



EFEITO ATIVADOR DO COBRE NA FOSFATASE ÁCIDA DE ALGAS: UMA PROPRIEDADE COM POTENCIAL DE USO COMO BIOSSENSOR NA DETERMINAÇÃO DO METAL

Claudio M. Jonsson^{1*}; Hiroshi Aoyama²

1-Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

2- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP

* jonsson@cnpma.embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

Resumo

O cobre é um elemento presente em formulações de fungicidas e em outras fontes de contaminação de compartimentos ambientais. No presente trabalho é demonstrado o efeito ativador "in vitro" do íon cobre sobre a fosfatase ácida extraída da alga clorofítica *Pseudokirchneriella subcapitata*. O efeito ativador do Cu^{2+} poderia ser devido a uma proteção conferida por este íon contra a desnaturação térmica da enzima. Os valores de concentração efetiva média de ativação (CE50) e constante de dissociação ($K_d\text{Cu}^{2+}$) foram, respectivamente, equivalentes a 1,80 e 1,64 μM de Cu^{2+} . A baixa magnitude desses valores indica uma forte capacidade de ligação do metal à enzima, cuja atividade pode ser medida juntamente com métodos eletroanalíticos propostos na literatura.

Palavras-chave: fosfatase ácida, cobre, alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*

Introdução

A fosfatase ácida de algas é uma enzima que desempenha importantes funções metabólicas como a decomposição de fosfatos orgânicos em fosfato livre inorgânico e compostos orgânicos, disponibilidade de fosfato do meio extracelular para o intracelular e hidrólise de material fosfolipídico.

A atividade "in vivo" desta enzima tem sido comumente avaliada para fins de análise de risco ecotoxicológico e de monitoramento de áreas degradadas. Entretanto, fundamentando-se na inibição dessa atividade, alguns autores propuseram a construção de biosensores utilizando fosfatases extraídas de algas¹ e de outros organismos², para medir a concentração de poluentes químicos ambientais.

Em trabalhos prévios constatamos que um elemento presente em formulações de fungicidas e em outras fontes de contaminação de compartimentos ambientais, possui efeito ativador da fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Devido a esta propriedade, e ao potencial da mesma para utilização para quantificação do metal, no presente trabalho é demonstrado o efeito ativador "in vitro" do íon cobre sobre essa alga. A atividade da fosfatase ácida extraída da *P. subcapitata*

Materiais e métodos

P. subcapitata foi cultivada em meio de cultivo esterilizado OECD³, sob temperatura de $(20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ e luz contínua fluorescente (4.000 lux).

As algas, estando em fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos e o precipitado lavado duas vezes com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0.

O precipitado algáceo foi suspenso em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 na proporção 1:4 (peso biomassa / volume). Após congelamento/descongelamento, a suspensão foi submetida ao processo de ruptura celular através da sonicação, utilizando-se um sonicador Vibra Cell (Sonics Material Inc.) ajustado na amplitude 70%. Foram aplicados 2 ciclos de sonicação de 50 seg com intervalos de 20 seg. A suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 r.p.m. durante 20 min. O líquido sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para os ensaios de avaliação da atividade enzimática. Esta foi avaliada através da incubação do extrato bruto contendo a enzima na presença do substrato p-nitrofenil fosfato (p-NPP) sendo a reação paralizada, com NaOH 1 M. O p-nitrofenol (p-NP) produzido, em meio fortemente alcalino, confere uma coloração amarelada que é medida em espectrofotômetro nos 404 nm.

Nos ensaios para se avaliar o efeito do cobre, a pré-incubação foi realizada expondo-se o extrato bruto na presença do metal, previamente a reação incubada na presença do substrato p-NPP.

O efeito da concentração de íons cobre sobre a enzima e do tempo de pré-incubação na presença destes foi avaliado calculando-se a CE50 (concentração efetiva média de ativação). A alteração nas constantes cinéticas K_m (constante de Michaelis-Menten), E_a (energia de ativação) e K_dCu^{2+} (constante de dissociação) na presença do metal foi avaliada conforme a plotagem de Lineweaver-Burk e os procedimentos descritos por Prista et al.⁴ e Dixon & Webb⁵.

