



**EFEITO DE INSETICIDAS USADOS NA AQUICULTURA SOBRE A
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS
BIOINDICADORES**

MARINA D. B. PELEGRINI¹; MARJORIE GUIMARÃES²; VERÔNICA, J. DE PAULA³;
VERA L. CASTRO⁴; CLÁUDIO M. JONSSON⁴; CAMILA DAMIANE⁵

11418

RESUMO

O presente estudo objetiva analisar alterações na atividade enzimática de náuplios de *Artemia salina*, um microcrustáceo de águas salgadas amplamente utilizado em testes de ecotoxicologia, quando expostas a dois pesticidas, Diflubenzuron e Parationa metílica e a mistura 50% + 50% de ambos os produtos. Os produtos foram testados em três concentrações, sendo que a maior concentração de cada produto corresponde à sua CL50 (PAULA, 2010). Foram feitos ensaios espectrofotométricos de atividade enzimática de catalase e acetilcolinesterase, sendo esses dados relacionados através da concentração de proteínas de cada amostra, obtendo-se assim a atividade específica das enzimas. Nossos resultados mostraram que a atividade da catalase foi inibida nas amostras feitas a partir de artemias expostas à mistura dos inseticidas em relação ao controle, mostrando que a ação conjunta dos dois produtos potencializa seu efeito inibitório sobre a enzima. Já a acetilcolinesterase foi inibida nas amostras de artemias expostas ao Diflubenzuron e à Parationa metílica separadamente, não sendo observada inibição nas amostras sob efeito da mistura, o que indica que no caso desta enzima os inseticidas podem ter efeitos que se anulem quando aplicados conjuntamente. Este trabalho mostra que os inseticidas têm efeito direto e diferenciado sobre a atividade das diversas enzimas que atuam no organismo, ressaltando a importância de se desenvolver mais estudos que visem mensurar e desvendar a ação destes produtos nos seres vivos, dado que são amplamente utilizados na aquicultura e na agricultura. Estes possuem potencial de contaminar os ecossistemas, especialmente os aquáticos, atingindo todas as teias alimentares.

¹ Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, UNICAMP, Campinas-SP,

² Bolsista PIBIC/CNPq: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campina-SP.

³ Bolsista Treinamento Técnico 3 Fapesp: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP.

⁴ Orientadores: Pesquisadores, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

⁵ Bolsista Treinamento Técnico 2 Fapesp : Graduação em Engenharia Ambiental, PUCC, Campinas-SP 1

✉ mari.pelegrini@gmail.com

ABSTRACT

The present study aims to examine changes in the enzyme activity of *Artemia salina* nauplius, a saltwater microcrustacean widely used in ecotoxicology testing, when exposed to two pesticides, Diflubenzuron and Metil Paration and the mixture 50% + 50% of the both products. The products were tested in three concentrations, with the highest concentration of each product corresponds to its CL50 (PAULA, 2010). Spectrophotometric assays were made of enzyme activity of catalase and acetylcholinesterase, and the data were related to the protein concentration of each sample, thus obtaining the specific activity of enzymes. Our results showed that the catalase activity was inhibited in artemias exposed to insecticides compared to the controls, showing that the joint action of the two products enhances its inhibitory effect on the enzyme. On the other hand, acetylcholinesterase was inhibited in the samples of artemias exposed to Diflubenzuron and to Metil Parathion separately, and it was not observed inhibition in the samples under the effect of the mixture, indicating that in the case of this enzyme the insecticides may have effects which cancel each other when applied together. This work shows that the pesticides have a direct and differential effect on the activity of several enzymes, highlighting the importance of developing further studies that aim at measuring and uncovering the action of these products in living organisms. These products are used in aquaculture and agriculture and are increasingly spreading in the ecosystems, especially in water, covering all food webs.

INTRODUÇÃO

Com a demanda cada vez maior por alimentos, vem crescendo continuamente a utilização de defensivos e pesticidas nas lavouras e na piscicultura, buscando aumentar o rendimento das áreas utilizadas e diminuir as perdas da produção. Porém, esses produtos não afetam apenas os ambientes e os organismos a que são destinados, afetam também outros ambientes, principalmente os corpos d'água, levados pelas águas das chuvas ou pela infiltração no solo, atingindo os seres aquáticos e espalhando-se pelos ecossistemas. Dois dos pesticidas mais utilizados atualmente na agricultura e na aquicultura são o Diflubenzuron e o Parationa metílica, chamados comercialmente de Dimilin e Folisuper, respectivamente (PAULA, 2010). Esses produtos atuam de formas diferentes sobre os organismos alvos, sendo que o Diflubenzuron interfere na deposição de quitina, um dos principais componentes da cutícula dos insetos, fazendo com as larvas tenham dificuldade na ecdise e não consigam dar suficiente suporte aos músculos envolvidos, levando à morte

(SECRETARIA DO ESTADO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – PARANÁ, 2011). Já a Parationa metílica é um inibidor das colinesterases (ALMEIDA, 2005; SECRETARIA DO ESTADO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – PARANÁ, 2011).

