

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Miriam Dantzger



“FOSFATASES DE *Daphnia similis*
COMO BIOMARCADORES DA ECOTOXICIDADE
DE AGROQUÍMICOS”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Miriam Dantzger
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular na área de concentração
em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Co-Orientador: Dr. Claudio Martín Jonsson

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D236f

Dantzger, Miriam

Fosfatases de *Daphnia similis* como biomarcadores da ecotoxicidade de agroquímicos / Miriam Dantzger. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Daphnia similis*. 2. Biomarcadores. 3. Ecotoxicidade. 4. Fosfatases. I. Aoyama, Hiroshi, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: *Daphnia similis* phosphatases as biomarkers of agrochemicals ecotoxicity.

Palavras-chave em inglês: *Daphnia similis*; Biomarkers; Ecotoxicity; Phosphatases.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Hiroshi Aoyama, Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro, Willian Fernando Zambuzzi.

Data da defesa: 25/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 25 de fevereiro de 2010.

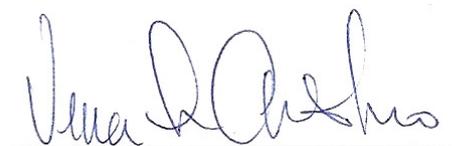
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica



Assinatura

Dra. Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro
Embrapa Meio Ambiente – LEB



Assinatura

Dr. Willian Fernando Zambuzzi
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica



Assinatura

Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica



Assinatura

Dra. Anne Hélène Fostier
UNICAMP – IQ – Depto. Química Analítica



Assinatura

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou e acreditou nas minhas capacidades: ao meu pai Dalziro e à minhas duas mães, Lenira (in memoriam) e Raquel, aos meus avós Domingos e Sebastiana, os quais considero verdadeiros exemplos de honestidade, amor e superação. Também dedico aos meus irmãos Darlene, Natália e Arthur pelo companheirismo, amizade e diversos momentos de alegrias e distrações. Ao meu namorado e amigo Fernando que sempre esteve ao meu lado quando eu precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por gozar de saúde e pelas grandes oportunidades oferecidas ao longo de minha vida.

À minha família, que é o meu esteio e razão de viver e sempre me incentivou a lutar pelos meus desejos.

Agradeço à Fapesp (Processo 08/52391-5) e à Embrapa Meio Ambiente por tornar a execução deste trabalho possível.

Sou eternamente grata ao professor Hiroshi por confiar na minha competência e me dar toda a liberdade necessária para a execução deste estudo, por me acolher em seu laboratório e estar sempre disposto a auxiliar nas metodologias e discussões.

Ao Claudio e à Vera e aos demais funcionários e pesquisadores do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna) por toda a infraestrutura fornecida, apoio e amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Enzimologia, Erika, Camila, Claudinha, Willian e aos estagiários pela convivência agradável, grande amizade e auxílio durante os experimentos.

À professora Carmen, e seu grupo de pesquisa do Laboratório de Transdução de Sinal, que deram grandes dicas e auxiliaram durante as discussões.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biomembranas, especialmente à professora Eneida e ao Marcio por terem me disponibilizado a utilização de alguns equipamentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Proteínas (Laquip) e do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex) pelo fornecimento de materiais.

Aos membros da banca de qualificação, professora Carmen Veríssima Ferreira, Willian Zambuzzi e Dra. Vera Lucia S. S. de Castro e da banca de examinadores da dissertação.

A todos os professores do programa de pós graduação em Biologia Funcional e Molecular, por colaborarem com meu crescimento profissional e intelectual.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, especialmente à Andréia e ao Rafael pela dedicação, eficiência e disponibilidade.

Meu muito obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho!

“A teoria sem a prática é puro verbalismo inoperante, a prática sem a teoria é um atavismo cego”.

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XIV
LISTA DE APÊNDICES	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Poluição dos corpos hídricos por pesticidas e metais</i>	<i>1</i>
2. <i>Toxicidade e bioacumulação de poluentes nos organismos aquáticos.....</i>	<i>5</i>
3. <i>Toxicidade dos agrotóxicos.....</i>	<i>8</i>
3.1. <i>Toxicidade do inseticida permetrina para os organismos aquáticos.....</i>	<i>9</i>
4. <i>Toxicidade dos metais</i>	<i>12</i>
4.1. <i>Toxicidade dos íons alumínio, selênio, cádmio e molibdênio em organismos aquáticos.....</i>	<i>13</i>
5. <i>Biologia do gênero Daphnia</i>	<i>21</i>
5.1. <i>Importância do gênero Daphnia.....</i>	<i>24</i>
5.2. <i>Uso de Daphnia como indicador de toxicidade ambiental</i>	<i>25</i>
6. <i>Biomarcadores</i>	<i>27</i>
6.1. <i>Marcadores bioquímicos.....</i>	<i>28</i>
7. <i>Fosfatases: definição e classificação.....</i>	<i>30</i>
7.1. <i>Importância das fosfatases para organismos aquáticos.....</i>	<i>31</i>
7.2. <i>Efeito de poluentes sobre as fosfatases de organismos aquáticos</i>	<i>32</i>
8. <i>Legislação e necessidades de pesquisa.....</i>	<i>33</i>
II. OBJETIVOS	34

