7,2 – 8,7) e NaOH- Glicina (9,0 – 9,5) e mensurada a absorbância em espectrofotômetro de microplaca (xMark™ BIORAD) a 405 nm. A temperatura ótima e a estabilidade da acetilcolinesterase foram avaliadas perante diferentes temperaturas que variaram de 25° a 100°C, com intervalos de 5°C. O perfil da atividade proteolítica frente a variação de temperatura foi avaliado em 180 segundos. No ensaio de estabilidade térmica para cada temperatura avaliada, a amostra foi incubada por 30 minutos em banho maria e em seguida a atividade foi mensurada após 15 minutos a 25°C (temperatura ambiente).

2.5. Ensaio de inibição seletiva

As amostras foram submetidas aos inibidores BW284c51 (inibidor de AChE), brometo de neostigmina e eserina (inibidores de colinesterases totais) em cinco concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mM. O ensaio foi realizado em quadruplicata de acordo com (Silva et al., 2013), incubando-se em microplaca 10 µL do extrato bruto com 10 µL do inibidor. Em seguida 200 µL de DTNB (0,25 mM) foi adicionado e a reação iniciada após a adição de 20 µL de substrato acetilcolina (62 mM). A absorbância foi seguida a 405 nm por 180s e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência do inibidor como atividade de 100%. Os inibidores foram incubados com o extrato bruto 10 µL e 10 µL de

inibidor durante 1 h adicionado 200 μ L de DTNB (0,25 mM) e 20 μ L de substrato acetilcolina (62 mM) .

2.6. Ensaio com íons metálicos

Foram determinados segundo (Bocquené *et al.*, 1990) em quadruplicata a atividade de AChE ensaiada na presença de íons: Hg^{2+} (HgCl_2), Zn^{2+} (ZnCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Cu^{2+} (CuCl_2) Cd^{2+} (CdCl_2), Mn^{2+} (MnCl_2), Mg^{2+} (MgCl_2) Ca^{2+} (CaCl_2), K^{+} (KCl), Al^{3+} (AlCl_3) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10mM. A atividade da enzima foi realizada incubando em microplaca 10 μ L de sobrenadante e 10 μ L de íon, após 40 minutos a temperatura ambiente, foi colocado 200 μ L de reagente cromogênico DTNB (0,25 mM) e 20 μ L do substrato acetilcolina (62 mM) adicionado imediatamente antes da leitura a 405 nm em um tempo de 180 segundos. As respectivas atividades residuais foram determinadas considerando na ausência de inibidores como atividade de 100%.

2.7. Ensaio com pesticidas

Os extratos foram incubados durante 60 min a 25°C com pesticidas organofosforado (diclorvós) e carbamatos (carbaril e carbofuran). Os inseticidas foram primeiro dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluídos em água destilada para cinco concentrações finais que variaram de 0,001 a 10 mM, com cada subsequente concentração 10 vezes maior do que a concentração anterior. A incubação foi realizada de acordo com (Assis et al 2010) e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência de pesticidas como a atividade de 100%. Estes dados foram analisados estatisticamente através de regressão não-linear por meio do decaimento polinomial ou exponencial ($p > 0,05$) utilizando o software Microcal Origin versão 8.0.

2.8. Estimativa de IC50, IC20 e Ki

A concentração capaz de inibir 50% e 20% a atividade da enzima (IC50 e IC20, respectivamente) foi estimada para cada inibidor (pesticida ou íon). Estes dados foram

necessários para calcular a constante de inibição (K_i), utilizando a equação de (Cheng e Prusoff 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_m}$$

Em que $[S]$ corresponde a concentração de substrato.

3. Resultados

A enzima AChE nos tecidos brânquiais e viscerais apresentou atividade específica de 15,6 e 10,5 mU/mg respectivamente (figura 1). Os parâmetros cinéticos, velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m), foram analisados utilizando o substrato iodeto de acetilcolina em diferentes concentrações (0,8 - 20,8 mM). A velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise de acetiltiocolina encontrada em brânquias e vísceras para a *Crassostrea rhizophorae* foi de 18.169 ± 0.52 mU/mg e 12.139 ± 0.31 mU/mg, respectivamente. O valor de K_m que representa a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima da reação foi 0.502 ± 0.05 mM para as brânquias e 0.255 ± 0.04 mM para vísceras. Estes valores são comparados aos reportados na literatura para espécies de *C. rhizophorae*, outros moluscos e de peixe (Tabela 1).

