

PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE BIOQUÍMICA DE PEIXES E ANFÍBIOS

JENIFER EDUARDA LUTEREK^{1,2*}, CRISTINA BRIDI^{2,3}, GABRIEL
HENRIQUE KLEIN^{2,3}, ALINE POMPERMAIER^{2,4}, FLÁVIA BERNARDO
CHAGAS^{2,3}, VALENTINA WARKEN PRIGOL², ROSE GADINE PARMELUS²,
CARLA ALVES⁵, PAULO AFONSO HARTMANN^{2,6}, MARILIA HARTMANN^{2,7}.

1 Introdução

A análise de parâmetros bioquímicos é uma importante ferramenta para avaliar o estado fisiológico, a saúde populacional e os efeitos de estressores ambientais em peixes e anfíbios. Esses parâmetros são amplamente utilizados como biomarcadores de exposição a agentes tóxicos, permitindo identificar a magnitude da toxicidade e os mecanismos de ação desses compostos (Bojarski *et al.*, 2025). No entanto, sua confiabilidade depende da padronização das metodologias de coleta, análise e interpretação dos dados, garantindo a comparabilidade e a reprodutibilidade dos resultados (Tornabene *et al.*, 2021). Dessa forma, protocolos padronizados e detalhados são essenciais para assegurar a obtenção de resultados robustos e reprodutíveis (Boualit *et al.*, 2023).

2 Objetivos

Definir um protocolo padronizado para análises bioquímicas de anfíbios anuros e peixes por meio da avaliação da acetilcolinesterase, da superóxido dismutase e dos níveis de peroxidação lipídica em embriões de *Physalaemus cuvieri* e *Danio rerio* expostos ao inseticida acefato.

1 Graduanda de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim*, contato: jenifer.luterek@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa em Biodiversidade e Conservação da Fauna.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim*.

4 Pós-doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim*

5 Doutora em Bioexperimentação e Técnica de laboratórios no Instituto Federal do Rio Grande do Sul, *Campus Sertão*.

6 Doutor em Ciências Biológicas, Professor titular da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim*

7 Doutora em Ciências Biológicas, Professora titular da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim*. **Orientadora.**

