

ESTUDOS DE TOXICIDADE DE AGROQUÍMICOS NA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA DE *Daphnia similis*.

Dantzger, M.D.¹, Dantzger, D.D.², Prestes, E. B.¹, Jonsson, C.M.³, Aoyama, H.¹

¹Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

²Universidade Estadual de Campinas - CESET/Limeira

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Meio Ambiente/Jaguariúna

mi_dantzger@hotmail.com

Palavras-chave: fosfatase, toxicidade, *Daphnia similis*

1. Introdução

Os diversos compostos químicos liberados no ambiente oriundos do uso indiscriminado na agricultura, pecuária e na indústria são responsáveis por efeitos ecológicos adversos, causando a contaminação do solo e corpos d'água e acumulando-se em organismos não alvo. O tratamento dos esgotos resulta na produção do lodo de esgoto, o qual muitas vezes é utilizado como fonte alternativa de nutrientes para as plantas devido ao seu alto teor de matéria orgânica. Contudo, o lodo pode conter metais pesados em sua composição advindos principalmente do setor industrial, os quais podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, além da possibilidade de transferência para outros organismos via cadeia alimentar ou pela contaminação das águas (CHANG *et al.*, 1987).

Embora o controle químico de pragas tenha reduzido o índice de doenças para homens e animais e incrementado a produção agrícola, agentes poluentes podem permanecer ativos no ambiente por longos períodos, afetando os ecossistemas. Os efeitos desses agentes ao longo do tempo representam um grande risco para a saúde pública, tornando-se necessário o monitoramento em águas, solos, alimentos e ar. Nesse contexto, as alterações ao nível bioquímico são as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis em uma mudança do meio ambiente, sendo indicadores mais sensíveis que os de maiores níveis de organização biológica porque exibem um tempo de exposição mais curto.

A partir do processo de bioacumulação, os agentes poluentes podem se concentrar em diferentes tecidos e promover a ativação ou inibição de sistemas enzimáticos, tais como o das fosfatases ácidas (JONSSON, 2005; JONSSON, AOYAMA, 2007). As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que catalisam a hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfato e reações de transfosforilação. Inibições *in vitro* de fosfatases de vários organismos causadas por pesticidas, têm sido relatadas na literatura (SEKEROGU *et al.*, 1980; EL DEMERDASH *et al.*, 2001). O ensaio enzimático *in vitro* representa uma ferramenta útil para o *screening* de poluentes, elucidação de mecanismos de toxicidade e monitoramento de áreas contaminadas. Entretanto, os testes de toxicidade em organismos aquáticos podem complementar as análises *in vitro*.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de agentes agroquímicos e metais pesados contaminantes de lodo de esgoto sobre a fosfatase ácida total de *Daphnia similis*, comparando-se com os resultados obtidos em testes de toxicidade aguda.

2. Material e Métodos

2.1 Químicos

Soluções estoque de compostos orgânicos foram preparados em acetona e os metais pesados em água Milli-Q. Foram selecionados 10 agrotóxicos (dieldrin, BHC, endosulfan, acefato, chlorpirifos, dimethoato, trichlorfon, metamidophos, atrazine, trifuralin) e 3 metais pesados (Cu²⁺, Al³⁺ e Se⁴⁺). Todos os reagentes estavam em grau cromatográfico.

2.2 Organismo e condições de crescimento

Daphnia similis (Crustacea/Cladocera) foi cultivada, baseando-se na norma da OECD (1984), em água reconstituída ou de fonte natural ($20\pm 2^\circ\text{C}$) e alimentada com algas clorofíceas unicelulares das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella pyrenoidosa*.

2.3 Preparo do extrato

O extrato foi preparado macerando-se aproximadamente 200 organismos (100 mg p.u.) em acetato de sódio 1 M (pH 5,0) (1:4, p:v). Todos os procedimentos foram realizados a 4°C . O homogeneizado obtido foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante constituiu o extrato límpido a ser utilizado nas dosagens bioquímicas.