Resultados e discussão

A atividade enzimática em função da concentração de íons cobre para amostras pré-incubadas e não pré-incubadas com fosfatase ácida é demonstrada na Figura 1.

Um aumento na atividade enzimática foi observado por pré-incubação da enzima com Cu^{2+} até uma concentração de 0,05 mM, a partir da qual a velocidade permaneceu constante. A curva resultante permitiu calcular uma CE50 e seu intervalo de confiança 95%, referente a esse efeito, equivalente a 1,80 (1,64-1,90) μM de Cu^{2+} . Por outro lado, na ausência de uma pré-incubação com a enzima, Cu^{2+} não mostrou efeito

significativo na reação de hidrólise de p-NPP (Figura 1, gráfico interno).

Estudos de estabilidade da fosfatase ácida de *P. subcapitata* a 37 °C mostraram que a presença de 0,2 mM Cu^{2+} protegia a enzima da desnaturação térmica, com preservação de sua atividade pelo menos até 60 min (Figura 2). Por outro lado, na ausência do metal, observa-se uma perda de ~60% da atividade neste período de tempo.

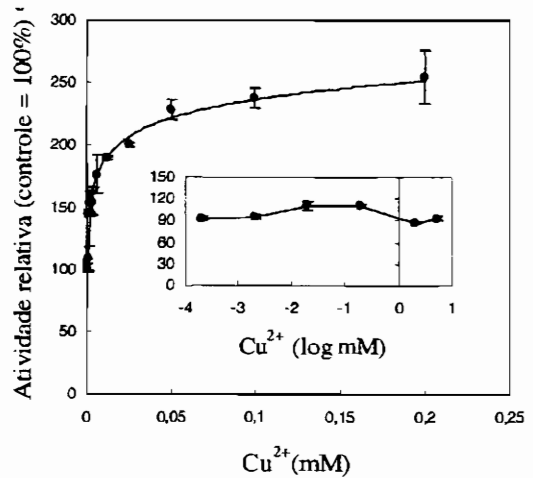


Figura 1 : Efeito da concentração de íons cobre na atividade da fosfatase ácida de *P. subcapitata* : A atividade foi determinada em presença de varias concentrações de Cu^{2+} em amostras pré-incubadas e não pré-incubadas (gráfico interno) contendo a enzima e o íon metálico. A pré-incubação foi realizada por 20 min a 37 °C, sendo que no final deste período a reação, para determinação da atividade enzimática, foi iniciada pela adição de 10 mM de p-NPP como substrato.

Os resultados mostram que o efeito ativador do Cu^{2+} poderia ser devido a uma proteção conferida por este íon à fosfatase ácida, uma vez que na presença deste metal a desnaturação da enzima seria menor que na sua ausência.

Os parâmetros cinéticos na ausência e em presença de cobre estão apresentados na Tabela 1. De modo a avaliar o efeito do íon cobre na interação enzima-substrato, determinou-se a K_m na ausência ou presença do metal, ambas em sistemas pré-incubados. Em presença de Cu^{2+} observou-se uma

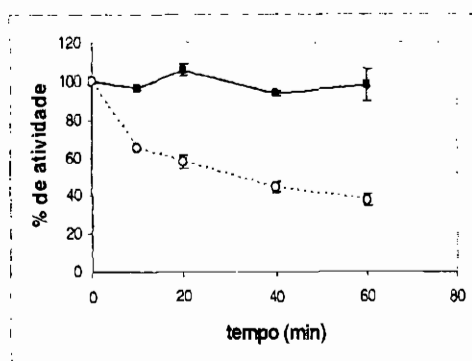


Figura 2: Efeito de íons cobre na estabilidade da fosfatase ácida de *P. subcapitata*. A enzima foi pré-incubada à 37 °C na ausência (○) ou em presença de 0,2 (■) mM de Cu²⁺, nos tempos indicados. Após cada tempo de pré-incubação determinou-se a atividade enzimática remanescente, utilizando-se p-NPP como substrato.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de *P. subcapitata* na presença e ausência de íons cobre.

