UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

FILIPE JOAQUIM GONÇALVES

UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Crato-CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

FILIPE JOAQUIM GONÇALVES

UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito final para obtenção do Título de Mestre Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Cláudia Castro de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Alixandre Ávila Rodrigues

Crato-CE

2026

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

Gonçalves, Filipe Joaquim

G635u UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS / Filipe Joaquim Gonçalves. Crato-CE, 2026.

67p. il.

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Lígia Cláudia Castro de Oliveira

Coorientador(a): Prof. Dr. Francisco Alixandre Ávila Rodrigues

1.AChE, 2.Biomonitoramento, 3.Contaminação Aquática, 4.CLAE, 5.Contaminação Ambiental; I.Título.

CDD: 571.95

FILIPE JOAQUIM GONÇALVES

UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito necessário para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica

Dissertação defendida e aprovada em: 06 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lígia Cláudia Castro de Oliveira
Universidade Regional do Cariri – URCA
Orientadora – PPQB URCA.

Prof. Dr. Francisco Alixandre Ávila Rodrigues
Universidade Federal do Cariri – UFCA
Coorientador Externo – UFCA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri – URCA
Membro Titular Interno – PPQB URCA

Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante
Universidade Federal do Ceará – UFC
Membro Titular Externo

Prof. Dra. Roseli Barbosa
Universidade Regional do Cariri – URCA
Membro Suplente Interno -PPQB URCA

Prof. Dr. Jorge Marcell Coelho Menezes
Universidade Federal do Cariri – UFCA
Membro Suplente Externo

In memoriam, Maria de Jesus Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar a oportunidade de realizar este mestrado, permitindo-me crescer não apenas como profissional, mas também como ser humano.

A minha família, especialmente ao meu pai, Joaquim Raimundo Gonçalves, pelo seu amor incondicional, apoio constante e por me ensinar, com sua sabedoria, o verdadeiro valor do esforço e da perseverança. A minha mãe, Maria de Jesus Gonçalves, que, mesmo não estando mais fisicamente entre nós, continua a me guiar com sua presença espiritual e força.

À minha orientadora, Dra. Lígia Cláudia Castro de Oliveira, por sua paciência, orientação e por sempre acreditar no meu potencial. Agradeço imensamente pelo apoio durante toda a jornada, pela orientação acadêmica de excelência e por me incentivar a ultrapassar meus limites. Ao meu coorientador, Dr. Francisco Alixandre Ávila Rodrigues, pela contribuição valiosa para este trabalho, pelo seu conhecimento e pelas sugestões sempre pertinentes e enriquecedoras.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Renata Maria da Silva Lucas, pelo companheirismo, pela troca constante de ideias e pela amizade construída ao longo dessa caminhada.

À URCA (Universidade Regional do Cariri) e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela parceria e apoio contínuos, especialmente ao Laboratório LEQBA (Laboratório de Espectroanalítica Química Biológica e Ambiental), que foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Farmace - Indústria Químico Farmacêutica Cearense, pela flexibilidade nos horários, o que possibilitou o andamento das atividades de campo e laboratório de maneira eficiente.

Por fim, este é apenas o início de um longo caminho acadêmico. A cada passo dado, novas portas se abrem, e tenho a certeza de que, com o apoio de todos, muitas outras conquistas ainda virão.

Agradecimentos a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP pelo financiamento do projeto de pesquisa identificado pelo número BP5-0197-00179.01.00/22 por meio do programa - Bolsa de Produtividade em Pesquisa, Estímulo à Interiorização e à Inovação Tecnológica – BPI.

“A vida nunca é simples. Tudo é um grande desafio, mas o que importa é como você o enfrenta.”

Rick Riordan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma representativo da solução 1-Naftol e 1-Nafol Acetato à 5,0 µM em escala automática. 24
Figura 2. Cromatograma representativo da solução 1-Naftol e 1-Nafol Acetato à 5,0 µM com zoom. 24
Figura 3. Cromatograma representativo do branco em escala automática....25
Figura 4. Cromatograma representativo do branco com zoom. 25
Figura 5. Análise de regressão 1-Naftol.....26
Figura 6. Análise de regressão 1-Naftol Acetato. 26
Figura 7. Demonstrativo de formação do 1-Naftol (baixa concentração da AChE). 29
Figura 8. Demonstrativo de formação do 1-Naftol (alta concentração da AChE). 30
Figura 9. Curva de calibração Acetilcolinesterase (AChE). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados – Precisão e Exatidão: 1-Naftol. 27
Tabela 2. Resultados – Precisão e Exatidão: 1-Naftol Acetato....27
Tabela 3. LD (µM) e LQ (µM) para 1-Naftol e 1-Naftol Acetato. 28
Tabela 4. Resultados – Níveis de AChE. 31
Tabela 5. Resumo dos resultados da validação analítica. 31
Tabela 6. Associação entre metais traço e AChE 32
Tabela 7. Coeficiente de correlação de Spearman (AChE x cada metal). 32

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

σ	Desvio Padrão
%	Porcentagem
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromol
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
BuChE	Butirilcolinesterase

DPR	Desvio Padrão Relativo
DTNB	ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
H_2O	Água
IC	Inclinação da Curva de Calibração
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
mL	Mililitro
mmol L-1	Milimoles por litro
PMSF	*Phenylmethylsulphonylfluoride*
r	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
TCEP	Tris 2-carboxietil-fosfina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA 1
2 OBJETIVOS 4
2.1. OBJETIVO GERAL 4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4
2.3. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS 4
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 7
3.1. ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO BIOINDICADORES 7
3.2. ACETILCOLINESTERASE COMO BIOMARCADOR 8
3.3. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA AChE 10
3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 11
3.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 12
3.4.1. Especificidade/seletividade 12
3.4.2. Linearidade 13
3.4.3. Intervalo 13
3.4.4. Precisão 13
3.4.5. Exatidão 14
3.4.6. Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) 14
4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 15
4.1. Introdução 16
4.2. Metodologia 19
4.2.1. Organismos investigados. 19
4.2.2. Materiais 19
4.2.3. Procedimento para extração de AChE 19
4.2.4 Procedimento para quantificação da AChE 20
4.2.5. Condições Cromatográficas 20
4.2.6. Validação do Método Analítico 21
4.2.7. Procedimento para quantificação de metais pesados em organismos aquáticos 22
4.2.8. Associação entre AChE e metais pesados em organismos aquáticos 23
4.3. Resultados e discussão 24
4.3.1. Validação do método analítico 24
4.3.2. Mecanismo de reação proposto 29
4.3.3. Estimativa de AChE nos seres vivos 30
4.3.4. Associação entre AChE e metais pesados 32
4.4. Conclusão 33
Referências 34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 39
5.1. ASPECTOS GERAIS 39
5.2. CONCLUSÕES GERAIS 41
5.3. PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS 42
6 REFERÊNCIAS 43
7 ANEXOS e APÊNDICES 53
7.1. ANEXO 1. EMAIL DA CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO DE PESQUISA. 53
7.2. ANEXO 2. CAPTURA DE TELA DA DO "*PROOF*" APÓS A SUBMISSÃO 54

UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

RESUMO

Introdução: A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um dos principais biomarcadores utilizados no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Entretanto, os métodos colorimétricos tradicionais apresentam limitações de seletividade em matrizes complexas, como tecidos de moluscos, peixes e anfíbios. Por não possuir capacidade de absorver luz suficiente para uma quantificação direta por CLAE, a sua determinação é realizada por uma reação química, onde a enzima reage com um composto (1-Naftol Acetato) para formação de outra substância conhecida (1-Naftol) detectável e quantificável por CLAE. **Objetivo:** Desenvolver uma nova metodologia que quantifica a conversão de Acetato de 1-Naftol em 1-Naftol Acetato para determinação da AChE em organismos aquáticos, após a extração da enzima dos tecidos moles dos seres vivos, correlacionando os níveis de AChE com metais traço. **Metodologia:** Foi extraído a enzima acetilcolinesterase a partir cerca de 50 mg de tecidos moles de cada ser vivo capturado, e estimado sua quantidade a partir da conversão do 1-Naftol Acetato em 1-Naftol por Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detector UV (CLAE - UV) e em paralelo avaliado os níveis de metais traço (cobre, cromo, níquel e manganês) nas amostras biológicas e investigado a associação entre as concentrações de cada metal e a atividade da AChE. **Resultados e discussões:** O método foi validado seguindo as diretrizes do ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), demonstrando seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação adequados. Aplicamos o método proposto em amostras biológicas de três espécies aquáticas provenientes de diferentes regiões, com distintos graus de intervenção antrópica. A aplicação em campo revelou uma atividade da AChE menor em amostras de locais contaminados (0,00 a 4,44 unidades/mL da AChE) em comparação ao controle (6,11 unidades/mL da AChE), sugerindo que nossa proposta pode ser utilizada para monitoramento de contaminação aquática. Os resultados também revelaram uma clara associação (correlação inversa) entre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e as concentrações dos metais **Conclusões:** O método analítico demonstrou a sua aplicabilidade para quantificação dos compostos de interesse, assim como o emprego da extração utilizada em amostras biológicas provenientes de diferentes regiões, com distintos graus de intervenção antrópica, além de demonstrar uma correlação inversa entre a atividade enzimática e as concentrações dos metais avaliados, validando a metodologia como uma ferramenta eficaz para o biomonitoramento aquático.

Palavras-Chave: AChE; Biomonitoramento; Contaminação Aquática; CLAE; Contaminação Ambiental.

Agradecimentos: FUNCAP e URCA.

A NOVEL APPROACH FOR ASSESSING ENVIRONMENTAL CONTAMINATION: LINKING ACHE ACTIVITY TO TRACE METALS IN AQUATIC ORGANISMS

ABSTRACT

Introduction: The enzyme acetylcholinesterase (AChE) is one of the main biomarkers used in the biomonitoring of aquatic ecosystems. However, traditional colorimetric methods present selectivity limitations in complex matrices, such as mollusk, fish, and amphibian tissues. Since it lacks sufficient light absorption capacity for direct quantification by HPLC, its determination is performed through a chemical reaction where the enzyme reacts with a compound (1-Naphthyl Acetate) to form another known substance (1-Naphthol) that is detectable and quantifiable by HPLC. **Objective:** To develop a new methodology that quantifies the conversion of 1-Naphthyl Acetate into 1-Naphthol* for the determination of AChE in aquatic organisms, following the extraction of the enzyme from soft tissues, and to correlate AChE levels with trace metals. **Methodology:** The acetylcholinesterase enzyme was extracted from approximately 50 mg of soft tissue from each captured organism, and its quantity was estimated based on the conversion of 1-Naphthyl Acetate into 1-Naphthol using High-Performance Liquid Chromatography with a UV detector (HPLC-UV). Concurrently, trace metal levels (copper, chromium, nickel, and manganese) in the biological samples were evaluated, and the association between the concentration of each metal and AChE activity was investigated. **Results and Discussion:** The method was validated following the ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) guidelines, demonstrating adequate selectivity, linearity, precision, accuracy, and limits of detection and quantification. We applied the proposed method to biological samples of three aquatic species from different regions with varying degrees of anthropogenic intervention. Field application revealed lower AChE activity in samples from contaminated sites (0.00 to 4.44 AChE units/mL) compared to the control (6.11 AChE units/mL), suggesting that our proposal can be used for aquatic contamination monitoring. The results also revealed a clear association (inverse correlation) between acetylcholinesterase enzymatic activity and metal concentrations. **Conclusions:** The analytical method demonstrated its applicability for quantifying the compounds of interest, as well as the effectiveness of the extraction method used on biological samples from different regions with varying degrees of anthropogenic intervention. Furthermore, it demonstrated an inverse correlation between enzymatic activity and the concentrations of the evaluated metals, validating the methodology as an effective tool for aquatic biomonitoring.

Keywords: AChE; Biomonitoring; Aquatic Contamination; HPLC; Environmental Contamination.

Acknowledgements: FUNCAP and URCA.

Como o desenvolvimento de um método utilizando a enzima acetilcolinesterase como biomarcador em ambientes aquáticos pode ser tão importante? Esta enzima, a acetilcolinesterase, é crucial para o nosso organismo, desempenhando papel fundamental na transmissão dos impulsos nervosos, nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico. A inibição dessa enzima por agentes tóxicos, como agrotóxicos e metais pesados, pode resultar em sintomas clínicos variados, incluindo confusão mental, cefaléia e comprometimento da memória. Além disso, exposições repetidas podem ocasionar efeitos neurotóxicos graves, como fasciculações musculares, bloqueio neuromuscular e bradicardia. Diante disso, o desenvolvimento de um método para quantificar a atividade da acetilcolinesterase em ambientes aquáticos, torna-se essencial para monitorar níveis de contaminação ambiental, contribuindo para a prevenção da ingestão e uso inadequado de água contaminada.

1.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A estratégia metodológica adotada nesta pesquisa foi guiada por uma nova abordagem analítica e experimental, com o intuito centrado no desenvolvimento de um método cromatográfico capaz de quantificar a acetilcolinesterase (AChE) em organismos aquáticos, correlacionando a determinação enzimática com os níveis de metais pesados de cada ambiente de coleta. A decisão por essa técnica não foi arbitrária, mas fundamentada em uma lacuna metodológica observada na literatura científica.

Observa-se na literatura diversos métodos para a extração da enzima, entretanto, para a metodologia aqui descrita, era necessário utilizar reagentes capazes de extrair a AChE sem gerar picos secundários que causam interferência cromatográfica. A estratégia utilizada foi adaptar o método proposto por Tenório-daussat et al. (2014), que é uma adaptação do método de Erk et al. (2002). Vale ressaltar que esses dois trabalhos apresentam metodologias para determinação de metalotioneínas, que são proteínas com capacidade de ligação a metais.

Embora o protocolo de extração utilizado tenha sido originalmente desenvolvido para metalotioneínas, é possível quantificar com sucesso a atividade da acetilcolinesterase (AChE). A presença de Tris-HCl em pH 8,6 e de PMSF contribuiu para a preservação da integridade da enzima. Ainda que o protocolo inclui um tratamento térmico a 70 °C por 10 minutos, observou-se atividade suficiente da AChE, confirmando a resistência térmica em tecidos específicos ou proteção enzimática conferida pelas condições do tampão. Souza (2016) observou que a enzima apresentou estabilidade térmica até 100°C em tecidos de organismos aquáticos. Esse achado destaca que a enzima obtida desses organismos suporta o protocolo de extração utilizado.

Para a determinação da atividade enzimática, optamos por não utilizar métodos espectrofotométricos, como o de Ellman (1961), pois mesmo sendo amplamente utilizados para estimar a atividade da AChE, eles demonstram baixa seletividade frente a matrizes biológicas complexas, sendo fortemente suscetíveis à interferência de outras substâncias que absorvem luz no UV-VIS no mesmo comprimento de onda, como demonstrado por Reinmuth-Selzle *et al*. (2022), onde os autores sugerem um método por CLAE como substituto a métodos por espectrofotometria UV-VIS para quantificação de proteínas, já que os métodos por CLAE possuem a etapa separação pela coluna cromatográfica, que permite a diferenciação de muitas substâncias interferentes, o que torna essa técnica adequada para amostras mais complexas.

Portanto, uma estratégia que envolvesse uma técnica de separação cromatográfica se mostrou mais apropriada para garantir seletividade analítica, especialmente quando o objetivo é monitorar a presença de contaminantes ambientais em organismos vivos.

A escolha da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi também impulsionada pela sua aplicabilidade em matrizes ambientais, pela elevada sensibilidade da técnica e pela capacidade de realizar análises quantitativas confiáveis em amostras com vários compostos absorvíveis em sua composição. O método apresentado por Sinha *et al*. (2022), demonstrou a viabilidade da quantificação da AChE por essa técnica, ainda que restrita a amostras de sangue humano. Adaptar tal metodologia para tecidos moles de moluscos, implicou no desenho de uma abordagem experimental específica para a extração, hidrólise e detecção da enzima.

