

EFEITO "IN VITRO" DE POLUENTES DE ORIGEM AGRÍCOLA SOBRE A FOSFATASE ÁCIDA DE MICROCRUSTÁCEOS E PEIXES

Miriam Dantzer¹, Darlene D. Dantzer¹, Hiroshi Aoyama¹, Claudio M. Jonsson²

¹IB/Unicamp - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas. ² Embrapa Meio Ambiente

e-mail: jonsson@cnpm.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O ingresso de agentes químicos em compartimentos ambientais a partir de atividades agrícolas representam uma ameaça para a biota aquática e seus sistemas bioquímicos. Entre estes últimos, as fosfatases ácidas fazem parte em processos autofágicos digestivos, na decomposição de fosfatos orgânicos, na sinalização celular e em outras rotas metabólicas. Os testes *in vitro* são úteis para gerar hipóteses sobre o mecanismo de ação de agentes tóxicos, para comparar a magnitude do efeito entre estes, e servem como uma ferramenta promissória para fins de análise semiquantitativa.

OBJETIVO: Estudar o efeito inibitório de quatro agroquímicos (acetato, dimetoato, endossulfan e metamidofós) e de três metais sobre a fosfatase ácida extraída do microcrustáceo *Daphnia similis* e do fígado do peixe *Metynnis argenteus* (pacú-prata).



Fig. 1. *Daphnia similis*



Fig. 2. *Metynnis argenteus*

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos e condições de criação:

D. similis: Foi cultivada em água reconstituída (Hosokawa et al. 1991) adicionada de micronutrientes (Elendt e Bias 1990) e mantida a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram alimentadas com suspensão de algas clorofíceas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella pyrenoidosa*.

M. argenteus: Animais pesando em média 5 g foram adquiridos de um fornecedor local e mantidos na temperatura de $26 - 29^\circ\text{C}$. As características físico-químicas da água foram: temperatura $26 - 29^\circ\text{C}$; pH 7,8; dureza total $36 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e condutividade $190 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Extração e preparação dos extratos:

D. similis: ~75 adultos (~100 mg peso úmido) foram homogeneizados em tampão acetato de sódio 1 M, pH 5,0, na proporção 1:4 (peso/volume). O extrato (sobrenadante) foi obtido após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4°C .

M. argenteus: o fígado foi homogeneizado em solução de sacarose 0,25M na proporção 1:20 (peso/volume). O extrato (sobrenadante) foi obtido após centrifugação a 11.000 rpm por 20 min a 4°C .

Análise da atividade da fosfatase ácida:

Foi determinada usando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato, e medindo a formação de paranitrofenol a 405 nm em meio alcalino (coeficiente de extinção molar $18.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após incubação a 37°C (Prazeres et al. 2004).

Análise dos dados:

A concentração que promoveu 50% de alteração na atividade (CI50) e seu intervalo de confiança 95% foi calculada pelo módulo "Simple Regression" contido no programa Statgraphics® Plus Version 2 (1995).

Os valores de CI50 foram considerados significativamente diferentes um do outro quando seus intervalos de confiança não apresentaram sobreposição (Czuczwar et al., 2001).

RESULTADOS

Tabela 1. Efeito de poluentes agrícolas sobre a fosfatase ácida de algas, microcrustáceos e peixes.

Poluente	Concentração (mM)	<i>M. argenteus</i> ^a	<i>D. similis</i> ^a	<i>P. subcapitata</i> ^b
Acetato	2,0	99,9 (2,7)	94,2 (6,2)	92,7 (3,7)
Dimetoato	2,0	97,5 (2,8)	86,3 (9,3)	103,3 (3,5)
Endossulfan	0,1	97,4 (1,5)	90,9 (2,6)	79,3 (4,4)
Metamidofós	2,0	97,8 (1,9)	89,8 (4,9)	102,3 (5,6)
Al ³⁺	2,0	n.d. ^c	55,1 (10,8)	45,4 (5,0)
Cu ²⁺	2,0	44,3 (4,7)	63,5 (7,4)	153,8 (37,0)
Hg ²⁺	2,0	12,9 (5,7)	102,8 (4,5)	50,7 (1,7)

A atividade na ausência do poluente foi considerada como controle (100%).
^a Este trabalho, ^bJonsson e Aoyama (2007).
^cn.d. = não determinado.

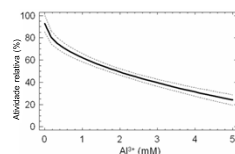


Fig. 3. Curva dose-resposta para a fosfatase ácida de *D. similis* na presença de Al.

Tabela 2. Parâmetros de inibição por metais da atividade da fosfatase ácida de microcrustáceos e peixes.

Metal	Fonte da Enzima	CI50 (mM)	Intervalo de Confiança (95%)
Al ³⁺	<i>D. similis</i>	1,97	1,81 - 2,27
Cu ²⁺	<i>M. argenteus</i>	0,65	0,59 - 0,74
Hg ²⁺	<i>M. argenteus</i>	0,14	0,06 - 0,41

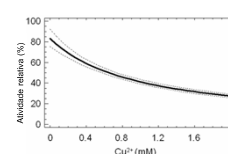


Fig. 4. Curva dose-resposta para a fosfatase ácida de *M. argenteus* na presença de Cu.

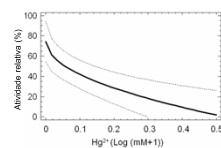


Fig. 5. Curva dose-resposta para a fosfatase ácida de *M. argenteus* na presença de Hg.

CONCLUSÕES

- Os metais foram os que promoveram maior efeito na modulação da atividade enzimática, sendo que este efeito variou muito conforme a espécie.
- Devido ao relativamente baixo valor do parâmetro de inibição para Hg, tal propriedade inibitória poderia ser usada como uma ferramenta na indicação da presença de metais em amostras ambientais.
- A medida da atividade da fosfatase ácida tem potencial de uso como biomarcador do efeito de metais em ambas as espécies estudadas.
- A atividade da enzima foi leve ou praticamente não afetada por poluentes orgânicos. Entretanto a modulação da mesma em estudos "in vivo" merece atenção.
- Considerando que alterações "in vitro" também tendem a ocorrer nos organismos expostos, *D. similis* e *M. argenteus* seriam espécies apropriadas para avaliar os efeitos da presença de metais "in vivo".
- Os dados contribuem para a elucidação do mecanismo de ação tóxica dos poluentes em dois níveis tróficos da cadeia alimentar e para expandir a base de dados de toxicidade de poluentes em organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

- Elendt BF, Bias WR (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. Water Res 24(9):1152-1167.
- Hosokawa M, Endo G, Kuroda K, Horiguchi S (1991) Influence of sulfate, Ca, and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia similis*. Bull Environ Contam Toxicol 46(3): 461-465.
- Prazeres JN et al (2004) Acid phosphatase activities during the germination of *Glycine max* seeds. Plant Physiol Biochem 42:15-20.
- Czuczwar M, Kis J, Potasinski A, Turski WA, Przemyski K (2001) Isobolographic analysis of interaction between vigabatrin and baclofen in the formalin test in mice. Pol J Pharmacol 53:527-530.
- Jonsson CM, Aoyama H (2007) *In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. Chemosphere 69: 849-855.