2.4 Efeito de amostras pré-incubadas

A atividade foi determinada na presença de cada poluente com a concentração máxima de 2mM. Determinadas quantias das soluções estoques preparadas em acetona foram adicionadas em tubos de vidro e submetidas a uma leve corrente de N_2 para evaporar o solvente. Nos compostos orgânicos com baixa solubilidade, adicionou-se 50 ou 75 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo as concentrações finais de 5% e 7,5% do adjuvante. A atividade foi determinada em amostras pré-incubadas durante 20 min a 37°C . Após esse tempo, a reação foi iniciada pela adição de substrato e incubada como descrito no subitem 2.5. Os tubos foram ensaiados juntamente com um controle (sem poluente) na presença ou ausência de DMSO.

2.5 Ensaio da atividade da fosfatase ácida

A atividade da fosfatase foi rotineiramente ensaiada, ao menos em duplicata, de acordo com JONSSON, AOYAMA (2007). A atividade da fosfatase ácida foi determinada a 37°C usando-se como substrato o p-nitrofenilfosfato (pNPP) 0,1M em tampão acetato 0,1M (pH 5,0), em um volume final de 1 ml. Após 40 min paralisou-se a reação com 1 ml de NaOH 1M e mensurou-se a liberação do p-nitrofenol a 405 nm.

2.6 Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado com base no protocolo da OECD (1984). O método consistiu na exposição de 5 neonatos de *Daphnia similis* a cada concentração do agente tóxico, em duplicata ($n=10$), por 24 e 48 hs, a 22°C sem alimentação, sendo que no controle foi utilizado somente o meio de cultivo. Indivíduos móveis foram contados como sobreviventes. Variáveis físico-químicas (oxigênio dissolvido, condutividade, pH, dureza total) foram registradas antes e após o experimento. Tal procedimento permitiu obter a CE50 (Concentração Efetiva Média), a qual se refere à concentração do tóxico que mata ou imobiliza 50% dos organismos expostos por um tempo específico.

2.7 Análise dos dados e estatística

Os resultados foram expressos como média \pm dp e submetidos à análise estatística, utilizando-se testes de variância (ANOVA), sendo $p\leq 0,05$. O valor da CE50 e seu intervalo de confiança 95% de certeza foram calculados utilizando-se o Statgraphics Plus Versão 5.1.

3. Resultados e Discussão

Dos 13 poluentes testados, somente 2 apresentaram efeitos consideráveis ($\geq 50\%$) sobre a atividade enzimática, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito de poluentes orgânicos e metais pesados sobre a atividade da fosfatase ácida de *Daphnia similis*

Poluente	Concentração (mM)	Concentração (mg/L)	Atividade Relativa (%)	Desvio Padrão (%)
Controle	—	—	100	0
Trifuralin	0,003	0,001	89,94	2,76
Endosulfan	0,1	0,041	90,9	2,65
BHC	0,25	0,073	80,58	9,71
Dieldrin	0,25	0,095	96,58	8,63
Atrazine	0,5	0,108	87,95	7,01
Clorpirifos	1	0,351	87,32	0,09
Trichlorfon	1	0,257	79,68	2,7
Acefato	2	0,366	94,2	6,2
Dimethoate	2	0,459	86,35	9,3
Metamidophos	2	0,282	89,86	4,98
Cu ⁺⁺	2	0,499	72,95	4,77
Al ⁺⁺⁺	2	0,684	45,64*	0,59
Se ⁺⁺⁺⁺	2	0,526	47,91*	2,3

* significativamente diferente do controle, $p < 0.05$

A fosfatase ácida foi inibida por Al³⁺ e Se⁴⁺ em valores similares quando testados na concentração de 2mM. Variando-se a concentração do Al³⁺ e Se⁴⁺ obteve-se o valor de IC50 (concentração promove 50% de inibição da atividade enzimática) iguais a 1,96 e 1,06 mM, respectivamente. Os dados obtidos foram ajustados por regressão linear que gerou uma curva do tipo log-x ($y = a + b \cdot \ln(x)$) para ambos os metais, conforme observado nas figuras 1 e 2.