A pesquisa se estrutura como um ciclo experimental composto por cinco etapas interdependentes: (1) extração da AChE de tecidos moles; (2) padronização da reação química para geração do produto de interesse (1-naftol); (3) desenvolvimento do método cromatográfico; (4) validação do método segundo critérios internacionais; e (5) aplicação em campo com amostras oriundas de ambientes naturais. Cada uma dessas etapas foi desenhada com base em parâmetros estabelecidos por normas da Anvisa e guias internacionais como o ICH Q2(R2), assegurando a confiabilidade dos resultados.

Do ponto de vista da organização da dissertação, o trabalho está estruturado em cinco capítulos principais:

Capítulo 1 – Introdução Geral: Apresenta o contexto do estudo, destacando a estratégia da pesquisa e justificando a necessidade de métodos alternativos de quantificação.

Capítulo 2 – Objetivos: Descreve o objetivo geral e específico da pesquisa, além da justificativa e questionamentos norteadores.

Capítulo 3 – Referencial Teórico: Fundamenta, por meio de revisão de literatura, os conceitos centrais da pesquisa: fisiologia da AChE, biomarcadores ambientais, toxicidade de pesticidas e metais, e princípios da cromatografia líquida.

Capítulo 4 – Produção Científica: Este capítulo detalha os procedimentos experimentais adotados, abrangendo a coleta e preparação das amostras, reações químicas realizadas, parâmetros cromatográficos utilizados e critérios de validação seguidos.

Capítulo 5 – Considerações Finais: Retoma os objetivos iniciais, resume os principais achados, avaliando a eficácia do método proposto e propõe aplicações futuras do método desenvolvido no monitoramento ambiental. O capítulo é seguido pelas referências bibliográficas e anexos.

A lógica da dissertação segue uma narrativa experimental, que vai da identificação de um problema metodológico até a proposição e aplicação de uma solução analítica. A interligação entre os capítulos ocorre naturalmente, com cada seção contribuindo para a construção do argumento central da pesquisa: a viabilidade de um método alternativo e validado para quantificação da AChE em organismos aquáticos.

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método para extração e quantificação da AChE em organismos aquáticos capturados em diversos ambientes e correlacionar esse resultado com a concentração de metais pesados de cada ambiente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma estratégia de extração da acetilcolinesterase presentes em tecidos moles de organismos aquáticos;
- Estimar a quantidade de acetilcolinesterase presente nos organismos em cada região de captura;
- Adequar e validar um método analítico por CLAE para quantificação da acetilcolinesterase;
- Correlacionar os níveis da AChE com a concentração de metais pesados.

2.3. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A motivação central para a realização desta pesquisa partiu da compreensão de que a avaliação da qualidade ambiental exige ferramentas analíticas cada vez mais confiáveis. Ao aprofundar na literatura sobre toxicologia ambiental, identificamos que a enzima acetilcolinesterase (AChE) é amplamente reconhecida como um biomarcador essencial para diagnosticar a exposição de organismos aquáticos a agentes neurotóxicos. No entanto, durante o levantamento bibliográfico, um obstáculo técnico significativo surgiu, o que se tornou o ponto chave deste trabalho: as limitações dos métodos analíticos tradicionais.

Historicamente, o método colorimétrico de Ellman é o protocolo padrão para medir a atividade da AChE. Contudo, apesar de sua popularidade, essa técnica apresenta baixa seletividade quando aplicada a matrizes biológicas complexas, como tecidos de moluscos, peixes e anfíbios. A presença de interferentes nessas matrizes pode comprometer a confiabilidade dos resultados, gerando falsos diagnósticos sobre a saúde do ecossistema. Diante disso, surgiu o seguinte questionamento: É possível desenvolver uma metodologia que supere essas interferências mantendo a praticidade necessária para rotinas de biomonitoramento?

Esse questionamento, direcionou o foco do estudo para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Embora a literatura aponte a CLAE como uma alternativa capaz de determinar a atividade enzimática em matrizes complexas, nota-se que ela ainda é subutilizada para a quantificação da AChE. Os poucos métodos existentes, como o descrito por Sinha et al. (2022), embora promissores, apresenta tempo de corrida analítica longo (cerca de 20 minutos), além de ser testado apenas em amostras de sangue, carecendo assim de validação em tecidos de organismos aquáticos expostos a condições reais de campo.

Portanto, o foco desta dissertação é a viabilidade de uma nova abordagem analítica por CLAE-UV. Com o objetivo de desenvolver e validar um método que não apenas fosse mais seletivo que os colorimétricos, mas também mais rápido que os cromatográficos existentes. Para isso, é apresentado a adaptação de um protocolo de extração, que originalmente foi desenhado para metalotioneínas, mas que assim foi testado a hipótese de que ele seria eficaz também para a extração da AChE sem ocasionar interferência cromatográfica.

Além do desafio analítico, foi necessário contextualizar essa ferramenta na realidade ambiental. Por isso, a pesquisa se propôs a responder se essa nova metodologia seria sensível o suficiente para detectar variações na atividade enzimática em organismos (moluscos Gastropoda, alevinos de *Oreochromis niloti*cus e girinos de *Rhinella marina*) coletados em regiões com diferentes graus de intervenção antrópica.

Nesse contexto, surgiu um questionamento secundário, mas igualmente relevante: Existe uma correlação entre a inibição da AChE medida por este novo método e a presença de metais-traço nos organismos? A literatura sugere que metais inibem a AChE, mas a confirmação dessa relação utilizando o método proposto fortaleceria sua validação como ferramenta de biomonitoramento. Assim, este estudo buscou investigar a associação entre a atividade enzimática e as concentrações de cobre, cromo, níquel e manganês nas amostras biológicas.

Em suma, esta dissertação procura preencher uma lacuna metodológica crítica, oferecendo à comunidade científica um protocolo validado segundo as diretrizes do ICH (*International Council for Harmonisation*), que seja rápido (resposta em menos de 10 minutos), preciso e capaz de correlacionar a resposta biológica (enzimática) com a contaminação química ambiental.

Nesse contexto, o presente trabalho foca no desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica para a quantificação da acetilcolinesterase em organismos aquáticos após sua extração, utilizando a técnica de CLAE com detecção UV, correlacionando-se os níveis da AChE com a concentração de metais pesados. Com os objetivos já citados, busca-se responder aos seguintes questionamentos:

É possível que haja correlação entre os níveis de metais pesados e a atividade da acetilcolinesterase nos ambientes aquáticos estudados?

O método cromatográfico proposto apresenta seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, suficientes para detectar variações nos níveis da AChE, frente a diferentes graus de exposição ambiental?

A aplicação dessa metodologia em organismos capturados em diferentes regiões do Cariri permite inferências confiáveis sobre o grau de contaminação dos ecossistemas estudados?

Considera-se que o desenvolvimento dessa metodologia para quantificação da AChE em matrizes aquáticas representa uma importante contribuição para o campo da toxicologia ambiental, oferecendo uma alternativa ao clássico método de Ellman. Além disso, sua aplicabilidade pode ir além, podendo auxiliar na implementação de políticas públicas voltadas à preservação de ecossistemas e à vigilância ambiental, especialmente em regiões onde o uso de pesticidas e metais pesados é recorrente.

3.1. ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO BIOINDICADORES

Os sistemas bioindicadores são de suma importância para o monitoramento de poluentes aquáticos em todo o mundo. O impacto das mudanças ambientais pode ser monitorado por meio do comportamento responsivo de moluscos. Metais pesados e poluentes orgânicos afetam a reprodução, a mortalidade e as atividades metabólicas normais desses seres vivos. Diversas alterações, como a descontinuidade na ingestão de alimentos, na taxa de crescimento, em contrações e na inatividade dos tentáculos, são biomarcadores para o biomonitoramento. Diferentes espécies de caracóis podem ser utilizadas como bioindicadores da poluição urbana, a poluição por petróleo, a poluição terrestre, a poluição por pesticidas, e a contaminação aquática. Esses animais também podem fornecer informações sobre diversas esferas ambientais, incluindo a biosfera, a litosfera, a antroposfera, a criosfera e a hidrosfera (DHIMAN; PANT, 2021).

A importância dos moluscos como espécies biomonitoradoras deve-se ao fato de serem considerados organismos sentinela, representando os diferentes meios (água, solo), além de possuírem diferentes modos de nutrição (carnívoros e detritívoros). Sua alta sensibilidade às mudanças ambientais é um fator importante no biomonitoramento. As espécies de moluscos possuem excelente capacidade de acumular metais pesados e outros contaminantes em seus corpos e conchas, devido a serem animais de longa vida e de serem organismos filtradores (ALMAMOORI; SALMAN, 2022).

Muitos estudos em toxicologia ambiental têm se concentrado em anfíbios, especialmente em anuros (rãs e sapos), devido à sua sensibilidade às mudanças ambientais e por serem uma parte crucial da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos e terrestres. Tanto que fatores antropogênicos que afetam de forma negativa os anfíbios pode por fim influenciar todo o ecossistema. Os anfíbios são seres sensíveis às mudanças ambientais por possuírem características como ciclo de vida complexo e pele altamente permeáveis. Por este motivo, a diversidade de anfíbios tem sido comprometida por um declínio mundial que aumenta a cada ano. A poluição e a degradação dos ecossistemas são consideradas dois dos fatores críticos desse fenômeno (CRUZ-SANTIAGO *et al*., 2021). O sapo-cururu (*Rhinella marina*) é uma espécie de anfíbio anuro nativa do México, América Central e parte dos Estados Unidos (Texas). É uma espécie suscetível à bioacumulação de poluentes orgânicos e inorgânicos e aos seus efeitos tóxicos, sendo considerada, portanto, um bom bioindicador de áreas contaminadas (CRUZ-ESQUIVEL *et al*., 2017; MCCOY *et al*., 2017).

Nos ecossistemas aquáticos, uso de peixes como bioindicadores em diferentes níveis de organização biológica (molecular/bioquímica, níveis celulares, de tecidos/órgãos, etc.) pode dar um vislumbre dos impactos da poluição (BALLESTEROS *et al*., 2017; VIEIRA *et al*., 2017). Como por exemplo a inibição de acetilcolinesterase em peixes afetando a neurotransmissão adequada nas sinapses colinérgicas. Portanto, a colinesterase (ChE) em peixes tem sido reconhecido como um biomarcador promissor em nível molecular/bioquímico para contaminantes neurotóxicos (RUVINDA; PATHIRATNE, 2018).

Alevinos (*Oreochromis niloticus*) podem ser considerados como um dos melhores biomonitores em sistemas de água doce para estimativa da concentração de poluição por metais. eles oferecem várias vantagens específicas no monitoramento de características dos sistemas aquáticos e na avaliação mudanças nos habitats (ABU SHNAF et al., 2021). Além disso, os peixes estão localizados em final da cadeia alimentar aquática e podem acumular metais e passá-los aos seres humanos causando doenças crônicas ou agudas. A concentração do metal contido nos tecidos dos peixes reflete a exposição via água e/ou alimentação, podendo demonstrar a atual situação dos animais. Estudos experimentais realizados em laboratórios mostraram que o acúmulo de metais pesados em um tecido depende principalmente da concentração de metais na água e do período de exposição; entretanto alguns outros fatores intrínsecos, como salinidade, pH, dureza e temperatura desempenham um papel significativo papéis na bioacumulação de metais. Necessidades ecológicas, sexo, idade, tamanho, hábitos alimentares, além das condições biológicas dos peixes afetam o acúmulo de metais pesados em seus tecidos (ELRAYESS *et al*., 2022; PÁEZ-OSUNA *et al*., 2024).

3.2. ACETILCOLINESTERASE COMO BIOMARCADOR

Historicamente, a inibição da AChE foi reconhecida como o principal biomarcador de envenenamento por agrotóxicos em humanos e, posteriormente, seu uso foi adaptado para o campo da toxicologia ambiental, com foco em ecotoxicologia (LIONETTO *et al*., 2011). A medição da inibição da AChE em organismos aquáticos tornou-se a ferramenta útil para monitorar a contaminação ambiental e a exposição a esses compostos, se tornando uma ferramenta versátil para investigar os efeitos de diversos poluentes em múltiplos níveis tróficos (FU *et al*., 2018).

Agrotóxicos contendo organofosforados e carbamatos são potentes agentes anticolinesterásicos. Estes se ligam à AChE, inibindo sua atividade catalítica. Sua inibição traz como consequência fisiológica o acúmulo de acetilcolina nas sinapses, causando uma superestimulação do sistema nervoso (crise colinérgica), que pode resultar em tremores, paralisia

e, em casos graves, morte (SHEEMONA *et al*., 2014). A AChE presente nos eritrócitos, juntamente com a butirilcolinesterase plasmática (BChE), funciona como o primeiro alvo específico desses pesticidas no organismo. A medição de sua atividade serve, portanto, como um indicador direto e precoce de exposição (JALI, 2025).

No entanto, o uso da inibição da AChE como um biomarcador específico para organofosforados e carbamatos deve ser questionado. Pesquisas demonstraram que esta enzima é sensível a várias outras classes de contaminantes, incluindo: metais pesados, detergentes, hidrocarbonetos, nanomateriais: (metais, óxidos, nanotubos de carbono), desreguladores endócrinos (compostos como alquilfenóis e bisfenol A) e outros agrotóxicos (piretroides, como a cipermetrina, e herbicidas de diferentes famílias químicas, como o paraquat). Dessa forma inibição da AChE passa a ser proposta não como um marcador específico, mas como um biomarcador geral de estresse neurotóxico (WEXLER, 2014).

Nesse novo paradigma, essa abordagem é extremamente valiosa porque, em condições reais, os organismos raramente são expostos a um único poluente. A inibição da AChE, portanto, pode refletir o efeito cumulativo e sinérgico de toda a carga de contaminantes biodisponíveis com potencial neurotóxico (UMAR *et al*., 2021). No entanto, há dificuldades quanto a medição da AChE, inicialmente devido a interferências proveniente do ambiente de coleta, o outro aspecto é a impossibilidade de uma determinação direta da atividade catalítica desta enzima, pois a reação de hidrólise da acetilcolina em si não gera um sinal óptico ou elétrico que possa ser mensurado de uma forma simples (DAWSON, 2023).

Estratégias para suprir essa limitação, impõe que atividade enzimática seja inferida pela medição de um produto secundário. A abordagem mais consagrada para contornar essa dificuldade é o método colorimétrico (UV-VIS) de Ellman (Ellman *et al.,* 1961). Este método não mede diretamente a AChE, mas sim na capacidade da enzima (presente na amostra) hidrolisar a propioniltiocolina em tiocolina e ácido propiônico. A tiocolina formada reage com o ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), formando um complexo amarelo mensurável a 405nm. Embora eficaz e amplamente utilizado, sua dependência de um reagente cromogênico o torna suscetível a interferências de natureza analítica, pois outras moléculas presentes na amostra biológica podem reagir com o DTNB e gerar resultados errôneos. Outra possibilidade, dependendo do tipo de amostra, é que haja sobreposição espectral, ou seja, outro composto desconhecido da amostra absorva no mesmo comprimento de onda do método (HECKO *et al*., 2023).

Considerando a suscetibilidade apresentada no tradicional método de Ellman às interferências químicas e possíveis sobreposições no comprimento de onda do método, a busca

por técnicas analíticas mais específicas é fundamental. Nesse contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se apresenta como uma alternativa viável para a quantificação da atividade da acetilcolinesterase, pois aborda diretamente a principal fragilidade dos ensaios colorimétricos por espectrofotometria: a falta de especificidade do método. A CLAE utiliza uma coluna cromatográfica para separar fisicamente os componentes da reação enzimática, o que possibilita a detecção e possível identificação de compostos que possam reagir com o substrato cromogênico. A coluna cromatográfica também permite que compostos absorvíveis no mesmo comprimento de onda também possam ser separados, possibilitando uma detecção e quantificação sem interferências do composto de interesse (ORTIZ-MARTÍNEZ *et al*., 2024).

3.3. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA AChE

O principal método utilizado para a quantificação da Acetilcolinesterase é o método de Ellman. Este método foi desenvolvido em 1961, usa a técnica espectrofotométrica que, através da reação de hidrólise a acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase, formam-se tiocolina e acetato. A atividade pode ser medida aumentando a cor amarela produzida pela tiocolina quando reage com 5,5-Ditiobis (ácido 2nitrobenzóico), também conhecido como DTNB para produzir um composto amarelo 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) com absorbância medida a 412 nm (da Silva *et al*., 2025).