3 Metodologia

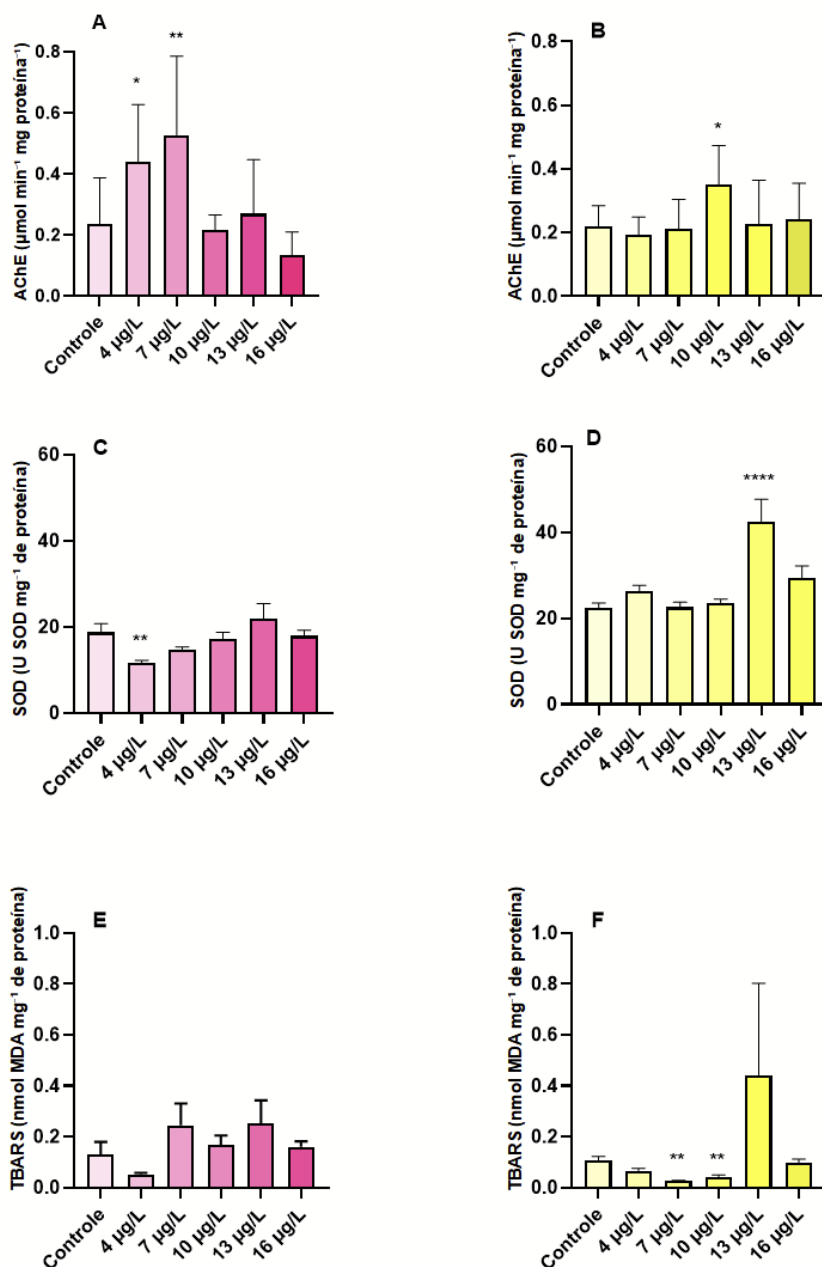
Para o ensaio com anuros foram utilizados embriões de *Physalaemus cuvieri*, coletados a partir de desovas da natureza (27°41'06.7"S; 52°17'41.1"W). Os embriões de *Danio rerio* foram obtidos a partir de reprodução em laboratório. Os ensaios foram estáticos e realizados em triplicata. Ambos os ensaios incluíram um grupo controle e cinco grupos expostos a uma formulação comercial de acefato, nas concentrações de 4, 7, 10, 13 e 16 µg/L durante sete dias. Para cada grupo, foram expostos 60 embriões de *P. cuvieri* e 120 embriões de *D. rerio*. Ao final da exposição, amostras de corpo inteiro de 20 embriões por grupo de ambas as espécies foram homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris-HCl (50 mM; pH 7,4), centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado nas análises bioquímicas (Tamagno *et al.*, 2023). O teor total de proteínas foi determinado segundo Bradford (1976). A acetilcolinesterase (AChE) foi quantificada conforme Ellman (1961), utilizando 15 µL de amostra e leitura espectrofotométrica a 595 nm. Antes de adicionar o substrato acetilcolina (ACh, 8%), a amostra enzimática foi pré-incubada por 5 min a 25 °C com reagente de Ellmann (DTNB, 100 mM, pH 7,0). A reação foi iniciada com a adição do substrato de ACh e a absorção foi medida. A atividade foi expressa em µmol de proteína AChI/h/mg. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971). Para SOD, foi iniciada pela adição de 50 µL de uma amostra (100 µg de proteína) em 950 µL de tampão de glicina (50 mM, pH 10,5) e a reação enzimática foi iniciada com a adição de epinefrina (60 mM, pH 2,0). A reação colorimétrica foi medida a 560 nm e expressa em U de proteína SOD/mg. Os níveis de peroxidação lipídica (TBARS), foram analisados de acordo com os métodos descritos por Tamagno *et al.* (2023). Para a reação, 150 µL da amostra foram misturados com 300 µL de ácido tricloroacético (TCA 10%). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 × g, a 4 °C. Em seguida, 400 µL do sobrenadante foram separados e adicionados a 400 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%). As amostras foram então aquecidas a 95 °C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 532 nm. Os níveis finais de malondialdeído (MDA) foram calculados com base em uma curva padrão (0–3 mM) e expressos como nmol de MDA·mg⁻¹ de proteína. As análises foram realizadas no leitor de microplacas Hidex. Todos os protocolos foram aplicados de forma padronizada, sem modificações entre as espécies.