A Tabela 1 mostra que o Cu²⁺ inibiu cerca de 25% a atividade da fosfatase ácida. Khangaroth, Rathore (2003) observaram inibição significativa de 16% das fosfatases ácidas e 29% das alcalinas em 48hs de exposição ao metal (0,1mg/L). Nossos resultados diferem dos observados por Jonsson *et al.* (2007) com a fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, no qual o Cu²⁺ (2mM) comportou-se como ativador. Na Tabela 1 pode-se observar ainda que o acefato não foi capaz de alterar a atividade da fosfatase *in vitro* na concentração testada (0,37mg/L). Entretanto, o estudo de toxicidade aguda do poluente durante 24 e 48hs, permitiu obter uma CE50 (com intervalo de confiança 95%) de 171,83 (129,11-257,97) e 54,56 (39,37-77,38) mg/L, respectivamente, mostrando que o poluente afeta o organismo em concentrações mais superiores que a testada *in vitro*. Esses resultados mostram um declínio progressivo nos valores de CE50 entre 24-48hs de exposição, sugerindo um aumento na toxicidade com o aumento do período de exposição.

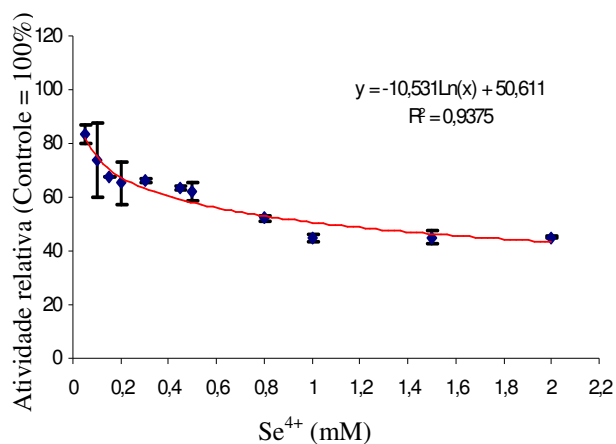


Figura 1. Efeito da concentração de Se⁴⁺ na atividade da fosfatase ácida de *D. similis*.

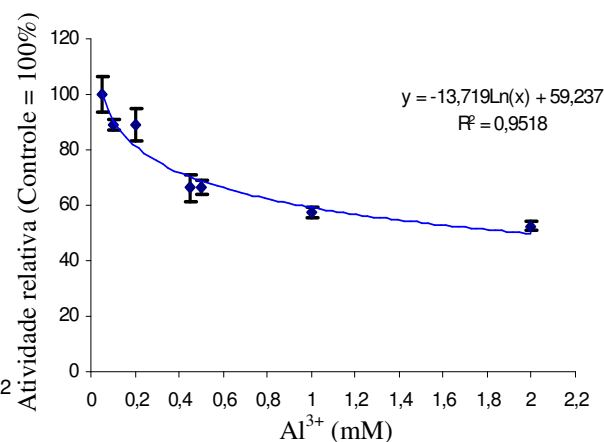


Figura 2. Efeito da concentração de Al³⁺ na atividade da fosfatase ácida de *D. similis*.

4. Referências Bibliográficas

- Chang, A. C; Hinesly, T.D.; Bates, T.E.; Doner, H.E.; Dowdy, R.H.; Ryan, J.A. Effect of long-term sludge application on accumulation of trace elements by crops. In: Page, A.L.; Logan, T.G.; Ryan, J.A. Land application of sludge. Celsea: **Lewis Publishers** p.53-66, 1987.
- El Demerdash, F.M.; Yousef, M.I.; Elagamy, E.I. Influence of paraquat, glyphosate ad cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behaviour (*in vitro*). **J. Environ. Sci. Heal.** v.36, p.29-42, 2001.
- Jonsson, C.M. **Fosfatase ácida da microalga Selenastrum capricornutum : extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola.** Tese de Doutorado em Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia, UNICAMP, 2005.
- Jonsson, C.M., Aoyama, H. *In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on Pseudokirchneriella subcapitata acid phosphatase. **Chemosphere** v.69, p.849-855, 2007.,
- Khangarot, B.S., Rathore, R.S. Effects of copper on respiration, reproduction, and some biochemical parameters of water flea *Daphnia magna* Straus. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.70, p.112-117, 2003.
- OECD. **Guidelines for Testing of Chemicals.** *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test, 202. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.
- Sekeroglu, M.R.; Celik, I.; Arslan, O. Influence of some pesticides on activity of seven serum enzymes (*in vitro*). **J. Environ. Sci. Heal.** v.32, 1975-1980.

5. Apoio

CAPES, EMBRAPA.