Posteriormente, um método baseado na hidrólise da propioniltiocolina por determinação espectrofotométrica da tiocolina foi desenvolvido por Augustinsson e colaboradores em 1978. Este método era específico para propioniltiocolina, mas também se tratava-se de um método espectrofotométrico (AUGUSTINSSON *et al*., 1978). No decorrer dos anos foram surgindo várias adaptações do método de Elmman, que foi se tornando cada vez mais popular, surgindo kits para testes rápidos de até 4 minutos (RAJAPAKSE *et al*., 2011). Cada vez técnicas mais sofisticadas foram surgindo e tornando mais confiável a determinação desta enzima (AChE). Método usando a fluorescência da resorufina produzida por interações enzimáticas envolvendo acetilcolina e Amplex Red também foi relatado (VIEIRA *et al*., 2008). Embora abordagens de espectrometria de massas para estimar a atividade enzimática em amostras biológicas tenham sido publicadas (FORSBERG *et al*., 2011), esses métodos eram caros, sofisticados e demorados.

Por isso, há um movimento cada vez mais crescente no desenvolvimento de métodos que sejam confiáveis e com um custo razoável, frente a isso observa-se o método desenvolvido por Wang e colaboradores em 2018, utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um estudo comparativo com a espectrofotometria tradicional, o qual determinou a atividade

inibitória da Acetilcolinesterase utilizando Galantamina e Huperzina. Entretanto, essa metodologia teve alta variação nos resultados (WANG *et al*., 2018). Outro método que adotou a mesma técnica foi descrito por Michels e Lehr em 2021, onde os autores conseguirem determinar os níveis da AChE utilizando acetato de piridin-2-ilmetila como substrato para AChE com o intuito de avaliar a potência inibitória da AChE e da BuChE (butirilcolinesterase) no desenvolvimento de fármacos.

3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Existem diversos métodos aplicados a quantificação de biomarcadores, desde espectrofotometria na região ultravioleta até as mais avançadas tecnologias em cromatografia. Dentre os principais métodos apresentados na literatura para este fim, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A sensibilidade e especificidade da CLAE tornam ela uma das técnicas mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, com destaque para a análise ambiental, médica e principalmente em estudos toxicológicos (DEBNATH *et al*., 2025).

A CLAE é um método analítico de separação, identificação e quantificação que permite analisar diversos compostos, possibilitando sua separação conforme as características físico-químicas de cada analito e a interação desses, tanto com a fase estacionária quanto com a fase móvel. As interações podem ocorrer por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. De acordo com a natureza da interação, o modo de separação é classificado em cromatografia em fase reversa, fase normal, de troca iônica e por exclusão (DAVEREY *et al*., 2023).

O processo de separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, funcionará apenas se for viável acoplar uma fase móvel apropriada a uma fase estacionária que facilite a separação cromatográfica. Para que um solvente seja utilizado como fase móvel este deve conter alto grau de pureza ou possuir um simples processo de purificação; deve solubilizar a amostra sem deteriorar os seus constituintes, para que estes sejam conduzidos pela coluna sem que haja alteração; não pode danificar a fase estacionária (coluna); deve possuir alta compatibilidade com o detector; mínima toxicidade; possuir baixa viscosidade e apresentar polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos seus componentes (AHMED, 2024).

A separação na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é efetuada no interior das colunas cromatográficas. Estas colunas devem ser constituídas por materiais inertes, de diâmetro uniforme, com capacidade de resistir a altas pressões as quais são submetidas (AHMED, 2024).

A escolha da coluna é feita em função da sua capacidade, que é determinada pelas suas dimensões, material de empacotamento, comprimento e diâmetro interno (DEBNATH *et al*., 2025).

3.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos consiste em fornecer evidências objetivas de que os parâmetros para a aplicação pretendida alcançaram os resultados esperados. Seu objetivo é assegurar que o método proposto apresenta resultados confiáveis com a qualidade exigida, nas condições em que é desenvolvido, bem como estabelecer limites de controle que serão aplicados na rotina. Precisa ser executada com equipamentos e instrumentos devidamente calibrados e validados, por operador capacitado na área de estudo (MARSON *et al*., 2020; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023)

É indispensável que os laboratórios disponham meios para garantir que os métodos elaborados disponham de resultados confiáveis e adequados ao propósito pretendido. Resultados duvidosos podem pôr em risco a metodologia e, por conseguinte, os resultados por ela obtidos. Entretanto, para aumentar a confiabilidade dos resultados, o método analítico é submetido a diversas etapas de análise, que sancionam a sua validação (GHAFAR; ABDEL, 2021; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

As etapas a serem realizadas na validação de método analítico são regidas internacionalmente pelo Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH). Segundo o ICH Q2 as metodologias podem ser validadas com a execução de alguns parâmetros, que são definidos de acordo com o objetivo do método, como: Especificidade/Seletividade, Linearidade, Intervalo, Limite de Quantificação, Limite de Detecção, Precisão e Exatidão.

3.4.1. Especificidade/seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de identificar e/ou quantificar exatamente um analito em presença de outros componentes, por exemplo, impurezas ou componentes da matriz. Para um analito ser identificado ou quantificado na presença de interferência potencial, deve minimizar essa interferência e demonstrar que o procedimento analítico é adequado ao propósito pretendido, ou seja, o método proposto deve ser capaz de separar e/ou identificar o analito, mesmo que na mesma amostra contenham compostos com estruturas químicas semelhantes. Para essa análise, deve-se comparar os resultados obtidos de amostras com o branco (amostra que não contém o analito de interesse) e com uma solução padrão

do composto, indicando que os resultados não são afetados por esses materiais. Quando um procedimento analítico não fornece discriminação suficiente, recomenda-se uma combinação de dois ou mais métodos para atingir a especificidade/seletividade necessária. (ICH Q2(R2), 2023).

3.4.2. Linearidade

É a capacidade que o método analítico possuí de comprovar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. A determinação da linearidade é realizada com pelo menos a análise de cinco pontos com diferentes concentrações, sendo cada uma destas realizadas em triplicata. O Resultado deve ser organizado na forma de gráfico da concentração pela resposta instrumental e tratados estatisticamente (CARVALHO *et al*., 2023; ICH Q2(R2), 2023). Com o resultado da reta é possível determinar a intersecção com o eixo y (x=0), coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear, desvio padrão relativo (DPR) e o coeficiente de correlação. O critério mínimo de aceitação definido pela ANVISA é um coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 (BRASIL, 2017).

3.4.3. Intervalo

Intervalo é a faixa de concentração onde será medido precisão, exatidão e linearidade dentro da faixa de aceitação. O intervalo deriva da linearidade e depende da aplicação pretendida do método. A sua determinação pode ser obtida pela razão do sinal (unidades de área no CLAE) pela respectiva concentração, alcançando as respostas relativas (CHENG *et al*., 2023; BRASIL, 2017).

Elaborando um gráfico dessas respostas pela concentração em escala logarítmica obtém-se uma reta horizontal, que se desenvolve por toda a faixa linear. Duas linhas horizontais paralelas ao gráfico de ± 5% da linha da faixa linear define o intervalo em que são permitidas variações e o método é considerado linear (BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

3.4.4. Precisão

A precisão expressa-se pela avaliação da proximidade dos resultados de uma mesma amostra sob condições pré-estabelecidas. A precisão do método é demonstrada pela repetibilidade e pela reprodutibilidade (ou precisão intermediária). A Repetibilidade é a proximidade de resultados feitos no mesmo dia com o mesmo analista e instrumentação. A reprodutibilidade ou precisão intermediária é a proximidade dos resultados obtidos no mesmo laboratório em dias diferentes e com analistas diferentes, podendo ser realizada também em equipamentos diferentes. (COSKUN, 2025; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

3.4.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o ensaio no qual os resultados devem apresentar proximidade entre o valor real e o valor teórico (valor aceito como verdadeiro). A exatidão de um método é verificada através da recuperação de um padrão de pureza conhecida contaminado na matriz de interesse ou a diferença entre a média e o valor como verdadeiro junto com os intervalos de confiança (ATKINS; STAINBACK, 2022; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023). O ICH e a ANVISA estabelecem um mínimo de nove determinações, envolvendo no mínimo três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) realizados em triplicata. As concentrações devem estar dentro do intervalo do método. Antes de determinar a exatidão é preciso definir a seletividade, a linearidade e o intervalo do método (BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

3.4.6. Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Limite de Quantificação (LQ) é utilizado apenas em ensaios em que o analito possuí baixa resposta instrumental, o qual deverá ser escolhido o ponto com menor concentração e que seja possível demonstrar linearidade, precisão e exatidão. O LQ representa a menor concentração que o método desenvolvido é capaz de quantificar com segurança (SABZKOOHI *et al*., 2023; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

O Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que consegue ser detectada na amostra analisada, contudo não necessariamente quantificada, sob as condições pré-estabelecidas. Pode ser obtido por vários métodos, mas o principal é a análise do analito em concentrações conhecidas e de forma decrescente até alcançar o menor nível que pode ser detectado, no qual consegue distinguir o sinal analítico do ruído (GARRIDO *et al*., 2023; BRASIL, 2017; ICH Q2(R2), 2023).

ARTIGO A SER SUBMETIDO:

UMA NOVA ABORDAGEM PARA ANALISAR CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: RELACIONANDO A ATIVIDADE DA AChE COM METAIS TRAÇO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Filipe Joaquim Gonçalves[a], Renata Maria da Silva Lucas[a], Irwin Rose Alencar de Menezes[a], Francisco Assis Bezerra da Cunha[a], Francisco Alixandre Ávila Rodrigues[b], Lígia Cláudia Castro de Oliveira[a,*]

[a] Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri (URCA), 1161, Rua Cel. Antonio Luis, 63105-000, Crato, CE, Brasil.

[b] Universidade Federal do Cariri (UFCA), Av. Ten. Raimundo Rocha, 1639, 63048-080, Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

[*] Autor correspondente. E-mail: ligia.castro@urca.br (Lígia C. C. de Oliveira).

RESUMO

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um dos principais biomarcadores utilizados no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Entretanto, os métodos colorimétricos tradicionais apresentam limitações de seletividade em matrizes complexas, como tecidos de moluscos, peixes e anfíbios. Este estudo apresenta um método rápido e seletivo por CLAE-UV para a determinação da atividade da AChE, baseado na quantificação da conversão enzimática do acetato de 1-naftol em 1-naftol, utilizando um inovador protocolo de extração, com o intuito de minimizar interferências da matriz. O método foi validado seguindo as diretrizes do ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), demonstrando seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação adequados. Aplicamos o método proposto em amostras biológicas de três espécies aquáticas provenientes de diferentes regiões, com distintos graus de intervenção antrópica. A aplicação em campo revelou uma atividade da AChE menor em amostras de locais contaminados (0,00 a 4,44 unidades/mL da AChE) em comparação ao controle (6,11 unidades/mL da AChE), sugerindo que nossa proposta pode ser utilizado para monitoramento de contaminação aquática. Buscando mais evidências para validar nossa metodologia, determinamos as concentrações dos metais-traço (cobre, cromo, níquel e manganês) nas amostras biológicas e investigamos a associação entre as concentrações de cada metal e a atividade da AChE. Os resultados revelaram uma clara associação (correlação inversa) entre a atividade enzimática da acetilcolinesterase e as concentrações dos metais. Ou seja, nossa proposta foi capaz de identificar que a atividade da acetilcolinesterase diminuiu nas regiões mais impactadas pelos metais, indicando efeitos neurotóxicos.

Palavras-chave: AChE. Biomonitoramento. Contaminação Aquática. CLAE. Contaminação Ambiental.

4.1. Introdução

A acetilcolinesterase (AChE) é uma colinesterase essencial que regula e hidrolisa a acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central (Duran and Beydemir, 2024). A AChE é uma enzima essencial para garantir o funcionamento adequado do sistema nervoso de muitos organismos, desde seres humanos até organismos aquáticos. É responsável pela degradação, via hidrólise, de acetilcolina em acetato e colina, interrompendo a transmissão sináptica dos neurônios colinérgicos, permitindo que o sistema retorne ao seu estado de repouso. Ou seja, a AChE é uma enzima vital envolvida na transmissão de impulsos nervosos (Duran and Beydemir, 2024). Sem a ação adequada da AChE, a acetilcolina se acumula, ocasionando hiper estimulação de nervos e músculos (Santos et al., 2022).

A acetilcolinesterase é uma enzima-chave no sistema nervoso e vem sendo utilizada para estimar a neurotoxicidade resultante da exposição a xenobióticos. Sua alteração é amplamente utilizada como um indicador neurológico adequado em consequência da exposição a diversos tipos de poluentes. Além disso, o controle neural da alimentação tem sido estudado intensivamente em vários moluscos gastrópodes. Isso porque o comportamento alimentar e o crescimento estão associados ao risco de poluentes presentes no ecossistema (Durieux et al., 2011).

Moluscos são um dos principais seres vivos utilizados como modelos para estudo com biomarcadores, como a AChE. Eles possuem a capacidade de acumular vários xenobióticos em seus tecidos, porque vivem em contato próximo com as camadas superiores do solo, podem ser expostos a uma quantidade significativa de xenobióticos, pois seus pés estão em contato com partículas do solo e seu contato com a superfície (El-Gendy et al., 2021). A subclasse gastrópode é o modelo para a compreensão geral de interações xenobióticas com efeito no sistema nervoso. O sistema nervoso desses animais envolve o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico. O sistema nervoso central é composto por gânglios interligados por células nervosas. Ele contém gânglios bucais pareados. Esses gânglios bucais incluem neurônios motores, que produzem uma saída motora rítmica e movem os diversos músculos bucais nos movimentos harmônicos necessários para a alimentação (Chase, 2002).

Outro organismo que vem sendo bastante utilizado em estudos de toxicologia ambiental é o sapo-cururu (*Rhinella marina*), que é um anfíbio que pode ser encontrado em diversas regiões do mundo. Possuí uma expectativa de vida longa, algo entre 10 e 15 anos (Cruz-Santiago et al., 2023).

Este é um ser vivo que possuí características ideais para pesquisas científicas, a principal é sua pele altamente permeável, que os torna suscetíveis à absorção de agentes externos, como poluentes (Wells, 2007). Outro aspecto interessante é a capacidade de bioacumular diferentes tipos de poluentes, sendo mais observado em anfíbios capturados próximo de áreas industriais ou de atividades agrícolas. Os organoclorados e organofosforados, assim como, poluentes industriais e metais pesados são os contaminantes comumente associados entre algumas espécies de anfíbios e estudos de toxicologia ambiental (Battaglin and Fairchild, 2002; Qureshi et al., 2015, Zhu et al., 2025).

Peixes (alevinos) também são amplamente utilizados na avaliação toxicológica do ambiente aquático e como bioindicadores de poluição ambiental (Li et al., 2024). Eles são os primeiros indicadores de poluição ambiental devido à sua alta sensibilidade a baixas concentrações de contaminantes e, também, são considerados bioacumuladores (Klobučar et al., 2010; Naigaga et al., 2011). Quando estes vivem em ambientes contaminados, desenvolvem doenças e há também uma redução do potencial respiratório, diminuindo, consequentemente, a qualidade do peixe. Por estes motivos, são normalmente utilizados em pesquisas científicas, principalmente no Egito, onde a espécie Oreochromis niloticus é encontrada em abundância e possuí alta importância econômica. Esta espécie é vista como um bom bioindicador para contaminações por metais pesados e como organismos úteis na avaliação da qualidade da água frente a diferentes substâncias tóxicas e poluentes (Omar et al., 2015).

A determinação da atividade da acetilcolinesterase é fundamental, tanto do ponto de vista médico, quanto ambiental. Do ponto de vista médico, pode auxiliar no diagnóstico e monitoramento de distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer (Kandy et al., 2025). Do ponto de vista ambiental, quantificar os níveis da AChE em organismos aquáticos, por exemplo, é uma estratégia importante para avaliar o risco ecológico do sistema aquático e seu entorno (Liu et al., 2024; Choudhary et al., 2025). A AChE pode ser utilizada como um biomarcador biológico em organismos aquáticos, como invertebrados e peixes, para avaliar a exposição do ecossistema aquático à poluentes tais como organofosforados (Matthews, 2015; Antonijevic et al., 2018, Lionetto et al., 2013; Wang et al., 2025) e metais pesados (Liu et al., 2024), tornando-se um instrumento importante no monitoramento ambiental (Hafed-Khatiri et al., 2025; Carnib et al., 2025).