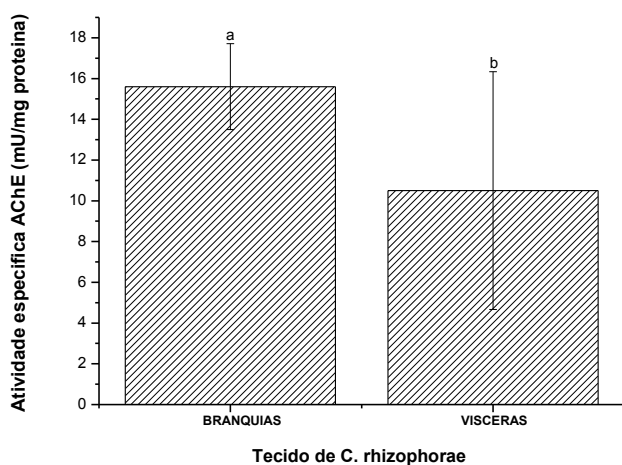
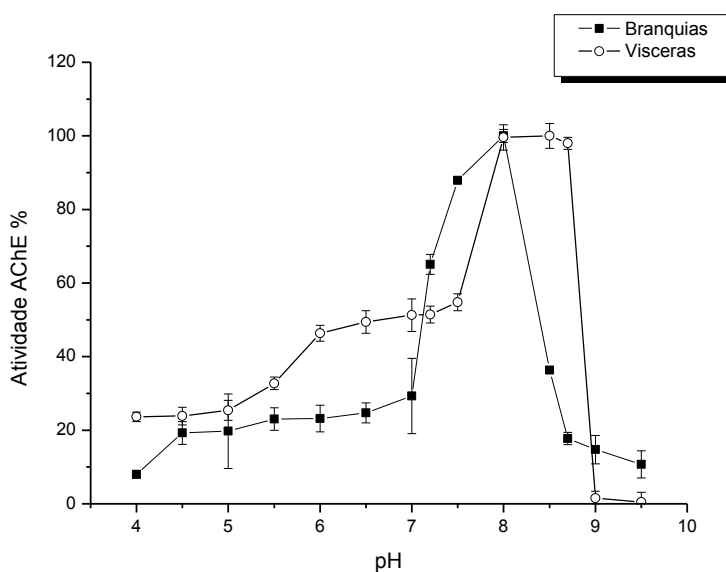


Figura 1 - Atividade de AChE em Brânquias e Vísceras de *C. rhizophorae*.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de AChE em diferentes tecidos e espécies.

Espécie	K_m (mM)	V_{max} (U/mg proteína)	Tecido	Referência
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$0,255 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,31$	Vísceras	Presente estudo
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$0,502 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,52$	Brânquias	Presente estudo
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$0,04 \pm 0,003$	$1,92 \pm 0,04$	Brânquias	Montserrat et al. 2002
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$3,08 \pm 0,604$	$1,62 \pm 1,07$	Músculo adutor	Domingos, 2007
<i>Cerastoderma edule</i>	$5,57 \pm 2,68$	$2,54 \pm 0,48$	Musculo adutor	Nilin, 2012
<i>Cichla ocellaris</i>	$0,769 \pm 0,27$	$0,189 \pm 0,04$	Cérebro	Silva, 2013
<i>R. canadum</i>	$0,430 \pm 0,14$	$243,2 \pm 20,5$	Cérebro	Assis, 2014

O pH ótimo encontrado para AChE de brânquias e vísceras em *C. rhizophorae* foi de 8,0 e 8,5, respectivamente (Figura 2). Para a temperatura ótima é visto que a atividade da enzima foi máxima em 70°C nas brânquias e 75°C no tecido visceral (Figura 3). A AChE nos dois tecidos mostrou-se termoe estável até 100°C por 30 minutos (Figura 4).