Numerosos trabalhos vêm tentando quantificar e qualificar os efeitos destes produtos nos ambientes, sendo muito utilizados para isso microcrustáceos aquáticos, devido à sua grande sensibilidade a esses tipos de compostos. Um dos organismos mais usados para estes testes é a *Artemia salina*, um microcrustáceo que integra o zooplâncton de águas salgadas, tendo distribuição cosmopolita ao redor do mundo (VENKATESWARA RAO, 2007). Seu fácil cultivo em laboratório e a disponibilidade de compra de seus cistos fazem com que ela seja um bom modelo em testes com organismos marinhos (PAULA, 2010), sendo há décadas usada em análises de toxicidade de químicos, extratos de plantas com potencial medicinal, exposição a metais pesados e pesticidas (LHULLIER, 2006).

Neste trabalho buscou-se analisar a atividade de enzimas envolvidas no estresse causado por contato com produtos tóxicos em extrato de náuplios de *Artemia salina* expostos a Diflubenzuron, Parationa metílica e a mistura de 50% + 50% de ambos, correlacionando-as ao efeito dos pesticidas no organismo do microcrustáceo.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo das artemias e preparo das amostras

Para a avaliação dos efeitos dos inseticidas sobre a atividade enzimática de artemias, foram preparados três erlenmeyers com um litro de água do mar reconstituída (32,5g de Sera Premium Sea Salt Heinberg/litro de água de clorinizada) sob aeração e em cada um foi colocado 1,25g de cistos de artemia, cultivados em temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade aproximada de 1000 lux. Após 48 horas, os náuplios de artemias eclodidos destes cistos foram recolhidos e distribuídos igualmente entre béquers com 40ml de água salina.

Foram testadas três soluções de pesticidas, Diflubenzuron, Parationa metílica e a mistura de ambos, sendo que para cada pesticida foram testadas três concentrações e um controle, tudo feito em triplicata. O Diflubenzuron foi testado nas concentrações de 0,08mg/L, 0,008mg/L e 0,0008mg/L, a Parationa metílica nas concentrações 5,1mg/L, 0,51mg/L e 0,051 mg/L, e a mistura 50% + 50% destes dois produtos nas concentrações 0,13 mg/L, 0,013 mg/L e 0,0013 mg/L, sendo que a maior concentração de cada solução corresponde à sua CL50 (PAULA, 2010).

As artemias foram expostas às soluções por 48 horas, sendo então recolhidas lavadas em tampão fosfato 0,05M pH 6,5, ressuspensas em 2ml deste mesmo tampão, homogeneizadas e armazenadas a -20°C. Para os testes, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos e mantidas em banho de gelo.

Teste da atividade de catalase

Para o teste da atividade da catalase, foi preparado tampão fosfato pH 7, a partir da mistura 50% + 50% da solução 1 (68,1g de fosfato de potássio para 1 litro de água destilada), e da solução 2 (89g de fosfato de sódio diluído em 1 litro de água destilada). Também foi preparado peróxido de hidrogênio pela diluição de 0,5ml de peróxido de hidrogênio estoque em 10ml do tampão fosfato preparado. Para a reação, adiciona-se 100µl de amostra, 570µl de tampão fosfato e 330µl de H₂O₂ em cubeta de quartzo por 120 segundos a 240nm de comprimento de onda.

Teste da atividade de Acetilcolinesterase

Para o teste de acetilcolinesterase, é utilizado tampão fosfato 0,1M pH 7,5, solução de iodeto de acetilcolina obtido por 0,0058g de iodeto de acetilcolina diluído em 50ml do tampão fosfato, e solução de DTNB feita pela diluição de 0,0064g de DTNB em 20ml do tampão fosfato. Na cubeta do teste adicionar 500µl de solução de iodeto de acetilcolina, 500µl de solução de DTNB e 250µl da amostra contendo a enzima. A reação é lida por 120 segundos em comprimento de onda de 412nm.