A quantificação da acetilcolinesterase pode ser realizada por técnicas analíticas, tais como espectrofotometría UV-VIS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método de Ellman (Ellman et al., 1961) é o protocolo mais comumente utilizado e bem estabelecido para medir a atividade da AChE. Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na hidrólise da acetiltiocolina pela AChE para formar um produto de cor amarela quantificável por espectrofotômetro UV-VIS.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem se mostrado como uma alternativa interessante, por se tratar de um método analítico capaz de conseguir determinar a atividade enzimática em matrizes complexas, possibilitando medir a concentração da enzima em diferentes amostras biológicas e ambientais (Schwab et al., 2025; da Silva et al., 2025; Lima et al., 2025). Entretanto, a cromatografia foi pouco aplicada para a quantificação da acetilcolinesterase. Foi desenvolvido um método por Sinha e colaboradores (Sinha et al., 2022), o qual determinou a quantidade de acetilcolinesterase em amostras de sangue por CLAE, realizando essa quantificação em 20 minutos de corrida analítica, utilizando uma coluna de fase reversa C18, com fase móvel composta apenas por água e acetonitrila (55:45, v/v). A determinação foi baseada na conversão de 1-naftol acetato em 1-naftol para estimar a atividade da AChE no comprimento de onda de 280 nm.

Embora o método descrito por Sinha et al. (2022) tenha estabelecido uma base para a quantificação de AChE por CLAE, seu tempo de corrida longo e a falta de aplicação em matrizes complexas, como tecidos de organismos aquáticos representam uma oportunidade de melhoria. Além disso, métodos de extração padrão para AChE podem introduzir interferentes da matriz que comprometem a análise cromatográfica, por este motivo foi empregado uma abordagem de extração adaptada, originalmente desenvolvida para metalotioneínas, com o intuito de superar os desafios de interferência da matriz. Apresentamos aqui uma abordagem simples e de rápida resposta (<10 minutos) para extração e quantificação de acetilcolinesterase por CLAE. É um método com precisão e exatidão adequados para estimar os níveis de AChE em diversos organismos aquáticos, utilizando a AChE como biomarcador, fornecendo assim mais uma metodologia de avaliação de contaminação ambiental para a comunidade científica.

Para validar nossa metodologia de quantificação de AChE em amostras biológicas, aplicamos nosso método em três espécies aquáticas provenientes de diferentes regiões, com diferentes graus de intervenção antrópica. Buscando mais evidências para validar nossa metodologia, determinamos as concentrações dos metais-traço (cobre, cromo, níquel e manganês) nas amostras biológicas e investigamos a associação entre as concentrações de cada metal e a atividade da AChE. Os resultados revelaram uma clara associação (correlação inversa) entre a atividade da AChE e as concentrações dos metais, indicando que a atividade da AChE foi menor nas regiões mais impactadas pelos metais. Ou seja, sugerindo que a presença dos metais nos organismos aquáticos inibe a atividade da AChE, o que é esperado e relatado na literatura, por exemplo o estudo de Mleiki et al. (2017) onde os autores relatam que a atividade da AChE é inibida em moluscos, pela exposição a metais como cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e mercúrio (Hg). Os mesmos autores também apontam que a inibição da AChE apresentou uma relação negativa com a concentração de cádmio e níquel na glândula digestiva e no pé dos moluscos testados.

4.2. Metodologia

4.2.1. Organismos investigados.

Os organismos aquáticos investigados foram moluscos (filo Mollusca, subclasse Gastropoda), girinos (*Rhinella marina*) e alevinos (*Oreochromis niloticus*). A aquisição dos organismos foi realizada em outubro de 2025, em 05 regiões abrangendo áreas com distintos graus de interferência antrópica, e uma região supostamente livre de contaminação. Após a coleta, os espécimes foram prontamente congelados e armazenados para posterior análise em laboratório.

4.2.2. Materiais

Tampão fosfato de sódio (pH 6,8), acetato de 1-naftol (Sigma), 1-naftol (Sigma), acetonitrila, TCEP (Tris 2-carboxietil-fosfina) 1%, Tris-HCl 20 mmol L-1, PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) 0,5 mmol L-1, pH 8,6. Todos os reagentes utilizados com pureza > 99%, sendo em sua maioria adquiridos da Merck.

4.2.3. Procedimento para extração de AChE

Para a metodologia aqui descrita funcionar, foi necessário utilizar reagentes capazes de extrair a AChE sem gerar picos secundários, que causam interferência cromatográfica. A estratégia utilizada foi adaptar o método de Tenório-daussat et al. (2014), que é uma adaptação do método de Erk et al. (2002). Ambos se tratam de metodologias para extração de metalotioneínas, que são proteínas com capacidade de ligação a metais.

Embora o protocolo de extração utilizado tenha sido originalmente desenvolvido para metalotioneínas, é possível quantificar com sucesso a atividade da acetilcolinesterase (AChE). A presença de Tris-HCl em pH 8,6 e de PMSF contribuiu para a preservação da integridade da enzima. Ainda que o protocolo inclui um tratamento térmico a 70 °C por 10 minutos, observou-se atividade suficiente da AChE, confirmando a resistência térmica em tecidos específicos ou proteção enzimática conferida pelas condições do tampão. De Souza et al. (2016), observaram que a enzima apresentou estabilidade térmica até 100°C em tecidos de organismos aquáticos. Esse achado destaca que a enzima obtida desses organismos suporta o protocolo de extração utilizado.

Para cada organismo, foi coletado amostras biológicas, das quais pesou-se aproximadamente 50 mg de tecidos moles para cada espécie investigada, para posterior homogeneização. Após a pesagem, eles foram inseridos no processo de homogeneização, para essa etapa utilizamos 1,0 mL da solução: TCEP (Tris 2-carboxietil-fosfina) 1%, TrisHCl 20 mmol L-1, PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) 0,5 mmol L-1, pH 8,6. Após a utilização das substâncias, o material

passará por uma primeira centrifugação a 20.000 ×g, pelo período de 1 hora. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação, são separados e transferidos para eppendorfs estéreis e aquecidos em banho-maria pelo período de 10 minutos em uma temperatura de 70º C. Após o tratamento térmico em banho-maria, realiza-se uma segunda centrifugação a 20 000 xg pelo período de 30 minutos. Após esssa última centrifugação a fração sobrenadante é destinados a quantificação de Acetilcolinesterase (AChE).

4.2.4 Procedimento para quantificação da AChE

O procedimento para quantificação da AChE foi uma adaptação do método descrito por Sinha et al. (2022). Onde foi alterado o tempo de corrida para apenas 10 minutos, essa alteração favoreceu a rapidez na coleta dos dados, para isso foi necessário utilizar uma coluna cromatográfica menor e ajustar a proporção da fase móvel. Também houve mudança no volume de injeção para que conseguíssemos atingir um limite de detecção e quantificação que o método original.

Coleta-se 100 µL do sobrenadante resultante da extração da Acetilcolinesterase e transfere-se para vial de 2,0 mL, em seguida adiciona-se 500 µL de tampão fosfato de sódio (pH 6,8) e depois 10 µL de 1-naftol acetato 1000 µM. Com a devida homogeneização em vórtex e aguarda-se 20 minutos. Deve-se interromper a reação adicionando 700 µL de acetonitrila. Seguido de homogeneização. Essa solução resultante injeta-se no CLAE.

4.2.5. Condições Cromatográficas

As substâncias foram separadas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 com bomba quaternária) acoplado com uma coluna de fase reversa C18 (100 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm). O amostrador automático Agilent foi usado para injetar amostras (50 µL) no equipamento. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente. A composição isocrática de água de fase móvel acetonitrila: água ultrapurificada (50:50, v/v), bombeada a uma vazão de 1 mL/min forneceu a melhor sensibilidade e separação de compostos de naftol. Todos os padrões de acetato de 1-naftila foram preparados em acetonitrila. A temperatura no forno da coluna foi mantida constante a 25 °C. Em um comprimento de onda de 280 nm, a absorbância foi medida e os dados foram integrados ao software. Geralmente, a reação enzimática ocorre em pH 7 na solução tampão. Portanto, o tampão fosfato foi usado para realizar a reação com as amostras extraídas, e a acetonitrila foi usada para interromper a reação para otimizar a cinética da reação.

4.2.6. Validação do Método Analítico

4.2.6.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método analítico utilizado de identificar ou quantificar o composto de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como substâncias de estrutura química semelhante, diluentes e componentes da matriz (Petrides et al., 2020). Para isso foi injetado no cromatógrafo 50 µL dos dois compostos esperados no cromatograma (1-Naftol e 1-Naftol Acetato). Essa solução foi preparada na concentração de 5,0 µM. Com a intenção de demonstrar a seletividade do método.

Para comprovação da não interferência do diluente ou da solução de extração, realizou-se a injeção de uma solução branco, nessa solução ao invés de adicionar 100 µL da amostra extraída no vial para reação, adicionou-se a solução de extração.

4.2.6.2. Linearidade

Segundo o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), a linearidade é a capacidade de um procedimento analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Isso significa que um aumento na concentração do analito deve resultar em um aumento proporcional na resposta do método analítico. Para verificar a linearidade, o ICH recomenda a análise de pelo menos cinco concentrações diferentes, avaliando a relação entre elas e a resposta obtida. Essa avaliação pode ser feita pelo coeficiente de determinação (R2), que é uma medida descritiva da proporção da variação da resposta instrumental (Y) que pode ser explicada por variações na concentração do analito (X). Quanto mais próximo de 1 estiver o coeficiente de determinação, melhor será o grau de explicação da variação de "Y" em termos da variável "X".

A linearidade é avaliada através da construção de uma curva analítica, na qual são analisadas diferentes concentrações conhecidas da substância de interesse. Para determinar a linearidade do método proposto, preparamos soluções de 1-naftol e 1-naftol acetato com concentrações distintas (0,1 µM, 0,5 µM, 1,0 µM, 2,0 µM, 3,0 µM, 5,0 µM, 7,0 µM e 10,0 µM). Isso foi realizado de forma independente e em triplicata.

4.2.6.3. Intervalo

O intervalo do método é a faixa de concentrações onde o método analítico apresenta precisão, exatidão e linearidade adequadas, avaliado junto com a linearidade. Dessa forma será avaliado do Limite de Quantificação (LQ) ao valor extremo da linearidade (10,0 µM).

4.2.6.4. Precisão e Exatidão

A avaliação da precisão e exatidão em métodos analíticos é crucial para a confiabilidade dos resultados. A precisão de um método analítico refere-se à proximidade dos resultados de análises idênticas, ou seja, confirma se o método entrega resultados semelhantes e confiáveis repetidamente. Sua quantificação é expressa pelo Desvio Padrão Relativo (DPR). Calculamos a precisão das áreas para 1-Naftol e 1-Naftol Acetato para os mesmos pontos da exatidão. A AOAC (1998) considera um método analítico preciso se o DPR for menor ou igual a 11%.

A exatidão avalia a relação entre a concentração obtida na análise e a concentração teórica, relação conhecida como recuperação. A exatidão foi calculada para 1-Naftol e 1-Naftol Acetato pela injeção em triplicata dos pontos: baixo (0,5 μM), médio (5,0 μM) e alto (10,0 μM). De acordo com a AOAC (1998) uma recuperação de 80% - 110% são consideradas satisfatória.

4.2.6.5. Limite de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (LD) do analito é a menor resposta do pico que consegue ser detectável, mas não necessariamente possui exatidão e precisão aceitáveis. Para calcular o LD, utilizou-se a equação 1:

$$LD = \frac{3{,}3 \cdot \sigma}{IC} \quad (1)$$

O Limite de Quantificação (LQ) do analito é a menor resposta do pico que consegue ser quantificado, com exatidão e precisão aceitáveis. Para calcular o LQ, utilizou-se a equação 2:

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \quad (2)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão residual da linha de regressão.

4.2.7. Procedimento para quantificação de metais pesados em organismos aquáticos

Para o procedimento de decomposição ácida dos tecidos moles dos organismos utilizamos uma adaptação de Alves et al. (2017). Foram pesados 250 mg aproximadamente de cada organismo em um tubo digestor de vidro e adicionados 5,0 mL de HNO3 65%. No intuito de evitar perdas por volatilização dos analitos e reagentes durante a decomposição foi utilizado um sistema de refluxo.

A mistura foi aquecida até o ponto de ebulição em um bloco digestor a 150°C por 2 horas, após 90 min, os tubos foram retirados do bloco digestor até a solução atingir a temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 2 mL de H2O2 aos tubos digestores, que retornaram ao bloco digestor até a decomposição completa ou até que toda a gordura da amostra estivesse dissolvida na inspeção visual.

Após resfriamento, a mistura foi transferida para tubos falcon e levadas a um volume final de 14 mL com água deionizada, logo depois centrifugadas por 10 min a 4000 RPM e imediatamente foram apresentadas para determinação dos metais por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS).

4.2.8. Associação entre AChE e metais pesados em organismos aquáticos

Para avaliar a associação entre os níveis de AChE e as concentrações de cada metal traço encontrados nos tecidos moles dos organismos, utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman. Uma medida estatística não-paramétrica que avalia se a relação entre duas variáveis contínuas é monótona. Ou seja, se uma variável aumenta, a outra sempre aumenta (relação monotônica positiva), ou se uma aumenta, a outra sempre diminui (relação monotônica negativa), mas não necessariamente em taxa constante. Os valores do coeficiente de correlação de Spearman podem variar no intervalo de [-1,+1], +1 indicando associação positiva perfeita, -1 associação negativa perfeita, 0 nenhuma associação monótona e valores intermediários podem ser interpretados de acordo com o conceito de força da associação, desse modo Rumsey (2023) traz a seguinte sugestão de tamanhos de efeito:

rs = |±1| → relação linear perfeita;

rs = |±0,70| → relação linear forte;

rs = |±0,50| → relação linear moderada;

rs = |±0,30| → relação linear fraca;

rs = 0 → ausência de relação linear.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Validação do método analítico

4.3.1.1. Seletividade

Conforme os cromatogramas apresentados nas Figuras 1 e 2, os picos de 1-Naftol e 1-Naftol Acetato estão bem separados. O pico do 1-Naftol elui em aproximadamente 3 minutos e o pico de 1-Naftol Acetato em 5 minutos. Eles apresentam boa resolução entre si, ou seja, estão bem separados, além de se apresentarem de maneira simétrica, demonstrando boa reprodutibilidade analítica, o que demonstra características ideais para uma boa quantificação, estando de acordo com as especificações da Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Resultados semelhantes foram obtidos por Sinha et al. (2022), onde os mesmos picos apresentaram separação semelhante, diferindo apenas no tempo de retenção de ambos os compostos, justificado pela diferença do comprimento da coluna cromatográfica e a proporção da fase móvel.

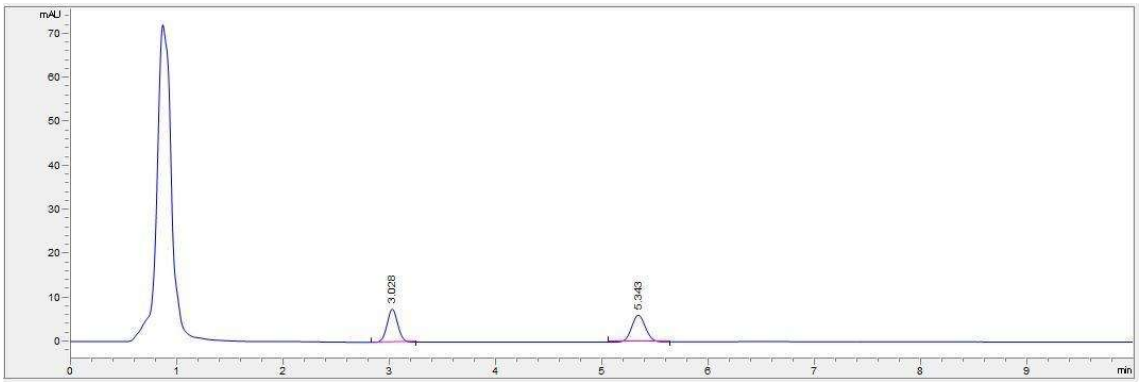


Figura 1. Cromatograma representativo da solução 1-Naftol e 1-Nafol Acetato à 5,0 µM em escala automática.