**Figura 2-** Efeito de pH (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *C. rhizophorae*

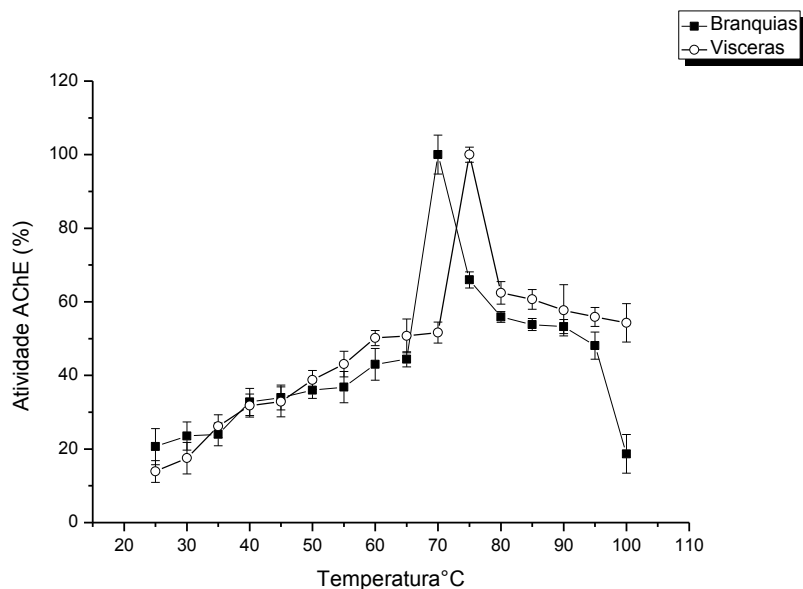


Figura 3- Temperatura ótima (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *C.rhizophorae*

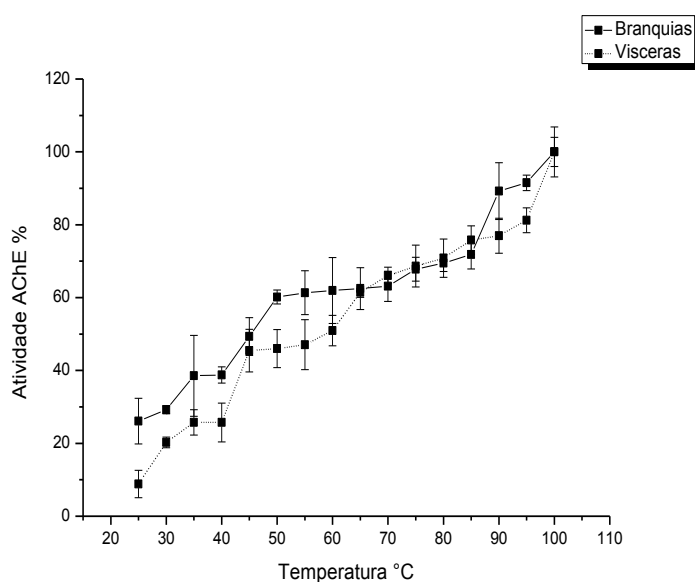


Figura 4- Estabilidade térmica (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *C.rhizophorae*

A atividade de AChE dos tecidos em estudo da *Crassostrea rhizophorae* foi abruptamente reduzida na presença do inibidor específico e BW284c51 confirmando a presença de AChE em brânquias e vísceras (Figura 5A e 5B). Inibição significativa também foi observada na presença dos inibidores de colinesterases totais neostigmina e eserina (Figura 5C, 5D, 5E e 5F). Os valores de IC20 e da concentração inibitória média (IC50) destes inibidores são apresentados na tabela 2.