Quantificação de proteínas totais – Método de Lowry

Para este método de quantificação de proteínas foram preparadas no dia do teste as soluções A e B, sendo que para a A é necessário diluir 2g de carbonato de sódio e 0,4g de hidróxido de sódio em 100 ml de água, e para a B dilui-se 0,05g de sulfato de cobre pentahidratado e 0,1g de citrato de sódio em 10 ml de água (armazenar ambos em geladeira). A partir destas duas soluções preparou-se a solução C pela mistura de 49ml da solução A e 1ml da B (preparar apenas no dia do teste). Também foi usado Reativo Folin – Ciocalteau diluído 1:1 em água destilada.

O ensaio foi preparado em tubos de ensaio e lido em cubeta de 1,5ml, sendo que para cada amostra foi feito seguinte procedimento: 200µl de amostra, 1900µl de reagente C, incuba-se por 10 minutos, adiciona-se 100µl de Reativo Folin diluído, agita-se os tubos, incuba-se por 30 minutos a temperatura ambiente, transfere-se para cubetas de plástico e lê-se a absorbância a 750nm (LOWRY, 1951).

Inicialmente foi feita uma curva-padrão com as concentrações 0, 200, 275, 350, 425, 500, 1250 e 2000 µg/ml de BSA em água destilada e então foram lidas as amostras de artemia. Os resultados foram colocados na curva-padrão gerada pelo BSA, calculando-se a concentração de proteínas nas amostras.

Os dados foram analisados pelo programa Statgraphics Plus Version 5.1 ano 2001, utilizando-se o módulo “One-way ANOVA”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos dados de absorbância e atividades obtidos, foram calculadas as atividades específicas de cada amostra (atividade enzimática da amostra/concentração de proteínas totais) e foram construídos os seguintes gráficos (Figura 1 e 2), em que se comparam as atividades específicas médias de cada concentração de inseticida em relação aos controles (ausência de inseticida).

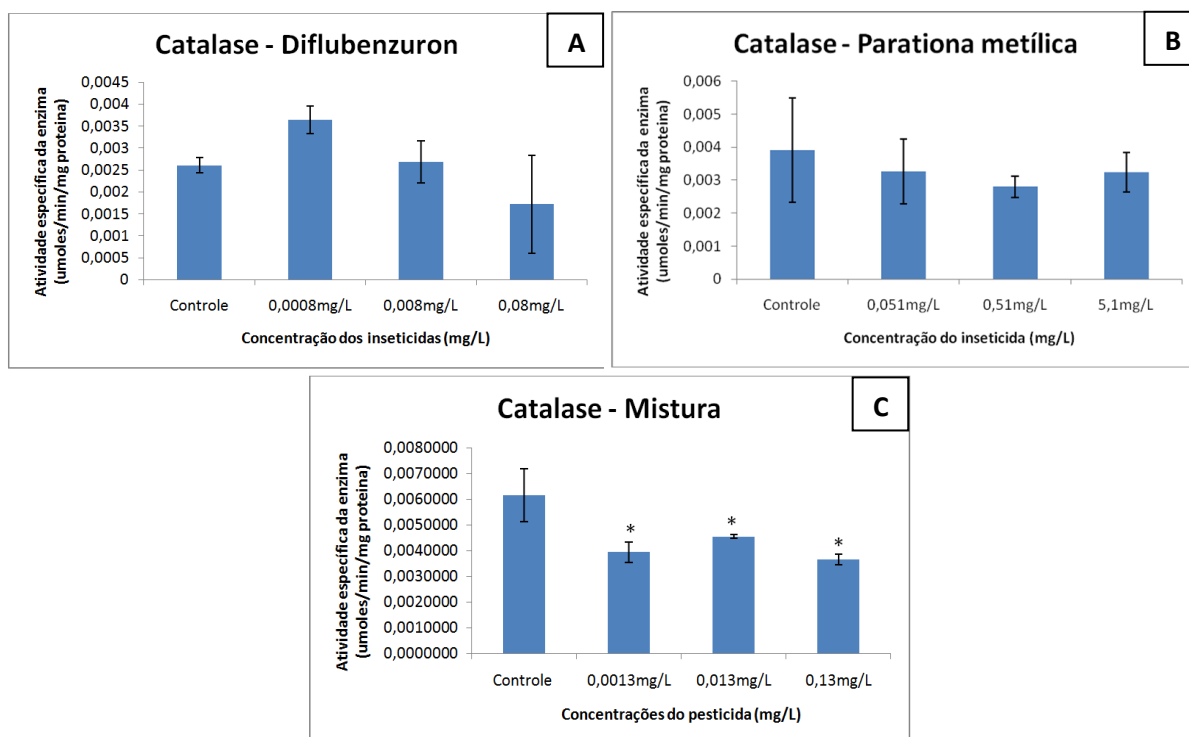


FIGURA 1. Atividade específica da catalase nas concentrações dos inseticidas Diflubenzuron (0,0008mg/L, 0,008mg/L e 0,08mg/L), Parationa metílica (0,051mg/L, 0,51mg/L e 5,1mg/L) e a mistura 50% + 50% de ambos (0,0013mg/L, 0,013mg/L e 0,13mg/L), comparando-se com os controles (ausência de inseticida). **A.** Amostras tratadas com Diflubenzuron. **B.** Amostras tratadas com Parationa metílica. **C.** Amostras tratadas com a mistura 50% + 50% dos dois inseticidas. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