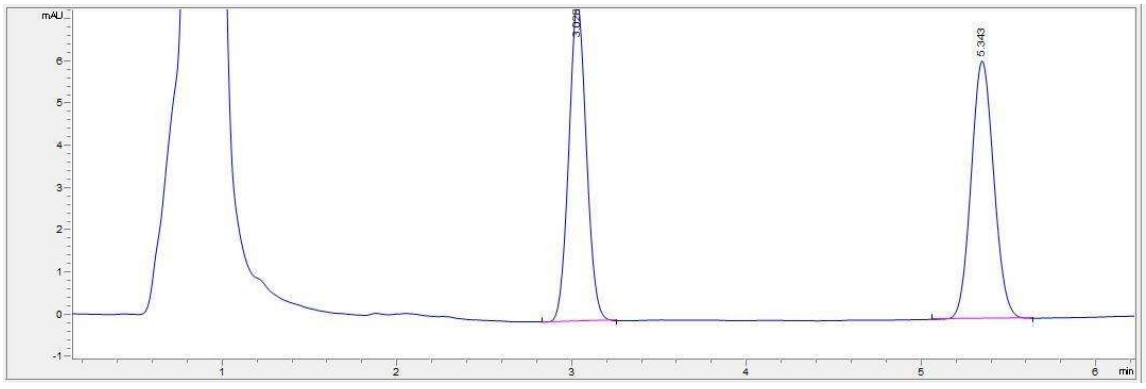


Figura 2. Cromatograma representativo da solução 1-Naftol e 1-Nafol Acetato à 5,0 µM com zoom.

As Figuras 3 e 4 deixam evidentes que na solução branco não há pico coeluindo com o composto que determina a atividade da AChE (1-Naftol), aproximadamente em 3 minutos, como apresentado pelas figuras 1 e 2, já o pico do 1-Naftol Acetato é esperado na solução branco, pois essa

solução é apenas isenta de AChE, mas contém demais reagentes da reação, por isso há a presença do 1-Naftol Acetato no cromatograma, já que é esse composto que reage com a AChE para formação do 1-Naftol. Demonstrado assim que o método possuí seletividade satisfatória.

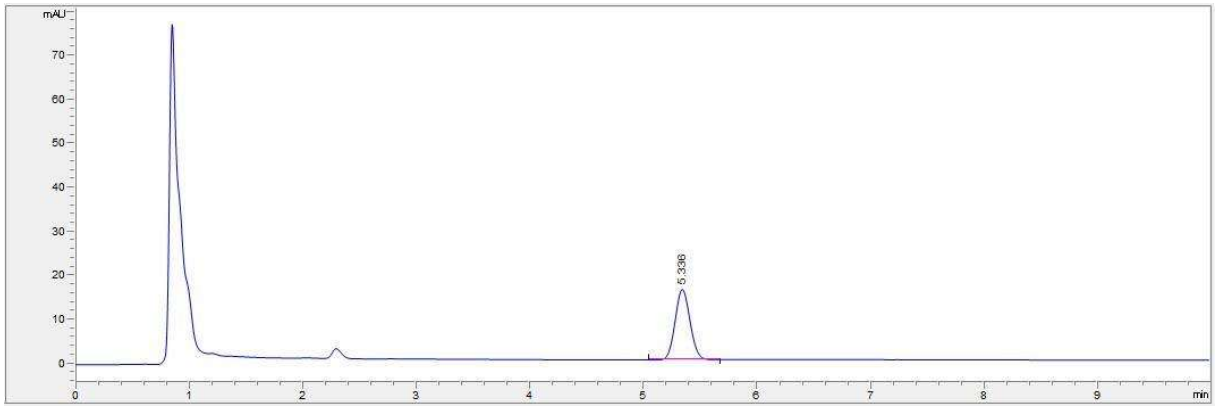


Figura 3. Cromatograma representativo do branco em escala automática.

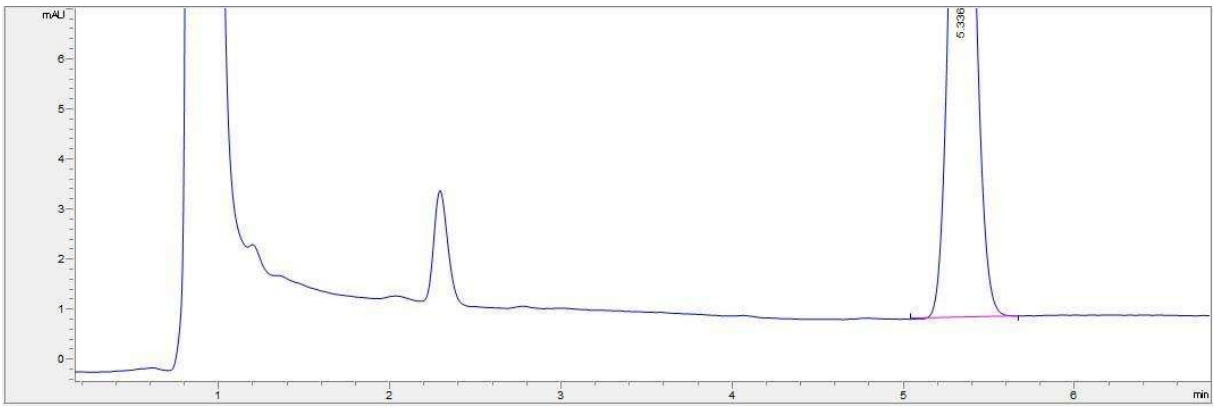


Figura 4. Cromatograma representativo do branco com zoom.

4.3.1.2. Linearidade

Foram realizadas análises de regressão para os dois compostos, e o coeficiente de determinação foi calculado para 1-naftol (R2 = 0,9997) e para 1-naftol acetato (R2 = 0,9977). As equações de regressão foram: y = 9,8662x - 0,8741 para 1-naftol e y = 16,959x - 0,2648 para 1-naftol acetato. As Figuras 5 e 6 ilustram esses resultados:

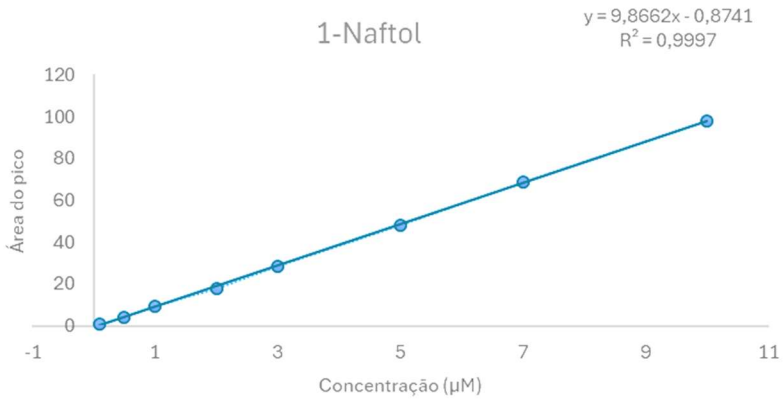


Figura 5. Análise de regressão 1-Naftol.

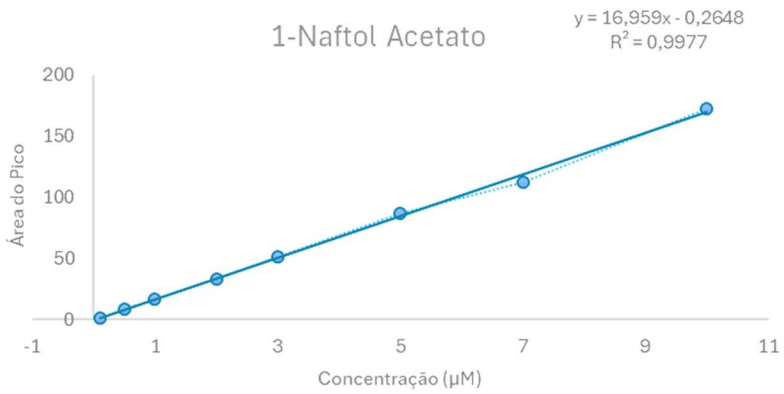


Figura 6. Análise de regressão 1-Naftol Acetato.

Analisando as médias dos resultados encontrados, concluímos que para 1-Naftol a equação da reta da média das linearidades foi expressa da seguinte forma: y = 9,8662x - 0,8741

Onde o coeficiente angular foi de 9,8662 (sensibilidade), o coeficiente linear 0,8741, e o coeficiente de determinação (R2), foi de 0,9997, sugerindo que o modelo é adequado, pois o valor de R2 está indicando que o modelo explica 99,97% da variação em torno da média. O coeficiente de correlação (r) das linearidades apresentou valor de 0,9998, indicando correlação de 99,98% entre as variáveis medidas para 1-Naftol.

Para o 1-Naftol Acetato a equação da reta da média das linearidades foi expressa da seguinte forma: y = 16,959x - 0,2648. Onde o coeficiente angular foi de 16,959 (sensibilidade), o coeficiente linear 0,2648, e o coeficiente de determinação (R2), foi de 0,9977, sugerindo que o modelo é adequado, pois o valor de R2 está indicando que o modelo explica 99,77% da variação em torno da média. O coeficiente de correlação (r) das linearidades apresentou valor de 0,9988, indicando correlação de 99,88% entre as variáveis medidas para 1-Naftol.

Esses resultados são consistentes com os dados obtidos por Sinha et al. (2022), que também encontraram resultados satisfatórios ao analisar essas substâncias. A relação entre as concentrações avaliadas e os valores de R^2 obtidos, sugere que, com um planejamento experimental adequado, a análise por CLAE pode fornecer resultados lineares e confiáveis para diferentes compostos. De fato, como exemplificado por Gülfen et al. (2020), que utilizaram CLAE com detector UV-Vis para analisar amoxicilina, lansoprazol e levofloxacino, é possível obter coeficientes de correlação elevados mesmo quando múltiplos compostos são analisados simultaneamente. Isso reforça a aplicabilidade da técnica para análise quantitativa de substâncias em diferentes contextos analíticos.

4.3.1.3. Precisão e Exatidão

Resultados para precisão e exatidão das duas substâncias são apresentados nas tabelas 1 e 2, representados por DPR(%) e Recuperação(%) respectivamente:

Tabela 1. Resultados – Precisão e Exatidão: 1-Naftol.

Replicata	Área do pico	Concentração teórica (µM)	Concentração obtida (µM)	Recuperação (%)	DPR (%)
1	4,17463		0,5117	102,3	
2	4,21568	0,5	0,5159	103,2	0,73
3	4,23523		0,5179	103,6	
1	47,99552		4,9532	99,1	
2	48,07051	5,0	4,9608	99,2	0,10
3	48,08841		4,9627	99,3	
1	97,78716		9,9999	100,0	
2	97,80650	10,0	10,0019	100,0	0,02
3	97,83139		10,0044	100,0	

Tabela 2. Resultados – Precisão e Exatidão: 1-Naftol Acetato.

Replicata	Área do pico	Concentração teórica (µM)	Concentração obtida (µM)	Recuperação (%)	DPR (%)
1	8,51777		0,5179	103,6	
2	8,44097	0,5	0,5133	102,7	0,68
3	8,40493		0,5112	102,2	
1	86,92511		5,1412	102,8	
2	86,87373	5,0	5,1382	102,8	0,03
3	86,87971		5,1385	102,8	
1	173,26869		10,2325	102,3	
2	173,11325	10,0	10,2234	102,2	0,20
3	172,60023		10,1931	101,9	

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, fica evidente que o método analítico proposto possuí boa precisão (DPR $\leq$ 11%) e exatidão (Recuperação entre 80% - 110%) atendendo assim integralmente às exigências do ICH.

Nota-se que tanto o DPR quanto a recuperação sofreram pouca variação, o que é um reflexo da adaptação realizada no método para melhoria de tais parâmetros. Os autores da metodologia, Sinha et al. (2022), obtiveram recuperações na faixa de 85,2% a 99,6% para o 1-naftol e de 82,6% a 99,3%

para o acetato de 1-naftol. Enquanto nosso método otimizado alcançou 99,1% a 103,6% para 1-naftol e de 101,9% a 103,6% para o acetato de 1-naftol. Na precisão Sinha et al. (2022) optaram por realização em ponto único (sextuplicata na concentração alvo), enquanto optamos por preparações em três níveis (baixo, médio e alto) para uma avaliação mais ampla de possíveis variações, além de testar se o menor ponto (worst case) demonstraria resultado satisfatório. Pelos resultados apresentados e discutidos, fica evidente que o método proposto é preciso e exato.

4.3.1.4. Limite de Detecção e Quantificação

A Tabela 3 apresenta os resultados teóricos e experimentais dos limites de detecção e quantificação para 1-Naftol e 1-Naftol Acetato.

Tabela 3. LD (µM) e LQ (µM) para 1-Naftol e 1-Naftol Acetato.

		1-Naftol (µM)	1-Naftol Acetato(µM)
LD	Teórico	0,19	0,53
	Experimental	0,10	0,10
LQ	Teórico	0,58	1,62
	Experimental	0,50	0,50

Pelos dados visíveis na Tabela 3, observa-se que os resultados experimentais são menores que os teóricos, justificado pelo fato de optarmos por levar a metodologia ao seu limite de detecção e quantificação. Os resultados teóricos foram obtidos pela curva de linearidade e o experimental por extrapolação dessa curva.

Pelos resultados experimentais demonstrados nos itens de linearidade, precisão e exatidão, observa-se que o LD de 0,1 µM e LQ de 0,5 µM é adequado e satisfatório para ambos os compostos.

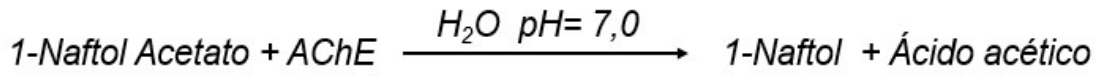
Nota-se que o método proposto apresentou melhor sensibilidade quando comparado ao método desenvolvido por Sinha et al. (2022), que determinou o LD em 2,0568µM e 0,9810µM para o 1-Naftol e 1-Naftol Acetato respectivamente. Evidenciando dessa forma a sensibilidade do método proposto.

Kaviani (2024), realizou um estudo comparativo, onde o autor comparou algumas estratégias para determinação do Limite de Detecção e Quantificação. Foi observado que quando a determinação é baseada apenas na relação sinal-ruído o método atinge menor LD e LQ. Por este motivo, na metodologia aqui validada, foi realizado de dois modos, o teórico baseado na curva de calibração e o

experimental baseado na relação sinal/ruído. Desta maneira, comprovando a sensibilidade da metodologia com os dois resultados.

4.3.2. Mecanismo de reação proposto

A acetilcolinesterase é uma enzima que hidrolisa a acetilcolina em colina e ácido acético, reação essa, essencial para o funcionamento no neurônio colinérgico, para que ele retorne ao seu estado de repouso após a sua ativação (Tsagkaris et al., 2020). Entretanto, a acetilcolinesterase também pode reagir com outros ésteres, como é o caso do 1-Naftol Acetato, devido sua boa atividade esterase. Para isso é necessário que o pH da solução esteja próximo a 7,0, semelhante ao fisiológico, assim como temperatura entre 25-37°C em meio aquoso. Dessa forma a reação proposta é:



Essa reação é proporcional à concentração da Acetilcolinesterase adicionado inicialmente, para provar tal afirmação, fixou-se a concentração do 1-naftol acetato em 1000 µM (em excesso) reagindo com o padrão de Acetilcolinesterase (Sigma), com concentração de 253 unidades/mg, que foi diluído até atingir as concentrações de 0,0472 unidades/mL (baixa) e 9,44 unidades/mL (alta) e realizado a reação determinada na **seção 4.2.4**. E de forma a ilustrar que a reação realmente acontece como descrito, segue os cromatogramas, onde na Figura 7 foi utilizado 0,042 unidades/mL da AChE, já na Figura 8 utilizou-se 9,44 unidades/mL da AChE.