III. METODOLOGIA	35
1. <i>Organismos e condições de cultivo.....</i>	35
2. <i>Preparo do extrato</i>	37
3. <i>Determinação da atividade enzimática.....</i>	37
3.1. <i>Dosagem do p-nitrofenol (pNP).....</i>	37
3.2. <i>Dosagem do fosfato.....</i>	38
4. <i>Determinação de proteína.....</i>	38
5. <i>Estudos cinéticos da fosfatase ácida total (FAT) presente no extrato bruto</i>	38
5.1. <i>Estabilidade da FAT de <i>D. similis</i> durante o armazenamento a baixas temperaturas</i>	38
5.2. <i>Efeito do pH na atividade da FAT de <i>D. similis</i></i>	39
5.3. <i>Determinação das constantes cinéticas da FAT de <i>D. similis</i></i>	39
6. <i>Caracterização das atividades de serina-treonina fosfatases e tirosina fosfatases do extrato bruto</i>	40
6.1. <i>Especificidade por substratos das fosfatases de <i>D. similis</i>.....</i>	40
6.2. <i>Efeito de inibidores na atividade das fosfatases de <i>D. similis</i>.....</i>	40
7. <i>Avaliação do efeito in vitro de poluentes na atividade das fosfatases de <i>D. similis</i>.....</i>	41
7.1. <i>Agentes químicos</i>	41
7.2. <i>Avaliação comparativa do efeito in vitro de poluentes na atividade das fosfatases ácida e alcalina de <i>D. similis</i></i>	42
7.3. <i>Determinação da IC50 e constantes de inibição (Ki) dos íons alumínio, selênio e molibdênio na FAT</i>	43
7.4. <i>Efeito do cádmio sobre a energia de ativação da FAT</i>	43
8. <i>Estudos in vivo</i>	44
8.1. <i>Ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i></i>	44
8.2. <i>Efeito da ação conjunta dos poluentes Al³⁺, Cd²⁺, Se⁴⁺ e Mo⁶⁺ sobre <i>D. similis</i>.....</i>	44
8.3. <i>Efeito in vivo dos poluentes Al³⁺, Cd²⁺, Se⁴⁺, Mo⁶⁺ e permetrina na atividade da FAT de <i>D. similis</i>.....</i>	46
9. <i>Análise dos resultados.....</i>	46

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1. <i>Estudos cinéticos da FAT presente no extrato bruto</i>	47
1.1. Estabilidade da FAT de <i>D. similis</i> durante o armazenamento a baixas temperaturas	47
1.2. Efeito do pH na atividade da FAT de <i>D. similis</i>	50
1.3. Determinação das constantes cinéticas da FAT de <i>D. similis</i>	52
2. <i>Caracterização das atividades de serina-treonina fosfatases e tirosina fosfatases do extrato bruto</i>	56
2.1. Especificidade por substratos das fosfatases de <i>D. similis</i>	56
2.2. Efeito de inibidores na atividade das fosfatases de <i>D. similis</i>	60
3. <i>Avaliação do efeito in vitro de poluentes na atividade das fosfatases de D. similis.....</i>	65
3.1. Avaliação comparativa do efeito <i>in vitro</i> de poluentes na atividade das fosfatases ácida e alcalina de <i>D. similis</i>	65
3.2. Determinação da IC50 e constantes de inibição (Ki) dos íons alumínio, selênio e molibdênio na atividade da FAT	69
3.3. Efeito do cádmio sobre a energia de ativação da FAT	77
4. <i>Estudos in vivo</i>	79
4.1. Ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i>	79
4.2. Análise da ação conjunta dos poluentes Al ³⁺ , Cd ²⁺ , Se ⁴⁺ e Mo ⁶⁺ sobre a toxicidade aguda em <i>D. similis</i>	85
4.3. Efeito <i>in vivo</i> dos poluentes Al ³⁺ , Cd ²⁺ , Mo ⁶⁺ , Se ⁴⁺ e permetrina na atividade da FAT de <i>D. similis</i>	87
4.4. Efeito <i>in vivo</i> da mistura dos poluentes Al ³⁺ , Cd ²⁺ , Mo ⁶⁺ e Se ⁴⁺ sobre a atividade da FAT de <i>D. similis</i>	92
V. CONCLUSÕES	96
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	98
VII. REFERÊNCIAS.....	99
VIII. ANEXOS.....	117
IX. APÊNDICES.....	124

ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
AE	Atividade específica da enzima
ChE	Colinesterase
CMP	Concentração máxima permissível
CP	Crescimento populacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
Ea	Energia de ativação
EC1	Concentração do poluente que imobiliza 1% dos organismos
EC50	Concentração efetiva média
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FAB	Fosfatase ácida de baixa massa molecular
FAT	Fosfatase ácida total
FATR	Fosfatase ácida intermediária ou tartarato resistente
FMN	Flavina mononucleotídeo
FT	Fator de toxicidade
IA	Índice de aditividade
IC50	Concentração de inibição média
IMOA	International Molybdenum Association
KDa	QuiloDaltons
Ki	Constante de inibição enzimática
Km	Constante de Michaelis-Menten
LAS	Alquil benzeno sulfonato linear
LC50	Concentração letal a 50% dos organismos
LE	Lodo de esgoto
Mr	Massa molecular relativa
OD	Oxigênio dissolvido
p-CMB	p-cloromercuribenzoato
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
Pi	Fosfato inorgânico
pNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitrofenilfosfato
PPi	Pirofosfato inorgânico
S	Soma da aditividade
UE	Unidade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)
V	Velocidade inicial da reação enzimática
Vmax	Velocidade máxima da reação enzimática
Vmax/Km	Constante de especificidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da permetrina	11
Figura 2. A: <i>Daphnia magna</i> fêmea e suas estruturas funcionais. B: <i>Daphnia magna</i> macho e algumas estruturas responsáveis pela sua caracterização	23
Figura 3. Ciclo de vida do gênero <i>Daphnia</i>	24
Figura 4. Organismos e condições de cultivo..	36
Figura 5. Estabilidade da FAT de <i>D. similis</i>	48
Figura 6. Análise comparativa da atividade específica da FAT de <i>D. similis</i> sob diferentes condições de estocagem.....	49
Figura 7. Atividade das fosfatases de <i>D. similis</i> em função do pH.	51
Figura 8. Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação de Km e Vmax da fosfatase ácida de <i>D. similis</i>	54
Figura 9. Gráfico de Arrhenius na determinação energia de ativação (Ea) da fosfatase ácida de <i>D. similis</i>	55
Figura 10. Especificidade para substratos da fosfatase alcalina de <i>D. similis</i>	58
Figura 11. Especificidade para substratos da fosfatase ácida de <i>D. similis</i>	59
Figura 12. Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase alcalina de <i>D. similis</i>	63
Figura 13. Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase ácida de <i>D. similis</i>	64
Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina de <i>D. similis</i> afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola.....	67
Figura 15. Atividade da fosfatase ácida de <i>D. similis</i> afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola.....	68
Figura 16. Efeito da concentração do íon alumínio na atividade da FAT de <i>D. similis</i>	71
Figura 17. Efeito da concentração do íon selênio na atividade da FAT de <i>D. similis</i>	72
Figura 18. Efeitos das concentrações do íon molibdato na atividade da FAT de <i>D. similis</i>	73
Figura 19. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da Ki do alumínio na inibição da FAT de <i>D. similis</i>	74
Figura 20. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da Ki do selênio na inibição da FAT de <i>D. similis</i>	75

Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da K_i do molibdênio na inibição da FAT de <i>D. similis</i>	76
Figura 22. Gráfico de Arrhenius na determinação da energia de ativação (E_a) da fosfatase ácida de <i>D. similis</i> na ausência ou na presença de íons cádmio.	78
Figura 23. Atividade da FAT de <i>D. similis</i> exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Alumínio, B. Cádmio, C. Molibdênio.	89
Figura 24. Atividade da FAT de <i>D. similis</i> exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Selênio, B. Permetrina.	90
Figura 25. Atividade da FAT de <i>D. similis</i> exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Al + Cd, B. Al + Se, C. Al + Mo.....	94
Figura 26. Atividade da FAT de <i>D. similis</i> exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Cd + Se, B. Cd + Mo, C. Se + Mo.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de metais e semimetais em alguns insumos e subprodutos utilizados na agricultura	4
Tabela 2. Níveis máximos de metais permitidos em água potável	5
Tabela 3. Propriedades físico-químicas da permetrina.....	11
Tabela 4. Toxicidade da permetrina para organismos aquáticos.....	11
Tabela 5. Algumas propriedades físicas e químicas do Al	13
Tabela 6. Algumas propriedades físico-químicas do Se.....	15
Tabela 7. Algumas propriedades físico-químicas do Cd.....	18
Tabela 8. Valores máximos permitidos do metal Cd nos corpos de água doce.....	18
Tabela 9. Algumas propriedades físico-químicas do Mo	20
Tabela 10. Toxicidade de diversas formas de Mo para peixes, daphnias e algas	20
Tabela 11. Parâmetros cinéticos da FAT de <i>D. similis</i>	52
Tabela 12. Ensaio de toxicidade aguda 48hs com os poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} , e permetrina.....	80
Tabela 13. Níveis de toxicidade subletais para Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} e permetrina.....	81
Tabela 14. Toxicidade aguda e aditividade dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} e Mo^{6+} a <i>D. similis</i>	86

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Preparo de água reconstituída para cultivo de <i>D. similis</i>	117
Anexo 2. Preparo do meio de cultura de <i>S. capricornutum</i> (OECD, 1981) para se utilizar como alimento para <i>D. similis</i>	118
Anexo 3. Características gerais de alguns compostos orgânicos analisados.....	120

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Solubilidade dos compostos orgânicos analisados, concentração das soluções estoque e a concentração utilizada nos experimentos para cada poluente	124
Apêndice 2. Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) na atividade da fosfatase ácida de <i>D. similis</i>	125
Apêndice 3. Ensaio de toxicidade aguda 48hs com dicromato de potássio	126
Apêndice 4. Carta controle da sensibilidade das culturas de <i>D. similis</i> à substância de referência dicromato de potássio.....	127
Apêndice 5. Parâmetros físico-químicos da água de diluição, antes e após o experimento, com os poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} e permetrina	128