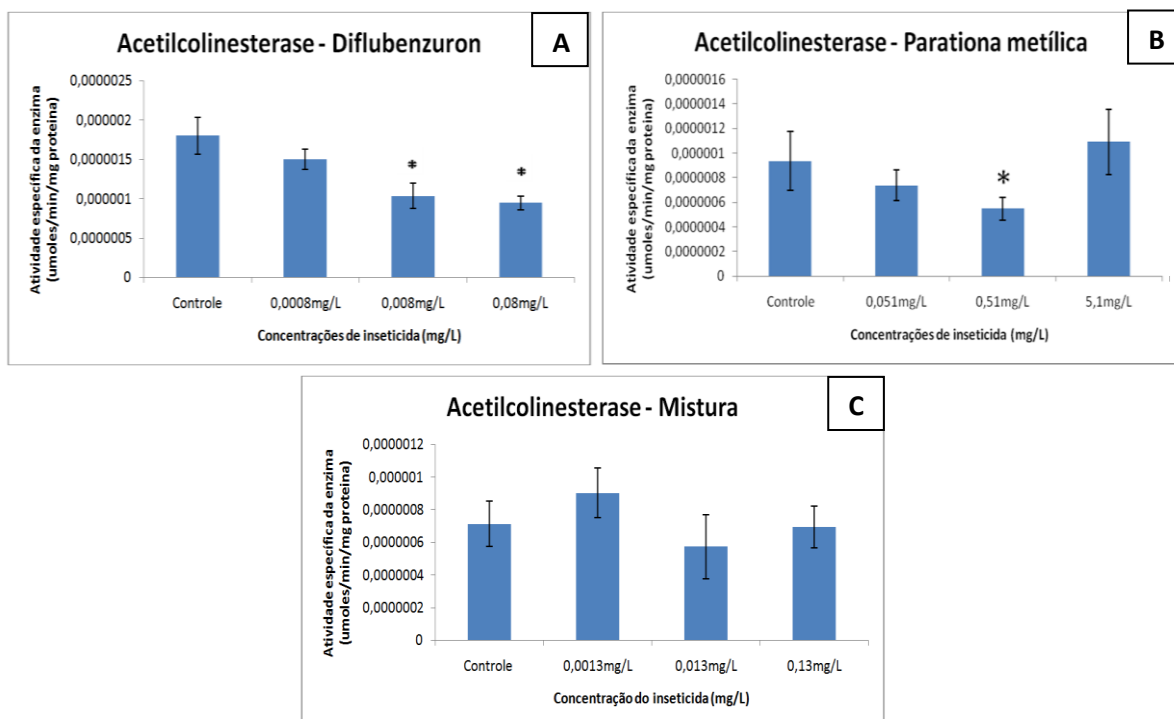


FIGURA 2. Atividade específica da acetilcolinesterase nas concentrações dos inseticidas Diflubenzuron (0,0008mg/L, 0,008mg/L e 0,08mg/L), Parationa metílica (0,051mg/L, 0,51mg/L e 5,1mg/L) e a mistura 50% + 50% de ambos (0,0013mg/L, 0,013mg/L e 0,13mg/L), comparando-se com os controles (ausência de inseticida). **A.** Amostras tratadas com Diflubenzuron. **B.** Amostras tratadas com Parationa metílica. **C.** Amostras tratadas com a mistura 50% + 50% dos dois inseticidas. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A análise destes dados nos permite observar que a atividade da catalase foi intensamente inibida nos extratos feitos a partir de artemias expostas à mistura 50% + 50%, fato que não ocorreu nos extratos de artemias expostas a eles separadamente, sendo possível considerar que o efeito inibitório dos pesticidas sobre a catalase foi potencializado quando estes foram administrados conjuntamente.

Com relação à acetilcolinesterase, nota-se que ocorreu o inverso, pois nos extratos em que os organismos foram expostos à mistura dos inseticidas não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações dos produtos e o controle, ou seja, não ocorreu inibição da acetilcolinesterase. Já nas amostras com Diflubenzuron obteve-se diferença estatisticamente significativa entre as atividades específicas registradas nas concentrações 0,008mg/L e 0,08mg/L e o controle, sendo que nessas duas concentrações houve inibição da atividade da enzima.