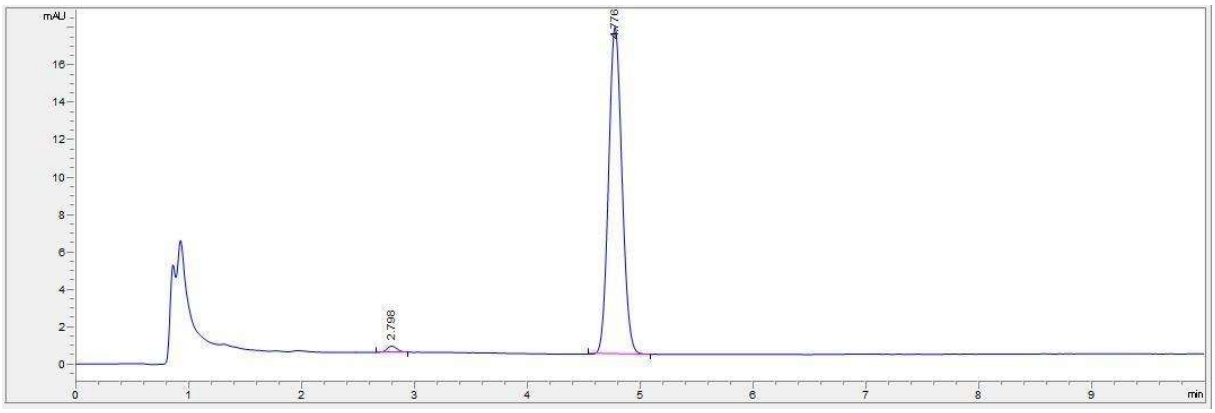


Figura 7. Demonstrativo de formação do 1-Naftol (baixa concentração da AChE).

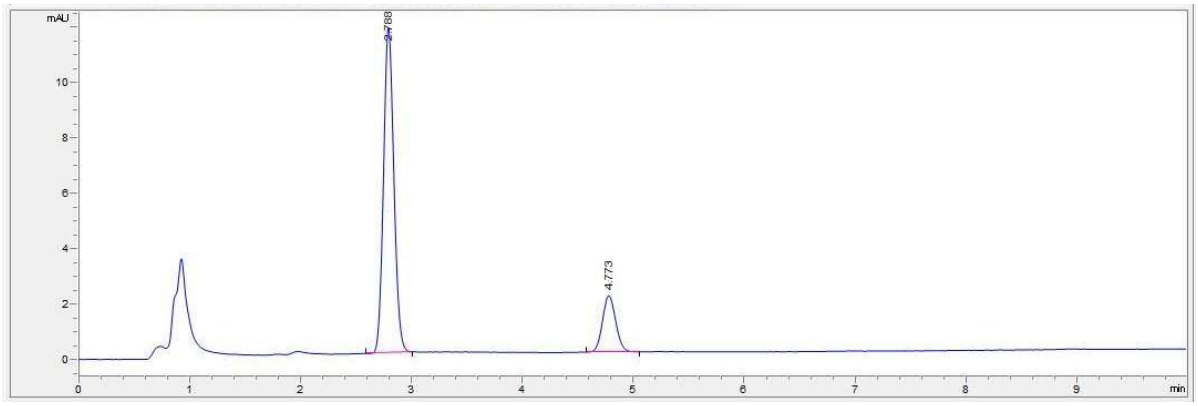


Figura 8. Demonstrativo de formação do 1-Naftol (alta concentração da AChE).

Dessa forma é notório o decaimento do pico em aproximadamente 5 minutos (1-Naftol Acetato) à medida que a concentração da AChE aumenta, formando-se proporcionalmente o pico em aproximadamente 3 minutos (1-Naftol). Fica claro que a reação realmente ocorre como esperado e permite a quantificação adequada da enzima.

4.3.3. Estimativa de AChE nos seres vivos

O método validado foi aplicado às amostras de seres vivos de ambiente aquático para avaliação de possível contaminação. Os níveis da AChE foram determinados a partir de uma curva de calibração do pico de 1-naftol, obtido a partir do padrão de Acetilcolinesterase (Sigma) com concentração de 253 unidades/mg. Esse padrão (AChE) foi diluído até atingir as concentrações 0,0472 unidades/mL, 2,36 unidades/mL, 4,72 unidades/mL, 7,08 unidades/mL e 9,44 unidades/mL, foi utilizado 100 µL de cada uma dessas soluções e realizado a reação determinada na **seção 4.2.4** (substituindo 100 µL da amostra pelo padrão) em triplicata. A seguinte equação da reta foi obtida: y = 9,0667x + 2,7985, com R2 ≥0,993. Conforme gráfico abaixo (Figura 9):

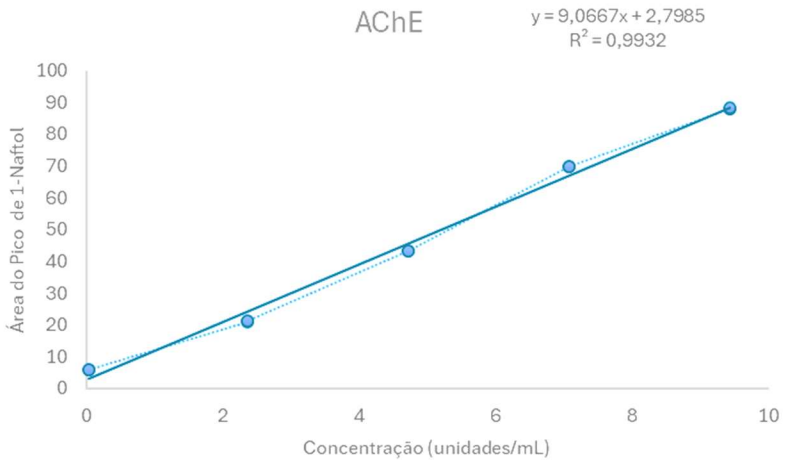


Figura 9. Curva de calibração Acetilcolinesterase (AChE).

Os níveis de acetilcolinesterase (AChE) foram estimados pela equação da reta. Apresentados na tabela abaixo (tabela 4):

Tabela 4. Resultados – Níveis de AChE.

Amostra	Área do pico de 1-Naftol	AChE (Unidades/mL)
Branco	0,0	0,00
Oreochromis niloticus - (Região 3)	37,5	4,44
filo Mollusca, subclasse Gastropoda - (Região 1)	1,7	0,50
Oreochromis niloticus - (Região 2)	13,9	1,84
Rhinella marina - (Região 1)	28,8	3,49
filo Mollusca, subclasse Gastropoda - (Região 3)	4,7	0,83
filo Mollusca, subclasse Gastropoda - (Região 5)	52,6	6,11
Oreochromis niloticus - (Região 4)	0,0	0,00

O molusco (filo Mollusca, subclasse Gastropoda), organismo encontrado na Região 5, foi considerado o ser vivo controle, tendo em vista que possivelmente não houve exposição a contaminantes (pesticidas e/ ou metais). Na tabela 4 podemos observar que os níveis de acetilcolinesterase nos moluscos encontrados nas Regiões 1 e 3 apresentaram baixos níveis, respectivamente (0,50 Unidades/mL e 0,83 Unidades/mL), em comparação ao controle (6,11 Unidades/mL), indicando possível contaminação aquática. Vale lembrar que, os moluscos são seres filtradores e organismos sedentários permanecendo no mesmo local por longos períodos, o que aumenta a exposição contínua a contaminantes e provavelmente bioacumulação.

Já os alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), organismos disponíveis na região 2, 3 e 4 apresentaram estimativas da AChE variando entre 0,0 Unidades/mL à 4,44 Unidades/mL, observamos que esse tipo de organismo apesar do pouco tempo de vida, já indicaram altos níveis de bioacumulação, principalmente na região 4, pois verificamos que quase não apresentou acetilcolinesterase, indicando contaminação aguda. Entretanto, devemos levar em consideração o tipo de organismos encontrados nas diferentes regiões, pois além dos moluscos e alevinos tivemos a possibilidade de analisar também amostras de girinos de sapo cururu (*Rhinella marina*) que apresentou uma estimativa 3,49 unidades/mL. Graças a essa diversidade o objetivo desse artigo foi atendido, visto que o propósito de disponibilizar para a comunidade científica um método simples e rápido para a determinação da acetilcolinesterase como biomarcador com possibilidades de estimar o grau de contaminação em ambientes aquáticos se mostrou viável para diversos tipos organismos.

Outro fator importante é que o método foi validado conforme diretrizes do ICH, conforme Tabela 5, é possível verificar que todos os parâmetros da validação analítica foram satisfatórios:

Tabela 5. Resumo dos resultados da validação analítica.

Parâmetro	Especificação	Resultado

Seletividade	Não apresentar coeluição com as substâncias de interesse, além de proporcionar picos bem resolvidos e com assimetria adequada	De acordo
Intervalo	NA	0,5 µM à 10 µM
Linearidade	$R^2 \geq 0,99$	1-Nafol: $R^2 \geq 0,999$; 1-Naftol Acetato $R^2 \geq 0,997$
Precisão	DPR ≤ 11%	DPR ≤ 0,73%
Exatidão	Recuperação entre 80-110%	99,1% a 103,6%
Limite de Detecção	NA	0,1 µM
Limite de Quantificação	NA	0,5 µM

4.3.4. Associação entre AChE e metais pesados

A Tabela 6 apresenta os teores de metais pesados encontrados nos tecidos moles dos organismos, assim como sua associação com AChE.

Tabela 6. Associação entre metais traço e AChE

Amostras	Cu (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Mn (mg/kg)	AChE (Unidades/mL)
Oreochromis niloticus - (Região 3)	5,864	7,334	6,585	49,302	4,44
Oreochromis niloticus - (Região 2)	215,322	475,627	245,897	2251,527	1,84
filo Mollusca, subclasse Gastropoda - (Região 3)	51,978	133,784	53,681	573,084	0,83
filo Mollusca, subclasse Gastropoda - (Região 5)	5,101	7,463	6,635	76,902	6,11

É possível observar que quanto menor a quantidade da AChE, maior é a concentração de metais pesados em cada um dos organismos (*Oreochromis niloticus* e molusco Gastropoda). A atividade da acetilcolinesterase diminuiu nas regiões mais contaminadas por metais traço, indicando efeitos neurotóxicos.

A Tabela 7 apresenta a associação entre os teores de metais traço e os teores de AChE encontrados nos tecidos moles dos organismos. A associação foi quantificada pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Spearman (AChE x cada metal).

Elemento Químico	Cu	Cr	Ni	Mn
Coeficiente de correlação de Spearman	-0,8	-0,6	-0,8	-0,6

O coeficiente de correlação de Spearman entre os metais traço e a AChE foi de -0,6 a -0,8, demonstra uma correlação moderada a forte, evidenciando uma relação importante da presença desses

metais nos tecidos dos organismos testados. Além disso, podemos destacar que a associação foi de natureza “inversamente proporcional”, ou seja, em média tecidos que apresentaram maiores teores dos metais pesados, apresentaram menores teores de acetilcolinesterase. Essa associação pode ser utilizada como um guia na busca de possíveis fontes de contaminação dos ambientes aquáticos.

Estes resultados reforçaram o papel da AChE como um biomarcador de estresse neurotóxico geral ao demonstrar uma correlação inversa entre a atividade da enzima e as concentrações de cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni) e manganês (Mn) nos tecidos dos organismos aquáticos. A associação inversamente proporcional, evidencia a natureza inibitória desses metais na atividade da AChE. Essa descoberta não apenas válida a sensibilidade do método proposto em refletir o impacto de diferentes classes de poluentes, mas também sublinha a importância de considerar a contaminação por metais traço como um fator contribuinte para a neurotoxicidade em ecossistemas aquáticos.

4.4. Conclusão

Foi protocolado uma nova metodologia de extração para Acetilcolinesterase, capaz de extrair esta enzima de organismos aquáticos com sucesso, a partir de uma reação química, a qual conseguiu estimar e/ou determinar a quantidade de acetilcolinesterase presente nos seres vivos testados. A metodologia por CLAE foi adequada à finalidade a qual foi destinada, demonstrada a sua eficiência pela validação analítica apresentada, com parâmetros dentro dos limites especificados pelo ICH. Foi possível apresentar uma correlação inversa entre a atividade da enzima e as concentrações de metais traço, demonstrando a atividade inibitória desses metais na atividade da AChE.

Dessa forma, esta pesquisa não apenas apresenta uma alternativa aos métodos tradicionais, mas também fornece uma ferramenta importante para estudos de toxicologia ambiental. A eficácia e rapidez do ensaio, com um tempo de análise de aproximadamente 10 minutos, o tornam ideal para a incorporação em programas de monitoramento e para avaliações de risco ecológico. As implicações deste método se estendem à vigilância ambiental e à saúde pública, oferecendo um meio adequado para a detecção precoce de contaminação por agrotóxicos e outros poluentes neurotóxicos em ambientes aquáticos.

Referências

Antonijevic, E., Musilek, K., Kuca, K., Djukic-Cosic, D., Curcic, M., Miladinovic, D. C., Antonijevic, B, 2018. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor in rat erythrocytes. Food and Chemical Toxicology, 121, 224-230. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.065.

Battaglin, W., Fairchild, J, 2002. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. Water Science and Technology, 45(9), 95-103. https://doi.org/10.2166/wst.2002.0213.

Carnib, B. L., de Oliveira, J. M., do Nascimento, Z. M. F., Garibaldi, G. T. T., Pinto, T. K., Rocha, T. L., et al., 2025. Ecotoxicological impact of residual polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the largest Brazilian marine protected area: a multibiomarker approach in the marine clam Tivela mactroides. Environmental Pollution, 126653. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126653.

Chase, R., 2002. Behavior and its Neural Control in Gastropod Molluscs. New York: Oxford. University Press.

Cruz-Santiago, O., Flores-Ramírez, R., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Méndez-Rodríguez, K. B., Cilia-López, V. G., Espinosa-Reyes, G., & González-Mille, D. J, 2023. Levels of persistent organic pollutants in cane toads (Rhinella marina) differ among sites with varying industrial and agricultural activities. Environmental Toxicology and Pharmacology, 103, 104280. https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104280.

da Silva Lucas, R. M., Gonçalves, F. J., Rodrigues, F. A., de Oliveira, L. C. C, 2025. Acetylcholinesterase Activity Evaluated in Molluscs–A Bibliometric Analysis. Brazilian Journal of Development, 11(1), e76398-e76398. https://doi.org/10.34117/bjdv11n1-001.

Duran, H. E., Beydemir, Ş, 2024. Naphthoquinones and anthraquinones: Exploring their impact on acetylcholinesterase enzyme activity. Biotechnology and Applied Biochemistry, 71(5), 1079-1093. https://doi-org.ez98.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bab.2599.

Durieux, E.D. H., Farver, T.B., Fitzgerald, P.S., Eder, K.J., Ostrach, D.J., 2011. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-OfYearstriped bass (Morone saxatilis). Fish Physiol Biochem 37, 21-29. https://doi.org/10.1007/s10695-010-9412-9.

El-Gendy, K. S., Gad, A. F., Radwan, M. A, 2021. Physiological and behavioral responses of land molluscs as biomarkers for pollution impact assessment: A review. Environmental Research, 193, 110558. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110558.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology, 7(2), 88-95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Erk, M., Ivanković, D., Raspor, B., Pavičić, J, 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. Talanta, 57(6), 1211-1218. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00239-4.

Gülfen, M., Canbaz, Y., Özdemir, A, 2020. Simultaneous determination of amoxicillin, lansoprazole, and levofloxacin in pharmaceuticals by HPLC with UV–Vis detector. Journal of Analysis and Testing, 4(1), 45-53. https://doi.org/10.1007/s41664-020-00121-4.

Hafed-Khatiri, S., Salinas-Torres, D., Montilla, F, 2025. Assessing acetylcholinesterase catalytic activity in the marine environment. Electrochimica Acta, 521, 145930.. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145930.