RESUMO

Daphnia similis é um microcrustáceo da família dos cladóceros que se encontra amplamente distribuído em ambientes de água doce. Devido a sua natureza cosmopolita e sensibilidade, o seu uso em estudos de ecotoxicidade, como biomarcador, é recomendado em protocolos nacionais e internacionais. Agentes poluentes como os agrotóxicos, efluentes industriais e metais são diariamente despejados nos corpos d'água, influenciando sistemas locais e podendo causar efeitos toxicológicos aos organismos aquáticos. Tendo em vista a necessidade da normalização de biomarcadores enzimáticos, nossa proposta foi analisar a atividade enzimática de fosfatases de *D. similis* como uma alternativa. Especificamente, nossos objetivos foram: a) analisar o efeito de poluentes agrícolas e metais nas atividades *in vitro* de fosfatases ácidas e alcalinas de *D. similis*, com o intuito de selecionar a enzima mais sensível à ação dos poluentes; b) realizar estudos mais detalhados *in vitro* com a fosfatase mais sensível na presença de poluentes pré-selecionados; c) avaliar a atividade *in vivo* desta enzima perante concentrações subletais de poluentes provenientes de ensaios de toxicidade aguda. Dessa forma, foram analisados os efeitos *in vitro* de vários agentes poluentes (metais e pesticidas) nas atividades da fosfatase ácida total (FAT) e fosfatase alcalina. A FAT apresentou maior alteração em relação à fosfatase alcalina quando exposta aos poluentes *in vitro*, sendo que, dentre estes, os metais apresentaram efeitos mais significativos. Dos metais testados, Al^{3+} , Se^{3+} e Mo^{6+} , exibiram maior efeito inibitório, enquanto permetrina e Cd^{2+} apresentaram efeito ativador. A energia de ativação da reação catalisada pela FAT, usando-se p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato, foi reduzida de 13 para 10 Kcal.mol^{-1} na presença de 0,5mM de Cd^{2+} . Na reação catalisada pela FAT, os valores de IC50 (concentração do metal que promove 50% de inibição da atividade enzimática) obtidos para Al^{3+} , Se^{3+} e Mo^{6+} , foram, respectivamente: 1,23 mM, 0,54 mM e 0,9 μM . A inibição da FAT mostrou-se do tipo não competitiva para o Al^{3+} e do tipo competitiva para Se^{3+} e Mo^{6+} , com os seguintes valores de constante de inibição (K_i): 0,9 mM para o Al^{3+} ; 0,62 mM para o Se^{3+} e 1,32 μM para o Mo^{6+} . Nos ensaios *in vivo* de toxicidade aguda 48h com *D. similis*, a permetrina apresentou maior toxicidade comparada aos demais poluentes, sendo que a ordem de toxicidade, em mM, foi: Permetrina (0,000056) > Cd^{2+} (0,00139) > Se^{4+} (0,004) > Mo^{6+} (0,024) > Al^{3+} (0,072).

A ordem de inibição da atividade da FAT de *D. similis* exposta ao EC50 (48h) assemelhou-se à obtida nos ensaios de toxicidade aguda (Cd^{2+} > permetrina > Al^{3+} > Mo^{6+}), sugerindo uma relação entre alteração de atividade enzimática com a toxicidade dos poluentes ao modelo biológico em estudo. Nos ensaios de toxicidade aguda também foram estudados os efeitos da mistura binária dos metais Al^{3+} , Cd^{2+} , Mo^{6+} e Se^{4+} . Observou-se que somente Al^{3+} + Cd^{2+} ($S = 0,588$) e Al^{3+} + Mo^{6+} ($S = 0,951$) apresentaram efeito sinérgico sobre *D. similis*, constatado pelo valor de $S < 1$; nas mesmas condições, a mistura Al^{3+} + Se^{4+} não mostrou nenhuma alteração significativa. A ordem de inibição da atividade da FAT para a concentração de EC50 e seus respectivos percentuais foram: Al^{3+} + Cd^{2+} (90%) > Al^{3+} + Mo^{6+} (78%) > Se^{4+} + Cd^{2+} (72%) > Mo^{6+} + Cd^{2+} (32%). Contraditoriamente, a mistura Se^{4+} + Mo^{6+} promoveu uma ativação de 50% na atividade enzimática nos mesmos níveis de toxicidade analisados para as demais misturas. Esses resultados evidenciam a necessidade de complementar os testes de toxicidade aguda com mistura de poluentes a partir da utilização de biomarcadores enzimáticos, tais como a FAT. Concluiu-se que a FAT, através da alteração de sua atividade *in vivo*, pode ser utilizada como biomarcadora de toxicidade em nível letal (EC50), para os poluentes permetrina e Al^{3+} e, em níveis subletais, para Cd^{2+} e Se^{4+} , podendo-se predizer o impacto ambiental.