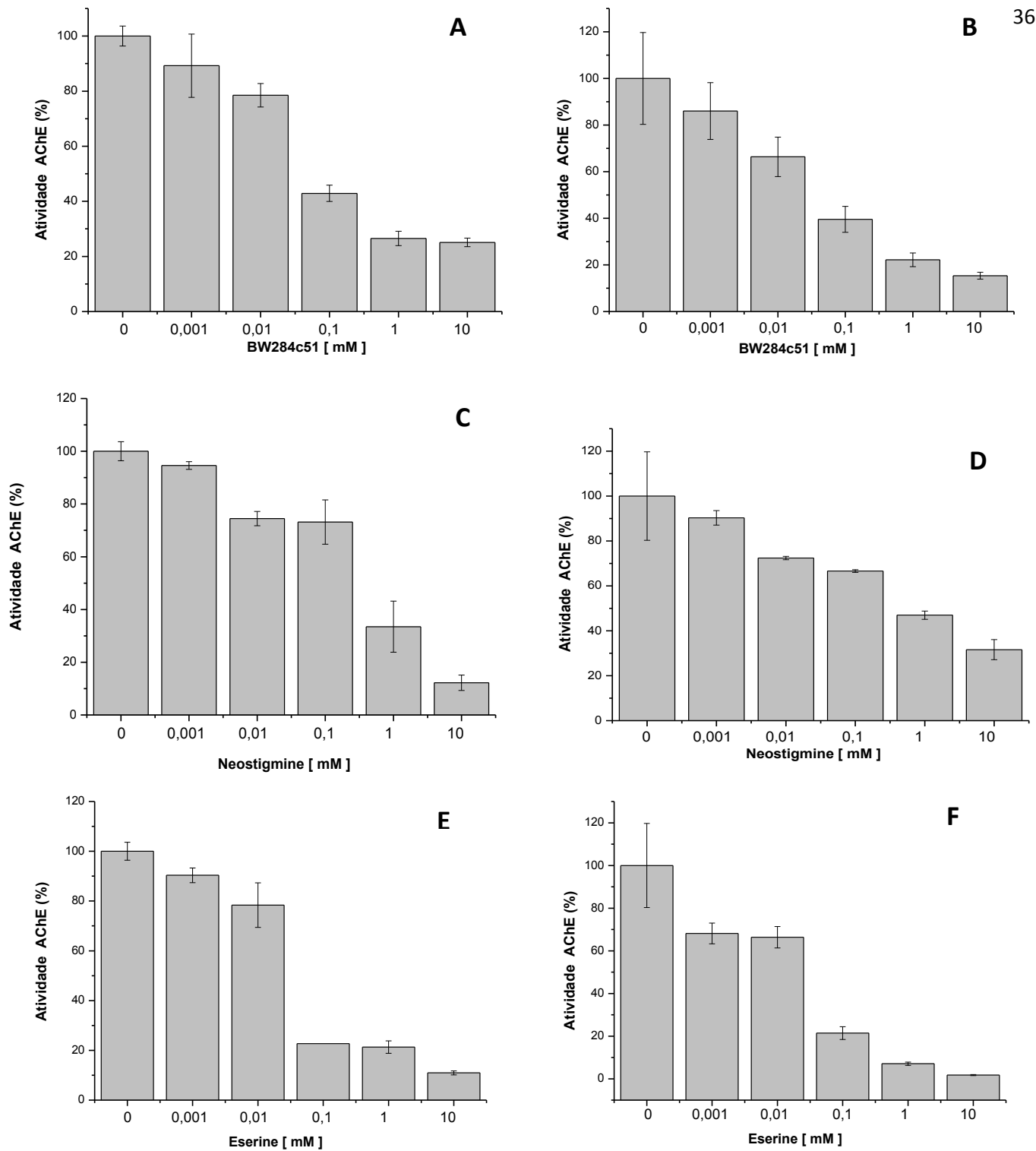


Figura 5- Atividade da AChE em *C. rhizophorae* em presença de concentrações crescentes (0-10 mM) dos inibidores seletivos: BW284c51 (A- Brânquias; B- Vísceras); neostigmine (C- Brânquias; D- Vísceras); eserine (E- Brânquias; F- Vísceras).

Tabela 2. Valores de IC₂₀ e IC₅₀ estimados para *C. rhizophorae* na presença de inibidores seletivos.

Inibidor	Brânquias		Visceras	
	IC ₂₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₂₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
BW284c51	8,5	61	0,8	13,8
Neostigmine	8,5	317	5,7	732
Eserine	3,6	42	0,3	4,4

Três íons (Fe^{2+} , K^+ e Ca^{2+}) em AChE de vísceras não mostraram efeito inibitório na concentração de 0,1mM. Enquanto Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+} inibiram a atividade nos dois tecidos de estudo, brânquias em 79%, 88%, 73%, 100%, 77% e 100% respectivamente. E nas vísceras em 85%, 100%, 41%, 65%, 100% e 59% quando submetidos a mesma concentração. Os valores de IC₂₀, IC₅₀ e Ki desses íons são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC₂₀, IC₅₀ e Ki estimados para AChE de *C. rhizophorae* na presença de alguns íons metálicos.