Parâmetro	Cu ²⁺ (mM)	
	0,0	0,2
KdCu ²⁺ (μM Cu ²⁺)	1,64	-
Km (mM p-NPP)	-	1,21 0,37
Ea (cal.mol ⁻¹)	-	6.392 3.239

diminuição no valor da Km de cerca de 3,3 vezes, sugerindo que o efeito ativador deste metal também poderia ser devido a um aumento na afinidade enzima-substrato. A baixa magnitude do valor de KdCu²⁺ indica uma forte capacidade de ligação do metal.

As proposições acima para explicar o efeito ativador do Cu²⁺ podem ser somadas à diminuição do valor da energia de ativação na presença do metal que foi de aproximadamente 50%.

A propriedade ativadora do cobre sobre enzima poderia ser utilizada em conjunto com um eletrodo desenvolvido que tem a capacidade de realizar a determinação eletroanalítica de p-NP⁶. Ou ainda, em um outro possível método eletroanalítico, como o proposto por Mazzei e

colaboradores.⁷ Estes autores desenvolveram um biossensor tipo fosfatase ácida /glicose oxidase para a determinação de pesticidas.

Conclusões

A ativação da enzima pelo Cu²⁺ poderia ser explicada pelo efeito protetor do metal impedindo a inativação térmica da enzima, pelo aumento da afinidade enzima-substrato (diminuição do valor de Km), e diminuição da energia de ativação. Os baixos valores de CE50 e constante de dissociação indicaram uma forte afinidade enzima - Cu²⁺. A grande afinidade do íon cobre pela enzima e o efeito ativador observado sugerem o possível uso destas propriedades na determinação do metal com base num método eletroanalítico.

Referências

- DURRIEU, D.; TRAN-MINHW, C. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [S. l.], v. 51, p. 206–209, 2002.
- GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANATH, N. G. *Biotechnology Techniques*. [S. l.], v. 11, p. 653–655, 1997.
- OECD. *Guidelines for testing of chemicals*. Paris: [s. n.], 1981.
- PRISTA, N.; ALVES, C. A.; MORGADO, R. H. Estabilidade dos medicamentos. In: PRISTA, N.; ALVES, C. A.; MORGADO, R. H. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. v. 2. p. 2465-2510.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*. 3rd ed. London: Longmans Green and Co Ltd., 1979. 1116 p.
- CALVO-MARZAL, P.; ROSATTO, S. S.; GRANJEIRO, P. A.; AOYAMA, H.; KUBOTA, L. T. *Analytica Chimica Acta*. v. 441, p. 207 – 214, 2001.
- MAZZEI, F.; BOTRE, F.; BOTRE, C. *Analytica Chimica Acta*. [S. l.], v. 336, p. 67-75. 1996.



METODOLOGIAS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DE DUAS ENZIMAS COM POTENCIAL USO EM BÍOSENSORES

Claudio M. Jonsson*, Vera L.S. de Castro, Christina M. Tessari, Gustavo Granero

Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

*jonsson@cnpmma.embrapa.br

Projeto Componente: PC2 Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

Resumo

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) fazem parte dos sistemas antioxidantes nos seres vivos. A alteração da atividade da CAT e SOD extraídas de organismos expostos a poluentes químicos tem sido estudada na avaliação ecotoxicológica. São apresentados os resultados preliminares referentes à implementação de metodologias para avaliar as atividades de SOD e CAT frente à possível ação de diversos poluentes de origem agrícola. As metodologias empregadas demonstraram ser satisfatórias para estudos do potencial das enzimas no desenvolvimento de biossensores. Entretanto, alguns ajustes metodológicos poderão ser realizados com relação a uma melhor adaptação às condições laboratoriais.