ABSTRACT

Daphnia similis, a microcrustacean of the cladoceran's family, is widely found in freshwater environment. Because of its cosmopolitan nature and sensitivity, this organism is recommended by national and international protocols as a biomarker in ecotoxicity analyses. Agrochemicals, industrial effluents and metals are daily released in the rivers, impairing local living systems and causing toxicological effects on aquatic organisms. In order to contribute with enzymatic biomarkers normalization, our purpose was to evaluate *D. similis* phosphatases activities in the presence of several pollutants. Specifically, our aim was: a) to analyze *in vitro* effects of metals and agrochemicals on *D. similis* alkaline and acid phosphatases activities, in order to select the more pollutants-sensitive enzyme; b) to perform more detailed *in vitro* studies with those more sensitive enzyme and selected pollutants; c) to analyze the *in vivo* activity of this enzyme at sub-lethal levels of pollutants, derived from acute toxicity assays. In this way, *in vitro* effects of several pollutants (metals and pesticides) were evaluated on total acid phosphatase (TAP) and alkaline phosphatase activities. Our results showed that TAP presented higher alterations in relation to alkaline phosphatase when exposed to *in vitro* pollutants, from which the metals showed more remarkable effects. The metals Al^{3+} , Se^{3+} and Mo^{6+} exhibited higher inhibitory effects, whereas permethrin and Cd^{2+} presented activator effects. The activation energy of the reaction catalyzed by TAP, by using p-nitrophenylphosphate as substrate, was decreased from 13 to 10 kcal.mol⁻¹, in the presence of 0,5mM Cd^{2+} . IC50 (concentration of metal that promotes 50% of enzyme inhibition) values for Al^{3+} , Se^{3+} and Mo^{6+} were determined to be: 1.23 mM, 0.54 mM e 0.9 μM, respectively, in the TAP catalyzed reaction. The TAP inhibition was of non-competitive type for Al^{3+} , and competitive for Se^{3+} and Mo^{6+} , with inhibition constant (Ki) values ranging 0.9 mM, 0.62 mM and 1.32 μM, respectively. In the 48 hours acute toxicity assays with *D. similis*, permethrin presented higher effect in relation to the other pollutants, with the following toxicity order (mM): Permethrin (0.000056) > Cd^{2+} (0.00139) > Se^{4+} (0.004) > Mo^{6+} (0.024) > Al^{3+} (0.072). The inhibition order of *D. similis* TAP activity exposed to 48 hours EC50 was similar to the acute toxicity values (Cd^{2+} > permethrin > Al^{3+} > Mo^{6+}), suggesting a relationship between enzymatic activity alteration and the pollutants toxicity. Further, we decided to evaluate the effects of binary metals

mixtures of Al^{3+} , Cd^{2+} , Mo^{6+} and Se^{4+} on the acute toxicity assays, it was observed that only $\text{Al}^{3+} + \text{Cd}^{2+}$ ($S = 0.588$) and $\text{Al}^{3+} + \text{Mo}^{6+}$ ($S = 0.951$) exhibited synergic effects on *D. similis*, evidenced by the $S < 1$ values; at the same conditions the mixture $\text{Al}^{3+} + \text{Se}^{4+}$ did not show significant alterations. The TAP activity inhibition order for EC50 concentration and its respective percentuals were: $\text{Al}^{3+} + \text{Cd}^{2+}$ (90%) > $\text{Al}^{3+} + \text{Mo}^{6+}$ (78%) > $\text{Se}^{4+} + \text{Cd}^{2+}$ (72%) > $\text{Mo}^{6+} + \text{Cd}^{2+}$ (32%). On the other hand, the mixture $\text{Se}^{4+} + \text{Mo}^{6+}$ presented 50% enzyme activation at the same toxicity levels analyzed for the other mixtures. These results emphasize the need to complement acute toxicity tests with pollutants mixtures, using enzymatic biomarkers, such as TAP. In conclusion, TAP, through the alteration of its *in vivo* activity, could be used as a lethal level toxicity biomarker for the permethrin and Al^{3+} , and at sub-lethal levels for Cd^{2+} and Se^{4+} , predicting possible environmental impact.

I. INTRODUÇÃO

A emissão de agentes químicos de natureza antropogênica tem levado a um acréscimo da sua carga nos recursos naturais. Estima-se que há cerca de 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura científica e que 2 mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Tendo em vista as dificuldades de estudo, apenas 2 mil desses agentes químicos têm seus efeitos tóxicos conhecidos, o que aumenta a dificuldade de resolução de problemas em casos de acidentes ambientais (Zagatto & Bertolotti, 2008). Poluentes ambientais como agrotóxicos, hidrocarbonetos poliaromáticos, bifenilas policloradas e metais ingressam nos ecossistemas aquáticos a partir de áreas agrícolas, urbanas e industriais, resultando eventualmente em efeitos ecotoxicológicos. Assim sendo, os organismos aquáticos são freqüentemente expostos a diversos contaminantes químicos com diferentes mecanismos de toxicidade, cada qual contribuindo para um efeito final adverso. Conseqüentemente, nos programas de monitoramento de qualidade ecológica, a integração de dados físico-químicos com respostas biológicas (biomarcadores) é altamente recomendável na caracterização dos efeitos dos agentes tóxicos aos organismos do ecossistema (Barata *et al.*, 2005).

1. Poluição dos corpos hídricos por pesticidas e metais

Segundo a Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas, o consumo mundial de pesticidas tem alcançado a margem de 2,6 milhões de toneladas por ano, sendo o Brasil o terceiro maior consumidor de agrotóxicos, apresentando um aumento de 4,67% no consumo entre os anos de 1999 a 2007 (Menten, 2008). Entretanto, este crescimento progressivo vem causando sérios danos ao meio ambiente, uma vez que parte deste material incorpora-se às plantas e ao solo, e grande parte é transportada para os rios através das chuvas. Assim, fica claro que os efeitos do uso de pesticidas constituem um problema mundial, agravando-se pela utilização inadequada dos mesmos (Tsuda *et al.*, 1995; Wilson & Tisdell, 2001).