Íons	Brânquias			Visceras		
	IC ₂₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)	Ki (mM)	IC ₂₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)	Ki (μM)
Zn²⁺	0,00020	0,0012	$1,52 \times 10^{-5}$	0,00013	0,00029	$1,21 \times 10^{-6}$
Cu²⁺	0,00010	0,00012	$1,02 \times 10^{-6}$	0,00057	0,0057	$2,34 \times 10^{-5}$
Hg²⁺	0,0014	0,0015	$1,16 \times 10^{-5}$	0,0031	0,17	$7,00 \times 10^{-5}$
Mn²⁺	0,00019	0,00046	$3,71 \times 10^{-6}$	0,00036	0,00067	$2,78 \times 10^{-6}$
Ba²⁺	0,00016	0,00048	$3,93 \times 10^{-6}$	0,00010	0,00013	$5,37 \times 10^{-7}$
Al²⁺	0,00085	0,0010	$8,26 \times 10^{-6}$	0,00012	0,00016	$6,75 \times 10^{-7}$

Todos os pesticidas utilizados mostraram efeito inibitório sobre a atividade da acetilcolinesterase de brânquias e vísceras de *C. rhizophorae* (Figura 6). Os valores da concentração inibitória média dos pesticidas (IC₅₀) para brânquias e vísceras respectivamente, foram: 404 e 0,55 μM (diclorvos), 0,13 e 3,5 μM (carbaril), 155 e 0,41 μM (carbofuran). A Tabela 4 mostra além da constante de inibição (Ki) e IC₅₀, o IC₂₀ dos pesticidas em tecidos de *C. rhizophorae*, considerando que 20% de inibição da AChE é o ponto a partir do qual se considera a presença de um agente anticolinesterásico na amostra. De acordo com a Food and Agriculture Organization 20% é o percentual considerado prejudicial para o organismo. Sinais e sintomas aparecem acima de 50% de inibição e a morte ocorre após 90%.

Tabela 4. Valores de IC20, IC50 e Ki estimados para *C. rhizophorae* na presença de pesticidas organofosforado e carbamatos

Pesticida	Brânquias			Vísceras		
	IC20 (μM)	IC50 (μM)	Ki (μM)	IC20(μM)	IC50(μM)	Ki (μM)
Diclorvós	4,1	404	$3,2 \times 10^{-3}$	0,14	0,55	$2,25 \times 10^{-6}$
Carbofuran	0,63	155	$1,24 \times 10^{-3}$	0,15	0,41	$1,71 \times 10^{-6}$
Carbaril	0,10	0,13	$1,05 \times 10^{-6}$	0,17	3,5	$1,41 \times 10^{-5}$

4. Discussão

O uso de substrato e inibidor específico evidenciou a presença de AChE nos tecidos de brânquias e vísceras da *Crassostrea rhizophorae*. Quando comparado com resultados de trabalhos anteriores, um teor aparente foi encontrado, a atividade enzimática foi de 19,2 para brânquias em (Monserrat et al. 2002) e de aproximadamente 14,0 mU/mg nas vísceras em (Silva 2004). É relatado que atividade em brânquias foi significativamente maior em relação a vísceras, provavelmente porque este órgão é mais innervado (Almeida, 2002). Mas por outro lado é visto que a acetilcolinesterase encontrada em vísceras apresenta uma maior afinidade com o substrato acetilcolina, sendo que o k_m neste tecido foi de 0.255 ± 0.04 mM e o de brânquias 0.502 ± 0.05 mM.

A atividade proteolítica máxima para AChE de brânquias e vísceras foi observada em pH 8,0 e 8,5 respectivamente. Este resultado foi semelhante ao encontrado para AChE em vários trabalhos feitos com peixes, bem como para *Cichla ocellaris* de acordo com (Silva et al., 2013) para *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2010) que obtiveram maior atividade proteolítica em pH 8,0. E em moluscos no trabalho de (Bocqné et al., 1990) em que *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas* o pH 8,5 foi o que obteve uma maior atividade enzimática. Também no trabalho de (Bocqné, 1990) o *Mytilus edulis* foi o molusco que apresentou uma temperatura ótima para a reação enzimática de aproximadamente 50°C.