4 Resultados e Discussão

A atividade da AChE aumentou nos embriões de *P. cuvieri* expostos a 4 e 7 µg/L ($F_{(5,60)} = 6,879$; $p < 0,0001$), e nos embriões de *D. rerio* em 10µg/L de Acefato ($F_{(5,54)} = 3,101$; $p = 0.0156$). Em relação à SOD, houve diminuição significativa nos embriões de *P. cuvieri* expostos a 4µg/L de acefato ($F_{(5,62)} = 3.563$; $p=0.068$), e aumento em *D. rerio* em 13µg/L ($F_{(5,54)} = 8.758$; $p<0.001$). Não houve diferença significativa em TBARS dos embriões de *P. cuvieri* expostos ao acefato ($F_{(5,26)} = 1$; $p=0.1330$), entretanto, ocorreu diminuição nos indivíduos de *D. rerio* expostos às concentrações de 7µg/L e 10µg/L ($F_{(5,23)} = 5.418$; $p=0.0019$). Os resultados são representados na Figura 1.

A AChE é um neurotransmissor, e em estudos sobre toxicidade, pode fornecer *insights* sobre mecanismos de neurotoxicidade (Thakur *et al.*, 2025). A SOD e TBARS são utilizadas como indicadoras de estresse oxidativo. A atividade de SOD é essencial para o metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em organismos e está entre as principais enzimas para desintoxicação; ao mesmo tempo, a peroxidação lipídica é um dos principais efeitos causados pelo estresse oxidativo induzido pela exposição a poluentes, refletindo nos níveis de TBARS (e.g. Acquaroni *et al.*, 2026). Os resultados de aumento ou inibição desses biomarcadores evidenciam o potencial tóxico do composto e, nesse estudo, mostram que as duas espécies tiveram alterações quando expostas ao inseticida.

Figura 1 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e quantificação da superóxido dismutase (SOD) e dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em embriões de *Physalaemus cuvieri* (A,C e E) e *Danio rerio* (B,D e F) expostos a diferentes concentrações de acefato.



Fonte: Elaborado pelos autores (2026).

5 Conclusão

Os protocolos aplicados para a realização das análises bioquímicas, de ambos os organismos, foram eficientes para a quantificação de diferentes enzimas. As alterações observadas nos parâmetros bioquímicos mostram que essas análises são ferramentas úteis para avaliar toxicidade e que podem ser utilizadas em peixes e anfíbios.

Referências Bibliográficas

ACQUARONI, M. *et al.* Integrated biomarker assessment of sublethal effects of a tebuconazole-based fungicide in *Rhinella arenarum* larvae. *Env Toxicol and Pharm* p. 104921, 2026.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BOJARSKI, B. *et al.* Blood biochemical biomarkers in fish toxicology: a review. *Animals*, v. 15, n. 7, p. 965, 2025.

BOUALIT, L. *et al.* The Amphibian Short-Term Assay: evaluation of a new ecotoxicological method for amphibians using two organophosphate pesticides commonly found in nature assessment of behavioral traits. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 42, n. 7, p. 1595-1606, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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

TAMAGNO, W. A *et al.* Transfluthrin- and prallethrin-based insecticides elicit specific enzymatic antioxidant responses in different tissue of zebrafish. *Environ. Pollut.*, v. 327, p. 121530, 2023.

THAKUR, R. *et al.* In silico analysis of novel triacontafluoropentadec-1-ene as a sustainable replacement for dodecane in fisheries microplastics: molecular docking, dynamics simulation and pharmacophore studies of acetylcholinesterase activity. *Comput. Biol. Chem.*, v. 115, p. 108358, 2025.

TORNABENE, B. J. *et al.* Evaluating corticosterone as a biomarker for amphibians exposed to increased salinity and ambient corticosterone. *Conserv. Physiol.*, v. 9, n. 1, 2021.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Anura; Peixe Zebra, Organofosforado.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0151

Financiamento