Palavras-chave: biossensor, catalase, superóxido dismutase

Introdução

As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) fazem parte dos sistemas antioxidantes nos seres vivos pela sua capacidade de neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio como a do anion superóxido e do peróxido de hidrogênio. Estas moléculas altamente reativas fazem parte de subprodutos do metabolismo normal e desempenham papel importante nos processos de sinalização celular. Entretanto, em situações de estresse celular, as espécies reativas de oxigênio podem aumentar significativamente levando a danos celulares como alteração do DNA, peroxidação de lipídeos e oxidação de aminoácidos nas proteínas¹. Portanto, a alteração da atividade da CAT e SOD extraídas de organismos expostos a poluentes químicos de diversas origens tem sido alvo de

estudo na análise de risco e monitoramento de áreas degradadas².

Nesse sentido, Farines e colaboradores³ testaram "in vitro" a capacidade de estrógenos fenólicos naturais e sintéticos em modular a SOD bovina; constatando que para alguns compostos a inibição da atividade era superior ou equivalente a ~90% na concentração de 100µM dos compostos. A mesma enzima, mas originária de eritrócitos, é inibida "in vitro" pela hidrazida maleica na concentração de ~40 µM⁴.

Alguns compostos tipicamente inibidores da CAT, entre estes, metais pesados como os sais de cianeto, tem a capacidade de inibir a enzima de origem microbiana em níveis menores de 10 µM. Para alguns desses compostos, como por exemplo, a azida sódica; têm sido propostos biossensores a base de CAT⁵.

Do mesmo modo biossensores a base de SOD tem sido propostos onde a atividade enzimática é

modulada pela presença de radicais superóxido⁶. Apesar de um significativo volume de dados da literatura a respeito de alteração das atividades de SOD e CAT em organismos expostos ao estresse de agroquímicos e outros poluentes de origem agrícola (estudos "in vivo"), existe uma carência de resultados de testes "in vitro". Entretanto, tanto para os estudos "in vivo" como "in vitro", os dados ainda são escassos frente ao grande número de princípios ativos existentes.

Os resultados destes estudos "in vitro", nos quais se mede a modulação da atividade enzimática pela adição do xenobiótico em um sistema de reação contendo a enzima e seu substrato, proporcionariam bases para o desenvolvimento de biossensores cujo funcionamento se fundamente na alteração da atividade de SOD e CAT.

No presente trabalho são apresentados os resultados preliminares realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança no que se refere à implementação de metodologias para avaliar as atividades de SOD e CAT, enzimas que serão testadas frente à possível ação de diversos poluentes de origem agrícola.

Materiais e métodos

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Ukeda e colaboradores⁷, em meio contendo 50 mM de tampão fosfato pH 8,0 juntamente com solução 3mM de xantina; solução 3mM de EDTA, solução 0,75mM de XTT e SOD (de leite bovino) em diferentes concentrações. A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase. A absorvância da cor púrpura desenvolvida foi medida em um espectrofotômetro Beckman DU-8B no comprimento de onda de 470 nm. A velocidade da reação em termos de mudança de absorvância em função do tempo ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) foi calculada por regressão linear simples.

A atividade da CAT foi medida segundo a metodologia descrita por Aebi⁸, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio como substrato em solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição da CAT de fígado bovino sendo que a absorvância foi monitorada em vários intervalos no comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV 1605 PC. A adição do inibidor de CAT, a azida sódica, nas suas concentrações finais de 100, 10 e 1 mM foi avaliada. A velocidade da reação foi calculada como descrito anteriormente.

Resultados e discussão

A metodologia de análise de SOD se fundamenta em que a enzima xantina oxidase, tendo como seu substrato a xantina e na presença de O_2 , forma um sistema gerador de anions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Estas espécies reativas de oxigênio, na presença de um cromóforo como o XTT (sal de tetrazólio), reduzem este composto para formar um derivado de formazano que absorve luz no comprimento de onda de 470 nm. Entretanto esta redução é inibida na presença de SOD pelo fato de requerer $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar peróxido de hidrogênio na presença de cátions H^+ .

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de um teste onde se avaliou a viabilidade da metodologia a ser adotada na análise da atividade de SOD nos futuros estudos a serem realizados com diferentes substâncias poluentes de origem agrícola.

Analogamente, na Figura 1 estão apresentados os resultados de um teste de avaliação de uso da metodologia proposta para os futuros ensaios com CAT em presença dos xenobióticos.