Kandy, AT, Venkatesan, R., Mohan, D., Chadapullykolumbu Ismail, S., Jupudi, S., Selvaraj, D, 2025. Inibidores da acetilcolinesterase a partir de andaimes heterocíclicos fundidos com carbamato e benzo: Terapêutica promissora para a doença de Alzheimer. Medicinal Chemistry Research, 1-12. https://doi.org/10.1007/s00044-025-03410-8.

Kaviani, R, 2024. Comparison of different approaches for calculating LOD and LOQ in an HPLC-based analysis method. Pharmaceutical Sciences, 31(1), 106-109. https://doi.org/10.34172/PS.2024.40452.

Klobučar, G. I., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzović Hackenberger, B., Hylland, K, 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (Cyprinus carpio). Ecotoxicology, 19(1), 77-84. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0390-6.

Li, Z., Li, F., Qin, S., Guo, F., Wang, S., Zhang, Y, 2024. Environmental DNA biomonitoring reveals the human impacts on native and non-native fish communities in subtropical river systems. Journal of Environmental Management, 349, 119595. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119595.

Lima, A. D., Junior, G. R. C., Dos Santos, R. P., Oliveira, J. M., de Sousa, B. L. C., de Jesus, L. W. O., Cavalcante, R. M, 2025. Unraveling the differences between pyrolytic and petrogenic sources in oiled areas of the South Atlantic: An analytical method for biliary PAHs. Marine environmental research, 205, 106979. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2025.106979.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T, 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. BioMed research international, 2013(1), 321213. https://doi.org/10.1155/2013/321213.

Liu, M., Deng, P., Li, G., Liu, H., Zuo, J., Cui, W., ... Luan, N, 2024. Neurotoxicity of Combined Exposure to the Heavy Metals (Pb and As) in Zebrafish (Danio rerio). Toxics, 12(4), 282. https://doi.org/10.3390/toxics12040282.

Matthews, G, 2015. Pesticides: health, safety and the environment. Seond Edition. John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1002/9781118975923.

Mleiki, A., Marigómez, I., El Menif, N. T, 2017. Green garden snail, Cantareus apertus, as biomonitor and sentinel for integrative metal pollution assessment in roadside soils. Environmental Science and Pollution Research, 24(31), 24644-24656. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0091-2.

Naigaga, I., Kaiser, H., Muller, W. J., Ojok, L., Mbabazi, D., Magezi, G., Muhumuza, E, 2011. Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: a case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. Physics and Chemistry of the Earth, parts A/B/C, 36(14-15), 918-928. https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.07.066.

Omar, W. A., Mikhail, W. Z., Abdo, H. M., Abou El Defan, T. A., Poraas, M. M, 2015. Ecological risk assessment of metal pollution along greater Cairo sector of the river Nile, Egypt, using nile tilapia, Oreochromis niloticus, as Bioindicator. Journal of toxicology, 2015(1), 167319. https://doi.org/10.1155/2015/167319.

Petrides, A. K., Dahlin, J. L., Melanson, S. E, 2020. Method validation. In Contemporary Practice in Clinical Chemistry (pp. 57-75). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00004-1.

Qureshi, I. Z., Kashif, Z., Hashmi, M. Z., Su, X., Malik, R. N., Ullah, K., et al., 2015. Assessment of heavy metals and metalloids in tissues of two frog species: Rana tigrina and Euphlyctis cyanophlyctis from industrial city Sialkot, Pakistan. Environmental Science and Pollution Research, 22(18), 14157-14168. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4454-2.

Rumsey, D. J, 2023. What is r value correlation. Statistics for dummies. Available online: https://www.dummies.com/article/academics-the-arts/math/statistics/how-to-interpret-a-correlation-coefficient-r-169792/ (accessed on 21 December 2025).

Santos, M. C., Botelho, F. D., Gonçalves, A. S., Kuca, K., Nepovimova, E., Cavalcante, S. F., ... França, T. C, 2022. Theoretical assessment of the performances of commercial oximes on the reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the nerve agent A-242 (novichok). Food and Chemical Toxicology, 165, 113084.. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113084.

Schwab, A., Horn, G., Kehe, K., Worek, F., Amend, N, 2025. A simple acetylcholinesterase inhibition assay for the quantification of the nerve agent VX: Application in a Franz cell model with rat skin and various decontaminants. Toxicology Letters, 404, 20-27. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.01.002.

Sinha, S. N., Ungarala, R., Kumar, D., Sangaraju, R., Kumar, S, 2022. A novel RP-HPLC method for quantification of cholinesterase activity in human blood: An application for assessing organophosphate and carbamate insecticide exposure. PLoS One, 17(12), e0279287. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279287.

Tenório-Daussat, C. L., Resende, M. C. M., Ziolli, R. L., Hauser-Davis, R. A., Schaumloffel, D., Saint'Pierre, T. D, 2014. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. Talanta, 120, 491-497. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.070.

Tsagkaris, A. S., Uttl, L., Pulkrabova, J., Hajslova, J, 2020. Screening of carbamate and organophosphate pesticides in food matrices using an affordable and simple spectrophotometric acetylcholinesterase assay. Applied Sciences, 10(2), 565. https://doi.org/10.3390/app10020565.

Wang, H., Hou, E., Xu, N., Wu, J., Gao, S., Nie, P., ... Xie, J, 2025. Acetylcholinesterase-assisted photoelectrochemical solution gated graphene field-effect transistor for organophosphates pesticide detection. Food Chemistry, 144631. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144631.

Wells, Kentwood D. The Ecology and Behavior of Amphibians, Chicago: University of Chicago Press, 2007. https://doi.org/10.7208/9780226893334.

Zhu, C. H., Luo, X. J., Chen, X., Chen, P. P., Guan, K. L., Zeng, Y. H., Mai, B. X., 2025. Species- and sex-specific bioaccumulation, tissue-specific distribution, and maternal transfer of per-and polyfluoroalkyl substances in tiger frogs (Hoplobatrachus chinensis) and forest frogs (Rana chensinensis). Environmental Research, 122633. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122633.

5.1. ASPECTOS GERAIS

A presente pesquisa buscou preencher uma lacuna metodológica na área da toxicologia ambiental, propondo, desenvolvendo e validando um novo método para extração e quantificação de acetilcolinesterase (AChE) em organismos aquáticos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção UV, correlacionando os níveis de AChE com a concentração de metais pesados. Os resultados apresentados demonstram que o método analítico utilizado é seletivo, conforme evidenciado separação dos picos de interesse (1-Naftol e 1-Naftol Acetato) demonstrando haver resolução entre eles e demais picos, e a ausência de interferências da matriz ou diluente, aspecto crítico para análises em amostras biológicas complexas.

A linearidade do método foi apresentada pelos resultados dos coeficientes de determinação ($R^2 > 0,999$ para 1-Naftol e $R^2 > 0,997$ para 1-Naftol Acetato), indicando uma relação linear entre a concentração e a resposta instrumental ao longo do intervalo analítico. Além disso, a precisão e exatidão do método foram verificadas através de recuperações dentro dos limites aceitáveis, assim como baixos desvios padrão relativos, atendendo às exigências do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH), assegurando a confiabilidade e repetibilidade do método.

O limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ), calculados teoricamente (0,19 µM e 0,58 µM para 1-Naftol; 0,53 µM e 1,62 µM para 1-Naftol Acetato, respectivamente) e confirmados experimentalmente com concentrações ainda menores (0,1 µM para LD de ambos os compostos, assim como LQ de 0,5 µM), demonstram a sensibilidade do método para detectar e quantificar a ambos os picos, mesmo em baixas concentrações, o que é fundamental para o biomonitoramento em ambientes aquáticos.

A demonstração do mecanismo de reação proposto, com a formação proporcional de 1-Naftol a partir do 1-Naftol Acetato na presença da AChE, validou a base química para a quantificação enzimática. A aplicação em amostras reais os níveis de acetilcolinesterase nos moluscos encontrados nas Regiões 1 e 3 apresentaram baixos níveis, respectivamente (0,50 Unidades/mL e 0,83 Unidades/mL), em comparação ao controle (6,99 Unidades/mL), indicando possível contaminação aquática. Lembrando que os moluscos são seres filtradores e organismos sedentários, dessa forma aumenta a exposição contínua a contaminantes e provavelmente bioacumulação.

Já os alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), organismos disponíveis na região 2, 3 e 4 apresentaram estimativas da AChE variando entre 0,0 Unidades/mL à 4,44 Unidades/mL, observamos que esse tipo de organismo apesar do pouco tempo de vida, já indicaram altos níveis de bioacumulação, principalmente na região 4, pois verificamos que quase não apresentou acetilcolinesterase, indicando contaminação aguda. Entretanto, devemos levar em consideração o tipo de organismos encontrados nas diferentes regiões, pois além dos moluscos e alevinos tivemos a possibilidade de analisar também amostras de girinos de sapo cururu (*Rhinella marina*) que apresentou uma estimativa 3,49 unidades/mL. Graças a essa diversidade o objetivo desse artigo foi atendido, visto que o propósito de disponibilizar para a comunidade científica um método simples e rápido para a determinação da acetilcolinesterase como biomarcador com possibilidades de estimar o grau de contaminação em ambientes aquáticos se mostrou viável para diversos tipos organismos.

Vale ressaltar que a inibição da AChE não se limita ao indivíduo exposto. Em um nível populacional, implica na redução da sobrevivência individual, combinada com a diminuição da capacidade reprodutiva, pode levar a um declínio populacional dos seres que vivem nesse ecossistema aquático. A interferência na reprodução pode ocorrer por diversos mecanismos: a inibição da AChE pode afetar a liberação de hormônios reprodutivos, o desenvolvimento gonadal, o comportamento de acasalamento e até mesmo a viabilidade de gametas e larvas (FULTON; KEY, 2001, OLIVARES-RUBIO *et al*., 2021).

A abordagem cromatográfica por CLAE apresentada nesta pesquisa, demonstra uma seletividade adequada, separando visualmente os componentes da reação enzimática e permitindo a detecção exata do 1-Naftol sem interferência ou coeluição. Tal avanço é crucial para o monitoramento ecotoxicológico, onde os organismos estão frequentemente expostos a um coquetel de poluentes, e onde métodos mais robustos e específicos são fundamentais.

A adaptação do protocolo de extração de metalotioneínas, originalmente descrito por Erk *et al*. (2002) e adaptado por Tenório-Daussat *et al*. (2014), sofreu uma nova abordagem para conseguir extrair com sucesso a AChE, mostrando-se eficaz para este fim. A presença de componentes como Tris-HCl em pH 8,6 e PMSF no tampão de extração contribuiu para a preservação da integridade da enzima durante o processo, enquanto o tratamento térmico a 70°C por 10 minutos, embora incomum para algumas enzimas, não comprometeu a atividade da AChE, corroborando achados de Souza (2016) que observou estabilidade térmica da enzima até 100°C em tecidos de organismos aquáticos. Isso destaca a estabilidade da AChE obtida desses organismos e a adequação do protocolo de extração.

Também é importante frisar que pelo coeficiente de correlação de Spearman entre os metais traço e a AChE foi possível evidenciar uma relação importante da presença desses metais nos tecidos dos organismos testados, reforçando significativamente o papel da Acetilcolinesterase (AChE) como um biomarcador de estresse neurotóxico. Foi possível estabelecer uma correlação inversa estatisticamente relevante entre a atividade desta enzima e as concentrações teciduais de metais traço, especificamente Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Manganês (Mn). Tal associação inversamente proporcional evidencia o mecanismo de ação desses elementos: à medida que a bioacumulação dos metais aumenta, a capacidade catalítica da enzima é suprimida, confirmando a natureza inibitória desses contaminantes inorgânicos sobre o sistema colinérgico dos organismos aquáticos. Essa associação pode ser utilizada como um guia na busca de possíveis fontes de contaminação dos ambientes aquáticos.

Em síntese, o presente estudo representa uma contribuição original e significativa para o campo da toxicologia ambiental ao propor essa nova abordagem. Desta forma, o conhecimento gerado nesta pesquisa pode ser diretamente incorporado em protocolos de monitoramento ambiental e avaliação da qualidade de ecossistemas aquáticos, fornecendo dados mais fidedignos para a tomada de decisões. A aplicabilidade do método transcende a esfera acadêmica, podendo subsidiar a implementação e o aprimoramento de políticas públicas voltadas à preservação de ecossistemas e à vigilância da saúde ambiental, particularmente em regiões sujeitas à contaminação por pesticidas e metais pesados. Assim, a dissertação não apenas avança o conhecimento científico sobre a quantificação de biomarcadores em ecossistemas aquáticos, mas também oferece uma ferramenta prática para a proteção da biodiversidade e da saúde pública.

5.2. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi protocolado uma nova metodologia de extração para Acetilcolinesterase, capaz de extrair esta enzima de organismos aquáticos com sucesso;
- Realizado uma proposta de reação química, a qual conseguiu estimar e/ou determinar a quantidade de acetilcolinesterase presente nos seres vivos testados;
- A metodologia adaptada para CLAE foi adequada à finalidade a qual foi destinada, demonstrada a sua eficiência pela validação analítica apresentada, com parâmetros dentro dos limites especificados pelo ICH;
- Foi possível apresentar uma correlação inversa entre a atividade da enzima e as concentrações de Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Manganês (Mn) nos tecidos dos organismos vivos.

5.3. PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A pesquisa aqui descrita teve enfoque na inibição da AChE como um biomarcador de estresse neurotóxico, demonstrando esse efeito cumulativo de diversos poluentes, sem caracterizar qual poluente. Para investigações futuras, seria interessante aprofundar para a identificação e quantificação de contaminantes específicos presentes nas regiões analisadas (como pesticidas organofosforados, carbamatos ou metais pesados).

A relação entre a concentração desses poluentes e os níveis de inibição da AChE, utilizando técnicas analíticas complementares, como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida também acoplada a espectrometria de massas, ou espectrometria de absorção atômica, permitiria uma compreensão mais detalhada das relações de causa e efeito. Adicionalmente, estudos sobre os efeitos sinérgicos e antagônicos desses poluentes na atividade da AChE seriam cruciais para simular cenários de exposição em ambientes aquáticos.

6 REFERÊNCIAS

ABU SHNAF, A. S. M; ABD EL-AZIZ, S. H.; ATA, A. M. Cyto-histopathological and protein polymorphism alterations in five populations of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) as biomonitor for water heavy metal pollution. **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 3, p. 999-1009, 2021.

ADEYINKA, A.; PATEL, A.; KONDAMUDI, N. P. Cholinergic crisis. in: **Stat Pearls**. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, 2025.

AHMED, R. **High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, applications, versatility, efficiency, innovation and comparative analysis in modern analytical chemistry and in pharmaceutical sciences**. 2024.

ALMAMOORI, A. M.; SALMAN, J. M. Molecular markers in molluscs as biomonitoring species. **Research Aspects in Biological Science**, v. 3, p. 118-23, 2022.

ALVES, MARCELO M. *et al*. Evaluation of the concentration of Cu, Zn, Pb and Cr in different fish species from the São Gonçalo Channel in Pelotas-RS, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 285-296, 2018.

ANTONIJEVIC, E. *et al*. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor in rat erythrocytes. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 121, p. 224–230, 2018.

ATKINS, P.; STAINBACK, L. What does your proficiency testing (PT) prove? A look at inorganic analyses, proficiency tests, and contamination and error, part I. **Spectroscopy (Springfield, Or.)**, p. 9–14, 2022.

AUGUSTINSSON, K. B.; ERIKSSON, H.; FAIJERSSON, Y. A new approach to determining cholinesterase activities in samples of whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 89, n. 2, p. 239-252, 1978.

BALLESTEROS, M.L., *et al*. Multi-biomarker responses in fish (Jenynsia multidentata) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. **Science of the Total Environment**, 595: 711–722, 2017.

BATTAGLIN, W., FAIRCHILD, J. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. **Water Science and Technology**, 45(9), 95-103, 2002.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. julho, 2017.

CARNIB, BIANCA LEITE *et al*. Ecotoxicological impact of residual polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the largest Brazilian marine protected area: a multibiomarker approach in the marine clam Tivela mactroides. **Environmental Pollution**, p. 126653, 2025.