As temperaturas ótimas elevadas para a AChE de *C. rhizophorae* pode ser atribuído pelo fato desses animais viverem em ambientes quentes. Diversos estudos indicam que os periódicos ciclos de exposição de moluscos bivalves ao ar seguido de re-submersão na água do mar em virtude das oscilações nos níveis de maré, podem ser responsáveis por grandes

variações na fisiologia destes animais (Steffani & Branchi, 2003). Logo, a região nordeste é bastante quente e as ostras ou ficam expostas ao sol nas raízes das árvores ou submersas em uma pequena quantidade de água, e em outros momentos quando a maré está alta, a submersão estar em um nível maior de água. Nesta situação as ostras vivem em um ambiente que varia bastante de temperatura. Isto justifica o fato de apresentarem também enzimas termoestáveis em altas temperaturas.

Seis (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+}) dos onze íons avaliados neste trabalho apresentaram efeito inibitório na concentração de 0,1 mM nos tecidos branquiais e viscerais. A AChE dos dois tecidos apresentou sensibilidade relativamente acentuada a estes íons (Inibição $\geq 50\%$ em 0,1Mm) exceto Hg^{2+} na acetilcolinesterase de visceras. Cobre e zinco já são conhecidos como inibidores da AChE em (Bocquené et al., 1990; Olson e Christensen, 1980; Tomlinson et al., 1980). Vários relatos na literatura reportam inibição dos metais em espécies aquáticas tais como de 100% para *Electrophorus electricus* em (Tomlinson et al. 1980) na presença de Zn^{2+} e Cu^{2+} ; 71% para *Arapaima gigas* frente a Hg^{2+} e 60% para *Electrophorus electricus* com o íon Ba^{2+} em (Assis, 2011). Entretanto na presença dos íons K^+ e Ca^{2+} na concentração de 1 mM, houve uma ativação da enzima, fato relatado também no trabalho de (Assis, 2011) em *Colossoma macropomum*.

Os íons Mn^{2+} e Al^{2+} ; Cu^{2+} e Ba^{2+} 0,1 mM inibiram 100% a atividade da colinesterase em estudo, de brânquias e vísceras, respectivamente. Segundo (Jemec et al. 2007) alterações na atividade da AChE, quando exposta a concentrações de cobre, está relacionada a capacidade do metal em substituir o cofator da enzima, resultando na incapacidade de sua interação com o substrato, causando em inibição significativa. Estudos indicam que os altos níveis de Mn pode ser tóxico para os organismos terrestres e aquáticos, especialmente devido à suas propriedades neurotóxicas como cita, (Benedetto et al., 2009). Metais interferem na degradação da acetilcolina, importante neurotransmissor, o que resulta no acúmulo do substrato nas sinapses. Esse evento provoca alterações motoras que podem culminar na morte do indivíduo como especifica, (Vutukuru et al. 2006).

Neste trabalho, mais de 50% da AChE de *C. rhizophorae* de brânquias foi inibida frente a o íon Cu^{2+} em todas as concentrações da análise (0,001 - 10 Mm). Com isso pode-se afirmar que esta enzima é bastante sensível a ponto de ser inibida pelo íon Cobre em uma concentração muito baixa, comprovando a eficiência da enzima AChE das brânquias de *C. rhizophorae* em ser um biomarcador para este íon.

Dentre os pesticidas testados o carbamato carbaril foi o que apresentou mais forte efeito inibitório na AChE branquial e o carbofuran na AChE visceral de *C. rhizophorae*. Inseticidas carbamatos são inibidores diretos da AChE por carbamilação do sítio ativo e não requerem biotransformação, de modo que eles podem induzir efeitos tóxicos agudos mais rápido do que a maioria dos compostos organofosforados como relata, (Tham et al., 2009). Os valores de IC₂₀ e IC₅₀ dos pesticidas testados no presente estudo, para *C. rhizophorae*, estão abaixo dos limites de tolerância recomendados em regulamento nacional e internacional.