Tabela 1: Velocidade de redução de XTT na ausência e na presença de diferentes concentrações de SOD.

Concentração de SOD (U/mL)	Velocidade da reação ($\Delta\text{Abs}_{470\text{nm}}/\text{min}$)
0,00	0,0075
0,45	0,0029
0,90	0,0016
2,26	0,0015

Os resultados da Tabela 1 demonstraram a diminuição da redução do XTT em função da concentração de SOD, sugerindo-se que exista uma concentração em que esse fenômeno se mantenha estável, mesmo aumentando-se a concentração desta enzima. O aumento da absorvância nos 20 min iniciais da reação na ausência de SOD foi equivalente a aproximadamente 0,12; estando de acordo com os resultados de Ukeda e colaboradores⁷.

Os resultados da Figura 1 mostraram a diminuição da absorvância do peróxido de hidrogênio em aproximadamente 60%, para o tempo de reação de 130 segundos, evidenciando assim o consumo do substrato pela CAT. A absorvância inicial da reação foi de aproximadamente 0,2, ou seja dentro da faixa de análise. Entretanto, a ação desta

enzima foi inibida na presença da azida sódica nas três concentrações testadas.

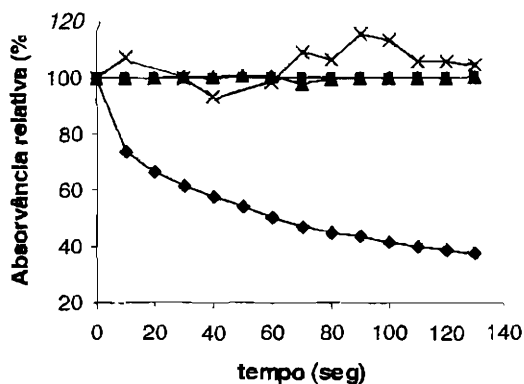


Figura 1: Absorvância (240 nm) do peróxido de hidrogênio em função do tempo de reação com CAT, na ausência (♦) e na presença de azida sódica nas concentrações de 100 (■); 10 (▲) e 1 (×) mM. Os valores são relativos a absorvância inicial, que foi tomada como 100%.

Conclusões

Com base nos dados obtidos até o momento, as metodologias aqui propostas para a avaliação da atividade de SOD e CAT demonstraram ser satisfatórias para o uso em estudos com agentes poluentes de origem agrícola. Entretanto, alguns testes poderão ser realizados com relação a uma melhor adaptação às nossas condições laboratoriais.

Referências

1 WORTH, A. C.; BAILEY, B. (Ed). **The Handbook of Oxidative Metabolism**. Chelmsford: ESA Inc, 1995.

2 PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ. B.; RAISUDDIN, S. **Markers of oxidative stress: a comparative**

study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci Total Environ**. [S. l.], v. 309, p. 105-115, 2003.

3 FARINES, V.; MONJE, M. C.; TELO, J. P.; HNAWIA, E.; SAUVAIN, M.; NEPVEU, F. Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 513, p. 103-111, 2004.

4 DOWLA, H. A.; PANEMANGALORE, M.; BYERS, M. E. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, [S. l.], v. 31, p. 107-114, 1996.

5 SEZGINTURK, M. K.; GOKTUG, T.; DINÇKAYA, E. A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 21, p. 684-688, 2005.

6 CAMPANELLA, L.; PERSI, L.; TOMASSETTI, M. Superoxide and nitric oxide radicals as modulating agents of enzymatic sensor responses. In : **WORKSHOP ON CHEMICAL SENSORS AND BIOSENSORS, 2**. [Anais...]. Rome: University of Rome "La Sapienza", Chemistry Department, 1999.

7 UKEDA, H.; MAEDA, S.; ISHII, T.; SAWAMURA, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. **Anal. Biochem.**, [S. l.], v. 251, p. 251, 206-209, 1997.

8 AEBI, H. E. Catalase. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3th ed. Weinheim: Verlagchemie GmbH, 1983. v. 3.