Os recursos hídricos agem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região. Sendo assim, quando pesticidas são introduzidos no ambiente,

os recursos hídricos, sejam superficiais ou subterrâneos, aparecem como o destino final principal destes poluentes. Solo e água atuam interativamente, portanto, qualquer ação que cause efeito adverso em um destes elementos, afetará o outro (Mattos & Silva, 1999 *apud* Ribeiro *et al.*, 2007). É importante ressaltar que, em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de pesticidas aplicados alcançam a peste alvo, enquanto o restante (99,9%) tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas (Sabik *et al.*, 2000 *apud* Ribeiro *et al.*, 2007).

Estudos desenvolvidos em várias regiões do mundo mostram que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os corpos hídricos é geralmente baixa, entretanto, pesticidas persistentes e com grande mobilidade no ambiente têm sido detectados nas águas superficiais e subterrâneas. A concentração da maioria dos inseticidas é baixa pelo fato de ser menos solúvel em água e também devido ao efeito de diluição. No entanto, mesmo em concentrações baixas, os inseticidas representam riscos para os organismos aquáticos por serem potencialmente bioacumuláveis (Dores & Freire, 2001; Pimpão, 2006).

Um trabalho interessante foi a avaliação da presença do pesticida tebutiuram, utilizado em larga escala atualmente, em amostras de água subterrânea de um poço semi-artesiano com 53 m de profundidade localizado na microbacia do Córrego Espriado, município de Ribeirão Preto (SP), que se situa sobre a área de recarga do Aquífero Guarani (Gomes *et al.*, 2001). O monitoramento, realizado entre 1995 e 1999, demonstrou que o tebutiuram estava presente em todas as amostras analisadas, embora em concentrações abaixo do nível crítico para o padrão de potabilidade estabelecidos pela Comunidade Econômica Européia ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ por pesticida em uso). Os autores alertam para o perigo de contaminação da água subterrânea pelo herbicida estudado, sendo que a concentração do mesmo pode aumentar devido à existência de condições ambientais favoráveis à preservação da molécula em profundidade, tais como baixa temperatura, baixa atividade biológica e ausência de luz.

Os processos naturais que contribuem para o aparecimento de metais em águas superficiais e subterrâneas são o intemperismo das rochas e a lixiviação do solo, enquanto que a contribuição antropogênica está relacionada principalmente com as atividades de mineração (carvão e jazidas minerais), geração de efluentes domésticos (principalmente

As, Cr, Cu, Mn e Ni), a queima de carvão para geração de energia (As, Hg e Se), a fundição de metais não ferrosos (Cd, Ni, Pb e Se), a obtenção do ferro e produção do aço (Cr, Mo, Sb e Zn) e o descarte do lodo de esgoto (As, Mn e Pb) (Dores & Freire, 2001). Alguns insumos agrícolas e subprodutos usados como fertilizantes e corretivos (fertilizantes, calcários, escórias, esterco) também podem contribuir para o aumento da concentração de metais pesados no solo e na água (Melo *et al.*, 2004). A **Tabela 1** mostra o conteúdo de metais em alguns insumos e subprodutos utilizados na agricultura.

Dependendo da fonte de captação, do processo de tratamento, do sistema de encanamento e armazenamento da água, esta pode conter quantidades variáveis de metais, de tal modo que os diferentes países se preocuparam em definir as quantidades máximas permitidas de metal na água para fins de consumo (Melo *et al.*, 2004). No Brasil, o Fundo Nacional de Saúde, através da Portaria FUNASA 1499/01, estabeleceu o máximo permitido de metais em águas potáveis, como se pode observar pela análise da **Tabela 2**.

Uma quantidade significativa dos metais presentes em águas superficiais dos grandes rios não poluídos encontra-se adsorvida à superfície de partículas sólidas que se mantêm em suspensão. Por outro lado, em pequenos rios submetidos à poluição, a fração solúvel pode ser bem maior. Em rios não poluídos a concentração de metais é muito baixa, da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹ (nM) ou 10^{-12} mol L⁻¹ (pM) (Melo *et al.*, 2004).

Tabela 1. Concentração de metais e semimetais em alguns insumos e subprodutos utilizados na agricultura

Elemento	LE	FF	Calcário	FN	Estercos	Pesticidas
(mg.Kg ⁻¹)						
Arsênio (As)	2-26	2-1200	0,1-24,0	2-120	3-150	22-60
Boro (B)	15-1000	5-115	10	6	0,3-0,6	-
Bário (Ba)	150-4000	200	120-150	-	270	-
Berilo (Be)	4-11	-	1	-	-	-
Bromo (Br)	20-165	3-5	-	8-716	16-41	20-85
Cádmio (Cd)	2-1500	0,1-170	0,04-0,1	0,05-8,5	0,3-0,8	-
Cério (Ce)	20	20	12	-	-	-
Cobalto (Co)	2-260	1-12	0,4-3,0	5-12	0,3-24	-
Cromo (Cr)	20-40600	66-245	10-15	3-19	5,2-55	-
Cobre (Cu)	50-3300	1-300	2-125	1-15	2-60	4-50
Germânio (Ge)	1-10	-	0,2	-	19	-
Mercúrio (Hg)	0,1-55	0,01-1,2	0,05	0,3-3,0	0,09-26	0,8-42
Manganês (Mn)	60-3900	40-2000	40-1200	-	30-550	-
Molibdênio (Mo)	1-40	0,1-60	0,1-15	1-7	0,05-3,0	-
Níquel (Ni)	16-5300	7-38	10-20	7-38	7,8-30	-
Chumbo (Pb)	50-3000	7-225	20-1250	2-1450	6,6-3500	60
Rubídio (Rb)	4-95	5	3	2	0,06	-
Antimônio (Sb)	-	-	-	2-600	-	-
Escândio (Sc)	0,5-7,0	7-36	1	-	5	-
Selênio (Se)	2-10	0,5-25	0,08-0,1	-	2,4	-
Estanho (Sn)	40-700	3-10	0,5-4,0	1,4-16	3,8	-
Estrôncio (Sr)	40-360	25-500	610	100-5420	80	-
Telúrio (Te)	-	20-23	-	-	0,2	-
Urânio (U)	-	30-300	-	-	-	-
Vanádio (V)	20-400	2-1600	20	-	-	45
Zinco (Zn)	700-49000	50-1450	10-450	1-42	15-250	1,3-25
Zircônio (Zr)	5-90	50	20	6-61	5,5	-