A Resolução nº 20/1986 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) recomenda um limite máximo de resíduo para organofosforados de 10 µg/L (0,45 µM) para águas das classes 1 e 2; 100 µg/L (4,5 µM) para a classe 3. O USEPA National Primary Drinking Water Standards (1984) prevê um limite máximo de 0,04 mg/L (aproximadamente 1,8 µM) para o carbamato carbofuran e 3,15 µM de carbamato carbaril. Os resultados deste estudo mostram que *C. rhizophorae* pode vir a apresentar efeitos deletérios significativos, devido a forte inibição da AChE em concentrações mais baixas do que as previstas em legislação vigente. Vale ressaltar que a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao penetrarem nos órgãos destes animais.

5. Conclusões

O uso de substratos e inibidores evidenciou a presença de AChE em brânquias e vísceras de *C. rhizophorae*. Todos os pesticidas deste estudo mostraram efeito inibitório sobre a atividade da AChE nos dois tecidos de *C. rhizophorae*, principalmente o carbamato carbaril na AChE de brânquias e carbofuran na AChE de vísceras. A maioria dos metais pesados demonstraram potencial para influenciar a atividade da AChE na concentração de 0,1 mM, principalmente o íon Cobre (Cu²⁺) na AChE de brânquias, podendo esta enzima ser um possível biomarcador para este íon.

Referências

Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Carvalho Jr., L.B., 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Stoytcheva, M. (Ed.), Pesticides in Modern World – Book 5. Intech, Rijeka, Croatia.

Assis, C.R.D., Castro, P.F., Amaral, I.P.G., Maciel Carvalho, E.V.M., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2010. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2243–2248.

Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Oliveira, V.M., França, R.C.P., Santos, J.F., Marcuschi, M., Carvalho, E.V.M., Bezerra, R.S., Carvalho Jr, L.B., 2014. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiol Biochem* DOI 10.1007

Assis, C.R.D.; Castro, P.F.; Amaral, I.P.G.; Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. 2007. Effect of diclofos on the acetylcholinesterase of tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain . v. 26, p. 1451–1453, 2007.

Benedetto, A., Au, C., and Aschner, M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: Insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chem. Rev.* v. 109, 4862–4884, 2009

Bocquene G, Roig A, Fournier D (1997) Cholinesterases from common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett* 407(3):261–266

Casasbellas, M.A.C. *Depuración de Moluscos*, Xunta de Galicia, v. 18, p.60, 1991

Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 22, 3099–3108.

Domingos, V., Azevedo, M., Silva, M.D. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. / *Environmental Research* .105 (2007) 350–363

FAO, Food and Agriculture Organization, 2007. Pesticides in Food Report 2007. FAO Plant Production and Protection Paper 191. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Hernandez, Y.Y., DIAZ, I. M., Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology* 19:819–825, 2010

Ibrahim, M. N. M. et al. A novel agricultural waste adsorbent for the removal of lead (II) ions from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182 n. 1-3, p. 377- 385, out. 2010.

Marques SM, Antunes SC, Nunes B, Gonçalves F, Pereira R., 2011. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology* 20:1315–1327.

MATOS, K.S. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos. – Lavras: UFLA, 2012. 148 p. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Monserat JM, Bianchini A, Bainy AC (2002) Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Environ* 54(3–5):781–785

Nilin, J. Biomarcadores em *cerastoderma edule* na avaliação da contaminação por mercúrio na ria de Aveiro, Portugal. Tese, Fortaleza, 2012.

Nunes, B., Barbosa, A.R., Antunes, S.C., Gonçalves, F., 2014. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environ Sci Pollut Res* (2014) 21:6258–6262.