Observa-se também efeito inibitório da acetilcolinesterase nas amostras de 0,51mg/L de Parationa metílica, porém na concentração de 5,1mg/L não é observado isso. A acetilcolinesterase é um biomarcador amplamente utilizado em estudos de ecotoxicologia devido à sua grande sensibilidade a organofosforados, mesmo que estejam presentes em concentrações muito baixas (ALMEIDA, 2005). A Parationa metílica, por ser um organofosforado, possui essa propriedade de inibir a acetilcolinesterase, como foi constatado na concentração 0,51mg/L, porém esse efeito não foi obtido na concentração 5,1mg/L, diferente do que seria esperado para uma concentração mais alta. Isso certamente tem relação com o fato das artemias terem morrido poucas horas depois da aplicação do produto, nas três réplicas feitas separadamente. Após 24 horas, quando foi constatado que a imensa maioria dos organismos havia morrido nessas condições, estes foram recolhidos, lavados, homogeneizados e congelados imediatamente. As atividades enzimáticas desta concentração foram então analisadas no extrato feito a partir de artemias mortas, portanto esse fato pode justificar a falta de inibição da acetilcolinesterase nesta concentração de Parationa metílica. Em organismos mortos, a ligação da Parationa metílica à enzima pode ser impedida já que há ausência de atividade metabólica nestas situações e as condições de células e tecidos mortos são diferentes de células e tecidos vivos. Pode também ocorrer a interferência de outras substâncias liberadas por organismos mortos, que modifiquem as reações de inibição esperadas.

CONCLUSÃO

Buscando analisar a ação dos pesticidas sobre a atividade da catalase e da acetilcolinesterase, duas enzimas envolvidas em situações de exposição a poluentes, este trabalho mostrou que de fato estes inseticidas agem sobre a inibição das duas enzimas estudadas, dependendo da concentração em que se encontram e da combinação ou não de um com o outro, podendo alterar o organismo de forma extremamente prejudicial. Também foi constatado que a mistura 50% + 50% dos pesticidas pode atuar de diferentes formas sobre as diferentes enzimas, tendo efeito potencializador da inibição sobre a catalase e efeito anulador da inibição sobre a acetilcolinesterase. Com relação à primeira enzima, tal efeito poderia fazer com que a catalase seja considerada um bom biomarcador até mesmo para concentrações muito baixas da mistura dos inseticidas. O mesmo pode ser observado no caso da acetilcolinesterase na presença de Diflubenzuron ou Parationa metílica.

Com base nestes resultados, fazem-se necessários novos estudos a respeito dos mecanismos envolvidos nestes processos para se ter uma melhor compreensão da dimensão dos efeitos que estes inseticidas causam quando entram nos ecossistemas, atingindo os seres vivo, especialmente os aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

À Embrapa pela oportunidade do estágio.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.C. de; AGUIAR, L. H., MORAES, G. **Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*)**. Cienc. Rural [online]. 2005, vol.35, n.6, pp. 1412-1416. ISSN 0103-8478.
- LHULLIER, C., HORTA, P. A., FALKENBERG, M. **Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina***. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(2): 158-163, Abr./Jun. 2006 [Acesso em 29/06/11] Disponível em: www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a05.pdf
- LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, NJ, FARR, AF, RANDALL, RJ, 1951. **Protein measurement with the folin phenol reagent**. J. Biol Chem., 193: 265- 275
- PAULA, V. J. de, SANTOS, F., JONSSON, C. M., CASTRO, V. L., PRESTES. E. B. **Efeito de dois inseticidas e suas misturas sobre a *Artemia salina* aquícola**. Disponível em: Anais 11º Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010, SC.
- SEAB – Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento do Paraná – Bulas de inseticidas – Dimilin 80 WG. Paraná, 2011 [Acesso em 01/07/11] Disponível em: www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/DIMILIN_80_WG.pdp
- SEAB – Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento - Paraná – Bulas de inseticidas – Folisuper 600 BR. 2011 [Acesso em 01/07/11] Disponível em: www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/FOLISUPER_600_BR.pdf
- VENKATESWARA RAO, J., KAVITHA, P., JAKKA, N. M., SRIDHAR, V., USMAN, P. K. **Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp, *Artemia salina***. Archives of Environmental Contamination and Toxicology Volume 53, Number 2, 227-232, DOI: 10.1007/s00244-006-0226-9, 2007.