LE = lodo de esgoto, FF = fertilizante fosfatado, FN = fertilizante nitrogenado

Fonte: adaptado a partir de Kabata-Pendias & Pendias (2000)

Tabela 2. Níveis máximos de metais permitidos em água potável

Elemento	Teor Máximo ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Al	200
As	10
Ba	700
Cd	5
Cu	2000
Cr	50
Fe	300
Hg	1
Mn	100
Pb	10
Sb	5
Se	10
Zn	5000

Fonte: adaptado a partir de Kabata-Pendias & Pendias (2000)

2. Toxicidade e bioacumulação de poluentes nos organismos aquáticos

A toxicidade de cada composto químico varia para cada espécie e depende das características de cada substância, tais como a sua disponibilidade para permitir a incorporação biológica e a sua concentração. Entende-se por toxicidade a propriedade inerente de um agente produzir efeitos deletérios (agudos, letais, subletais ou crônicos) sobre um organismo (Goes, 1998; Zagatto & Bertoletti, 2008). Vários são os fatores que interferem na biotransformação e na toxicidade dos poluentes e podem ser divididos em: internos e externos (Zagatto & Bertoletti, 2008). Os internos estão relacionados ao sistema biológico. Assim, influem a espécie, idade, peso, sexo e fatores genéticos, que são fatores constitucionais, e os condicionais, como o estado nutricional, a temperatura corporal e o

estado patológico. Os externos estão relacionados ao poluente, via de introdução e condições ambientais (Zagatto & Bertolletti, 2008).

As exposições múltiplas podem afetar a resposta tóxica a um poluente, numa dada espécie. Organismos normalmente se expõem a uma grande variedade de substâncias através da dieta, ar e água, que podem influenciar a resposta deste a um dado agente químico. Como exemplo, observamos que a exposição excessiva de humanos ao paracetamol pode causar sérios danos ao fígado quando o indivíduo estiver exposto ao álcool ou a barbitúricos (Zagatto & Bertolletti, 2008).

Algumas substâncias químicas apresentam persistência quando introduzidas no ambiente aquático, ou seja, são resistentes à degradação biótica e/ou abiótica. Essa persistência é baseada na sua meia-vida tanto no ambiente físico como nos organismos. Dessa forma, concentrações desses compostos que parecem ser seguras em testes de toxicidade aguda ou crônica, podem se acumular, atingindo níveis elevados nos organismos e causando efeitos tóxicos. Tais efeitos, conhecido como bioacumulação, podem não ser notados até que quantidades significativas do contaminante tenham sido lançadas no ambiente (Zagatto & Bertolletti, 2008).

A assimilação e a retenção de um contaminante por organismos aquáticos podem ocorrer por absorção direta, a partir do ambiente, ou indiretamente, através do alimento contaminado. Conseqüentemente, em uma cadeia alimentar pode ocorrer a biomagnificação, ou seja, os contaminantes podem ser transferidos de um nível trófico a outro (Zagatto & Bertolletti, 2008). Seguindo este raciocínio, Goulet *et al.* (2007) observaram que o microcrustáceo *Daphnia magna* acumulou tanto o cádmio disponível sob a forma de íons dissolvidos em água, como também incorporado ao alimento e que este bioacúmulo foi diretamente proporcional à quantidade de Cd adicionado. Hamilton (2004) constatou que o acúmulo de metais pesados em invertebrados bentônicos dependia do lugar em que estes foram coletados e da fonte de alimento. Petersen *et al.* (2009) verificaram, após exposição de *D. magna* por 48 hs a 0,4 µg/mL de nanotubos de carbono, um bioacúmulo do poluente no intestino deste organismo, mas não observaram deposição em células de outros tecidos.

De uma forma geral, os fatores que determinam se um poluente tem potencial para bioacumulação são: solubilidade, estabilidade, estereoquímica e hidrofobicidade (Zagatto & Bertolletti, 2008).