CARVALHO, B. M. Validation of an Analytical Method by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization and Evaluation of Matrix Effect of Volatile Compounds in Cat Food. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 8, p. 1130–1138, 2023.

CHENG, W. L. *et al*. Calibration practices in clinical mass spectrometry: Review and recommendations. **Annals of laboratory medicine**, v. 43, n. 1, p. 5–18, 2023.

COLOVIĆ, M. B. *et al*. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COSKUN, A. Are your laboratory data reproducible? The critical role of imprecision from replicate measurements to clinical decision-making. **Annals of laboratory medicine**, v. 45, n. 3, p. 259–271, 2025.

CRUZ-ESQUIVEL, Á.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J.. Genetic damage in Rhinella marina populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sinú River, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27392-27401, 2017.

DHIMAN, V.; PANT, D. Environmental biomonitoring by snails. **Biomarkers**, v. 26, n. 3, p. 221-239, 2021.

DAVEREY, A. Advances in yeast biotechnology for biofuels and sustainability: Value-added products and environmental remediation applications. **Elsevier**, 2023.

DAWSON, A. **Neurotoxic Effects of Low-level Organophosphate Exposure in C. elegans and UK Agricultural Workers**. Tese de Doutorado. Open University (Reino Unido), 2023.

DEBNATH, S. Advances in chromatography: contemporary techniques and applications. **Essential Chem**, p. 1–27, 2025.

DE SOUZA, P. R.; DE SOUZA, K. S.; DE ASSIS, C. R. D.; DE ARAÚJO, M. C.; SILVA, K. C. C.; DA SILVA, J. D. F. X.; DE SOUZA BEZERRA, R. Acetylcholinesterase of mangrove oyster Crassostrea rhizophorae: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, 197, 109-121, 2018.

DURAN, H. E.; BEYDEMIR, Ş. Naphthoquinones and anthraquinones: Exploring their impact on acetylcholinesterase enzyme activity. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 71, n. 5, p. 1079–1093, 2024.

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

ELRAYESS, R. A., *et al*. Histopathology and Ultrastructure in Liver and Gonads of the Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) as a Bio-Monitor for Water Quality Assessment in Lake Manzalah. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v. 26, n. 6, 2022.

ERK, M. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**, v. 57, n. 6, p. 1211–1218, 2002.

FORSBERG, E. M.; GREEN, J. R. A; BRENNAN, J. D. Continuous flow immobilized enzyme reactor–tandem mass spectrometry for screening of AChE inhibitors in complex mixtures. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 13, p. 5230-5236, 2011.

FU, H. *et al*. Acetylcholinesterase is a potential biomarker for a broad spectrum of organic environmental pollutants. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 15, p. 8065–8074, 2018.

FULTON, M. H.; PETER, B. Inibição da acetilcolinesterase em peixes e invertebrados estuarinos como indicador de exposição e efeitos de inseticidas organofosforados. **Environmental Toxicology and Chemistry**, n. 1, p. 37–45, 2001.

GAJENDRA, K. *et al*. Natural acetylcholinesterase inhibitors: A multi-targeted therapeutic potential in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 11, n. 100154, p. 100154, 2024.

GARRIDO, B. C. *et al*. Assessing limits of detection in qualitative methods: A simple implementation of logistic regression in a web-based R Shiny application environment and its potential in toxicology and doping control. **Drug testing and analysis**, v. 15, n. 1, p. 66–74, 2023.

GHAFAR, M. T.; ABDEL; EL-MASRY, M. I. Verificação de métodos analíticos quantitativos em laboratórios médicos. **Journal of medical biochemistry**, 2021.

GÜLFEN, M., CANBAZ, Y., ÖZDEMIR, A. Simultaneous determination of amoxicillin, lansoprazole, and levofloxacin in pharmaceuticals by HPLC with UV–Vis detector. **Journal of Analysis and Testing**, 4(1), 45-53, 2020.

HAFED-KHATIRI, S.; SALINAS-TORRES, D.; MONTILLA, F. Assessing acetylcholinesterase catalytic activity in the marine environment. **Electrochimica acta**, v. 521, n. 145930, p. 145930, 2025.

HECKO, S. *et al*. Enlightening the path to protein engineering: Chemoselective turn-on probes for high-throughput screening of enzymatic activity. **Chemical reviews**, v. 123, n. 6, p. 2832–2901, 2023.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R2)**. November, 2023.

JALI, A. M. Organophosphate and carbamate toxicity: Understanding, diagnosing and treating poisoning. **Journal of pioneering medical sciences**, v. 13, n. 7, p. 59–103, 2024.

KRUZYNSKI, GEORGE. M. Cadmium in oysters and scallops: the BC experience. **Toxicology Letters**, v. 148, n. 3, p. 159-169, 2004.

KANDY, A. T. *et al*. Acetylcholinesterase inhibitors from carbamate and Benzo-fused heterocyclic scaffolds: Promising therapeutics for Alzheimer's disease. **Medicinal chemistry research: an international journal for rapid communications on design and mechanisms of action of biologically active agents**, v. 34, n. 6, p. 1200–1211, 2025.

KAVIANI, R. Comparison of different approaches for calculating LOD and LOQ in an HPLC-based analysis method. **Pharmaceutical Sciences**, 31(1), 106-109, 2024.

KLOBUČAR, G. I. *et al*., Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (Cyprinus carpio). **Ecotoxicology**, 19(1), 77-84, 2010

LIONETTO, M. G. Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives. **Ecotoxicology around the globe**. p. 87–115, 2011.

LIONETTO, M. G. *et al*. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

LI, Z. *et al*., Environmental DNA biomonitoring reveals the human impacts on native and non-native fish communities in subtropical river systems. **Journal of Environmental Management**, 349, 119595, 2024.

LIMA, A. D. *et al*., Unraveling the differences between pyrolytic and petrogenic sources in oiled areas of the South Atlantic: An analytical method for biliary PAHs. Marine environmental research, 205, 106979, 2025.

LIU, M. *et al*. Neurotoxicity of combined exposure to the heavy metals (Pb and as) in zebrafish (Danio rerio). **Toxics**, v. 12, n. 4, p. 282, 2024.

LUCAS, R. M. DA S. *et al*. Acetylcholinesterase activity evaluated in molluscs – A bibliometric analysis. **Brazilian Journal of Development**, v. 11, n. 1, p. e76398, 2025.

MARSON, B. *et al*. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on hplc methods. **Quimica nova**, 2020.

MATTHEWS, G. A. **Pesticides: Health, safety and the environment**. Wiley, 2015.

MCCOY, K. A., *et al*. Giant toads (Rhinella marina) living in agricultural areas have altered spermatogenesis. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1230-1237, 2017.

MICHELS. G; LEHR, M. Ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV para avaliação de inibidores de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** , 44 (5–6), 309–319, 2021.

MLEIKI, A.; MARIGÓMEZ, I.; EL MENIF, N. T. Green Garden snail, Cantareus apertus, as biomonitor and sentinel for integrative metal pollution assessment in roadside soils. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(31), 24644-24656, 2017.

NAIGAGA, I. *et al*., Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: a case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. **Physics and Chemistry of the Earth**, 36(14-15), 918-928, 2011.

OLIVARES-RUBIO, H. F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. **Chemosphere**, v. 264, n. Pt 1, p. 128401, 2021.

Omar, W. A. *et al*., Ecological risk assessment of metal pollution along greater Cairo sector of the river Nile, Egypt, using nile tilapia, Oreochromis niloticus, as Bioindicator. **Journal of toxicology**, 2015(1), 167319, 2015.

ORTIZ-MARTÍNEZ, M. Enhancing Sensitivity and Selectivity in Pesticide Detection: A Review of Cutting-Edge Techniques. **Environmental Toxicology and Chemistry**. p. 1468–1484, 2024.

PÁEZ-OSUNA, F., *et al*. Tilapia as a model fish for biomonitoring of metal pollution in dams associated with mining watersheds: contrasting diagnosis from different tissues and health risk assessment. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 46, n. 11, p. 447, 2024.

PETRIDES, A. K.; DAHLIN, J. L.; MELANSON, S. E. F. Method validation. in: **Contemporary Practice in Clinical Chemistry**. Academic Press. p. 57–75. Elsevier, 2020.

QURESHI, I. Z. *et al*., Assessment of heavy metals and metalloids in tissues of two frog species: Rana tigrina and Euphlyctis cyanophlyctis from industrial city Sialkot, Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(18), 14157-14168, 2015.

RAJAPAKSE, B. N., *et al*. Evaluation of the Test-mate ChE (cholinesterase) field kit in acute organophosphorus poisoning. **Annals of emergency medicine**, v. 58, n. 6, p. 559-564. e6, 2011.

REINMUTH-SELZLE, K., *et al*. Determination of the protein content of complex samples by aromatic amino acid analysis, liquid chromatography-UV absorbance, and colorimetry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 15, p. 4457-4470, 2022.

RUMSEY, D. J, 2023. What is r value correlation. Statistics for dummies. Available online: https://www.dummies.com/article/academics-the-arts/math/statistics/how-to-interpret-a-correlation-coefficient-r-169792/ (accessed on 21 December 2025).

RUVINDA, K. M.; PATHIRATNE, A. Biomarker responses of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to polluted water from Kelani river basin, Sri Lanka: Implications for biomonitoring river pollution. **Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences**, v. 23, n. 1, 2018.

SABRA, F.; SOLIMAN; MEHANA, E.-S. Toxicidade de pesticidas em peixes, com referência particular aos inseticidas. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences**, n. 1, 2015.

SABZKOOHI, H. A.; DODIER, V.; KOLLIOPOULOS, G. A validated analytical method to measure metals dissolved in deep eutectic solvents. **RSC advances**, v. 13, n. 22, p. 14887–14898, 2023.

SANTOS, M. C. *et al*. Theoretical assessment of the performances of commercial oximes on the reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the nerve agent A-242 (novichok). **Food and**

chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 165, n. 113084, p. 113084, 2022.

SCHWAB, A. *et al*. A simple acetylcholinesterase inhibition assay for the quantification of the nerve agent VX: Application in a Franz cell model with rat skin and various decontaminants. **Toxicology letters**, v. 404, p. 20–27, 2025.

SHEEMONA; RAJASRI; BANERJEE, D. Acute organophosphorus poisoning. **Clinica chimica acta**, v. 431, p. 66–76, 2014.

SINHA, S. N. *et al*. A novel RP-HPLC method for quantification of cholinesterase activity in human blood: An application for assessing organophosphate and carbamate insecticide exposure. **PloS one**, v. 17, n. 12, p. e0279287, 2022.

SOUZA, P. R. **Caracterização da acetilcolinesterase das brânquias e trato digestório da ostra Crassostrea rhizophorae do estuário Canal de Santa Cruz, PE-Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

TENÓRIO-DAUSSAT, C. L. *et al*. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. **Talanta**, v. 120, p. 491–497, 2014.

TSAGKARIS, A. S. *et al*. Screening of carbamate and organophosphate pesticides in food matrices using an affordable and simple spectrophotometric acetylcholinesterase assay. **Applied sciences (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, p. 565, 2020.

UMAR, M.; HUSSAIN, M.; MALONEY, S. K. Assessment of Cholinesterase inhibition activity of birds inhabiting pesticide exposed croplands and protected area in hot semi-arid region of Pakistan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e248842, 2021.

VIEIRA, C.E.D., *et al*. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, 586: 598-609, 2017.

VIEIRA, I. J. C., *et al*. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 419-426, 2008.

WANG, H. *et al*. Acetylcholinesterase-assisted photoelectrochemical solution gated graphene field-effect transistor for organophosphates pesticide detection. **Food chemistry**, v. 486, n. 144631, p. 144631, 2025.

WANG, X. Y *et al*. Establishment of an HPLC method for testing acetylcholinesterase inhibitory activity and compared with traditional spectrophotometry. **Chemical Papers**, v. 72, n. 9, p. 2255-2264, 2018.

WELLS, K. D. The Ecology and Behavior of Amphibians, Chicago: **University of Chicago Press**, 2007.

WEXLER, P.; ANDERSON, B. D. **Encyclopedia of toxicology**. Academic Press, 2014.

Zhu, C. H. *et al*., Species-and sex-specific bioaccumulation, tissue-specific distribution, and maternal transfer of per-and polyfluoroalkyl substances in tiger frogs (Hoplobatrachus chinensis) and forest frogs (Rana chensinensis). **Environmental Research**, 122633, 2025.

7.1. ANEXO 1. EMAIL DA CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO DE PESQUISA.

URCA webMail

FILIPE JOAQUIM GONÇALVES <filipe.goncalves@urca.br>

Please verify your contribution to A NOVEL APPROACH FOR ASSESSING ENVIRONMENTAL CONTAMINATION: LINKING ACHE ACTIVITY TO TRACE METALS IN AQUATIC ORGANISMS

1 mensagem

Journal of Environmental Management <em@editorialmanager.com> 25 de janeiro de 2026 às 10:52
Responder a: Journal of Environmental Management <support@elsevier.com>
Para: Filipe Joaquim Gonçalves <filipe.goncalves@urca.br>

This is an automated message.

Journal: Journal of Environmental Management
Title: A NOVEL APPROACH FOR ASSESSING ENVIRONMENTAL CONTAMINATION: LINKING ACHE ACTIVITY TO TRACE METALS IN AQUATIC ORGANISMS
Corresponding Author: Ms Lígia Cláudia Castro de Oliveira
Co-Authors: Filipe Joaquim Gonçalves; Renata Maria da Silva Lucas; Irwin Rose Alencar de Menezes; Francisco Assis Bezerra da Cunha; Francisco Alixandre Ávila Rodrigues
Manuscript Number: **JEMA-D-26-02451**

Dear Gonçalves,

Ms Lígia Cláudia Castro de Oliveira submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship: Yes, I am affiliated.

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at https://www.editorialmanager.com/jema/

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at ligia.castro@urca.br

Thank you,
Journal of Environmental Management

More information and support

7.2. ANEXO 2. CAPTURA DE TELA DA DO "*PROOF*" APÓS A SUBMISSÃO

Journal of Environmental Management

A NOVEL APPROACH FOR ASSESSING ENVIRONMENTAL CONTAMINATION: LINKING ACHE ACTIVITY TO TRACE METALS IN AQUATIC ORGANISMS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JEMA-D-26-02451
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Environmental Assessment and Monitoring
Keywords:	AChE; Biomonitoring; Aquatic Contamination; HPLC; Environmental Contamination.
Corresponding Author:	Lígia Cláudia Castro de Oliveira, Ph.D Universidade Regional do Cariri BRAZIL
First Author:	Filipe Joaquim Gonçalves
Order of Authors:	Filipe Joaquim Gonçalves
	Renata Maria da Silva Lucas
	Irwin Rose Alencar de Menezes
	Francisco Assis Bezerra da Cunha
	Francisco Alixandre Ávila Rodrigues
	Lígia Cláudia Castro de Oliveira, Ph.D
Abstract:	The enzyme acetylcholinesterase (AChE) is one of the primary biomarkers used in the biomonitoring of aquatic ecosystems. However, traditional colorimetric methods exhibit selectivity limitations in complex matrices, such as mollusk, fish, and amphibian tissues. This study presents a rapid and selective HPLC-UV method for the determination of AChE activity, based on the quantification of the enzymatic conversion of 1-naphthyl acetate to 1-naphthol, using a novel extraction protocol designed to minimize matrix interferences. The method was validated following the ICH (International Council for Harmonisation) guidelines, demonstrating adequate selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). We applied the proposed method to biological samples of three aquatic species from different regions with distinct degrees of anthropogenic impact. Field application revealed lower AChE activity in samples from contaminated sites (0.00 to 4.44 AChE units/mL) compared to the control (6.11 AChE units/mL), suggesting that the proposed method is suitable for aquatic contamination monitoring. To further validate our methodology, we determined trace metal concentrations (copper, chromium, nickel, and manganese) in biological samples and investigated the association between metal concentrations and AChE activity. The results revealed a clear association (inverse correlation) between acetylcholinesterase enzymatic activity and metal concentrations. Thus, the proposed approach successfully identified that AChE activity decreased in regions most impacted by metals, indicating neurotoxic effects.