SILVA, A. Z. Avaliação de biomarcadores bioquímicos na ostrado-Mangue (*crassostrea rhizophorae*) (mollusca:bivalvia) exposta a óleo diesel em diferentes salinidades. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

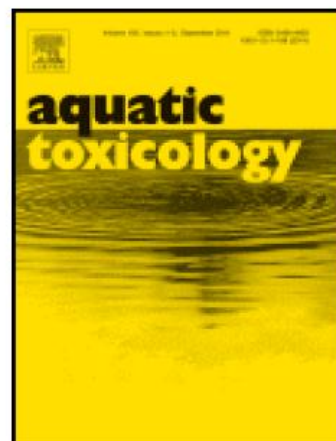
Silva, K.C.C.; Assis, C. R. D.; Oliveira, V. M.; Carvalho JR, L. B.; Bezerra, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013

Tham, L.G., Perumal, N., Syed, M.A., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y., 2009. Assessment of *Clarias batrachus* as a source of acetylcholinesterase (AChE) for the detection of insecticides. *Journal of Environmental Biology* 30, 135–138.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado. São Paulo, Varela, 47p. 2004.

6. ANEXO

6.1. Normas para redação de artigo científico - revista Aquatic Toxicology:



GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format'

for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles can be divided into three types:

- *Regular reviews* covering subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. These should generally not exceed 12 printed pages (approx. 6000 words).
- *Mini-reviews*. These will be short reviews or overviews (not exceeding 2-3 printed pages, approx. 1000-1500 words) on topics of above-average emerging interest.

- *Commentaries*. This label will be given to mini-reviews which clearly contain the personal opinions of the author concerned. All types of review articles will be solicited by the Reviews Editor, M. Celander, Dept. of Biological and Environmental Sciences, Gteborgs Universitet, BOX 463, SE 405 30, Gteborg, Sweden, Email: malin.celander@gu.se.

Short Communications will be restricted to papers describing short, complete studies with exceptional news value. A further requirement is that the study cannot easily be expanded to a full-length article. They should not exceed 3 printed pages, including figures and tables (approx. 1500 words), and should be written in a continuous style, without subdivisions of introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgements; they should always begin with a summary. A short communication, although brief, should be a complete and final publication, and figures and tables from the communication should not occur in a later paper. *Letters to the Editor* should either offer comment on a paper published in the journal, or comment on any general matter providing that this is relevant to the scope of the journal. In the case of letters commenting on published papers, the author(s) of the latter will be given the opportunity to react to the letter and the two items will subsequently be published together in the journal.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics*

of the World Medical Association

(Declaration of Helsinki) for animal experiments

<http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>

; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals*

<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm> . This must be stated at an appropriate point

in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also

<https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously

(except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an

electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for

more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal

Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal

circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution

outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations

(please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other

copyrighted works are

included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the

source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult

<https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive

License Agreement' (for more information see

<https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license

(see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 6

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more

information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or

preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in

the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to

submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should

be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit

<https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder

or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through

our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).

- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons

user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions,

adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective

work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long

as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article,

and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective

work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or

modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3700**, excluding taxes. Learn more about

Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green

open access options available. We recommend authors see our green open access page for further

information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts

immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This

is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated

changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo

period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver

value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public.

This is the

embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and

fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 7

Language services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have

their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is

difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission

please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqtox/>

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees (no gmail/ yahoo/rediff, etc.). For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Aquatic Toxicology has no page charges.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. However, the use of full journal names is encouraged. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier

at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements

needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and

Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in

your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has page numbers.

Figures and tables embedded in text

Figures and tables can either be placed next to the relevant text in the manuscript or at the bottom

(but not at the top) of the manuscript file, when all are included in a single file.

REVISED SUBMISSIONS

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 8

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an

editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting

codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in

a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check'

functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls*

(<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and

BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see

<https://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

Use this

numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be

given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature

survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be

indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 9

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often

presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or

convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings,

halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 10

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi

is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

- Supply files that are too low in resolution.

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or

MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit

usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear

in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation

of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure

itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but

explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the

relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in

accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be

sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results

described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 11

these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/aquatic-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins

for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style

or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book

title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination

must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be

applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted

at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should

be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first

alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al.

(2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if

necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by

the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci.

Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

[http://www.cancerresearchuk.org/](http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/)

[aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/](http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/) (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

If journal names are abbreviated, the abbreviations should follow the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 12 <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the

article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file.

For instructions please go to <https://www.elsevier.com/interactiveplots>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal

for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI

consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher

upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal

medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their

full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the

journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/aqtox 13