Geralmente, quanto maior a solubilidade do composto, menor o seu potencial de bioacumulação, pois tanto a assimilação quanto a eliminação são favorecidos. Compostos orgânicos que não se dissociam (neutros ou apolares) são progressivamente insolúveis à medida que sua massa molecular aumenta e, conseqüentemente, são altamente bioacumuláveis (Zagatto & Bertolletti, 2008). Os pesticidas são potencialmente bioacumuláveis por exibirem baixa solubilidade e grande hidrofobicidade (Zalizniak, 2006). Formas ionizadas de metais como mercúrio, cádmio e chumbo, embora solúveis em água, aderem aos tecidos e acabam sendo bioacumulados pelos organismos fitoplanctônicos (Parent & Campbell, 1994; Gensemer & Playle, 1999), planctônicos (Havas, 1985; Penttinen *et al.*, 1995; Gensemer & Playle, 1999; Burjassot, 2002; Hoang & Klaine, 2008) e bentônicos (Gensemer & Playle, 1999).

Para que um poluente possa se bioacumular ele tem que ser estável, conservativo e resistente à degradação. Por serem elementares na natureza, os metais são conservativos, sendo assimilados pelos organismos tanto sob a forma de íons em solução, como sob a forma de complexos organometálicos (Zagatto & Bertolletti, 2008).

Alguns compostos descritos como super-hidrofóbicos (hexabromobenzeno, por exemplo) não são bioacumulados por peixes por causa de sua estereoquímica, ou seja, devido ao seu tamanho e forma das moléculas. Assim, moléculas neutras, com secção transversal superior a 0,95nm, possuem menor capacidade de atravessar as superfícies polares das membranas celulares do epitélio intestinal e branquial dos peixes (Zagatto & Bertolletti, 2008).

A exposição da biota a misturas de contaminantes pode levar a interações toxicológicas resultantes da exposição a dois ou mais contaminantes, causando efeitos sinérgicos, antagônicos, de potenciação ou de adição (Rand *et al.*, 1995).

O sinergismo ocorre quando o efeito combinado de dois ou mais contaminantes é maior do que a soma dos contaminantes individuais aplicados sozinhos. Palaniappan & Karthikeyan (2009) analisaram o acúmulo dos metais cromo e níquel sozinhos ou conjuntamente presentes na água de cultivo do peixe *Cirrhinus mrigala*. Estes autores verificaram um maior acúmulo de metais na mistura binária de cromo e níquel, indicando interações sinérgicas entre os dois metais.

Contrariamente, o antagonismo ocorre quando dois contaminantes, aplicados conjuntamente, interferem um no outro, tendo menor efeito do que quando aplicados individualmente. Esse efeito foi observado por Jonsson (2007) quando testou *in vitro* a atividade da fosfatase ácida da alga *Selenastrum capricornutum* exposta aos metais cobre (Cu^{2+}), que se comportou como ativador da enzima (Jonsson & Aoyama, 2010), e mercúrio (Hg^{2+}), o qual apresentou-se como um potente inibidor da fosfatase (Jonsson & Aoyama, 2009). O pesquisador constatou que o mercúrio apresentou menor capacidade de inibir a atividade da fosfatase ácida na presença do cobre do que quando foi testado individualmente.

Conforme Zagatto & Bertoletti (2008), o fenômeno de potenciação ocorre quando um poluente tem efeito tóxico somente quando é aplicado conjuntamente com outro poluente. Quando o efeito combinado de dois contaminantes é igual à soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados sozinhos, caracterizamos como sendo aditivo. Gikas (2007) constatou um efeito aditivo quando investigou os padrões de crescimento microbiano em lodo ativado na presença de 3 proporções de níquel e cobalto (1:3, 1:1 e 3:1, $\text{Ni}^{2+} : \text{Co}^{2+}$), os quais foram similares aos quantificados quando os metais foram aplicados individualmente.

3. Toxicidade dos agrotóxicos

Os pesticidas abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em três grandes classes: inseticidas, fungicidas e herbicidas. Há ainda os rodenticidas, moluscicidas, e acaricidas. Tais compostos podem ser classificados dentro das várias classes químicas de acordo com sua estrutura química (Tadeo *et al.*, 2000). Dentre essas destacam-se: organoclorados, organofosforados, piretróides, carbamatos, derivados de uréia, triazinas e cloroacetamidas.

Assim como em outros organismos, a intoxicação por pesticidas em organismos aquáticos pode causar vários efeitos subletais, como redução na taxa de proliferação, efeitos teratogênicos, diminuição do peso corporal e desenvolvimento (Rodrigues, 2003). Podem ainda interferir, indiretamente, a partir da redução da quantidade de alimento para espécies pertencentes a um nível trófico superior da cadeia alimentar, ou na eliminação de

importantes espécies predadoras que mantêm o equilíbrio ecológico (Murty,1986 *apud* Jonsson, 2005). Segundo Bhavan & Geraldine (2000), a exposição de organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito baixas de pesticidas, resulta em alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em órgãos vitais.

Muitos trabalhos descrevem alterações bioquímicas e fisiológicas em embriões, larvas e juvenis de crustáceos provocadas por agroquímicos (Galindo-Reyes *et al.*, 1996, 2000, 2002; Lund, 2000; Mello, 2007), que poderiam reduzir o crescimento e a sobrevivência destes animais. Mello *et al.* (2007) avaliou a toxicidade do agroquímico Talcord, pertencente ao grupo químico da permetrina, ao camarão marinho da espécie *Litopenaeus vannamei* e realizou a contagem de hemócitos deste como resultado de alterações fisiológicas causadas pelo poluente. A concentração que provocou a morte de 50% da população de camarões com 96 horas de exposição foi de 9,33 ng/L, mostrando-se altamente letal. Todavia, o autor não verificou alterações significativas na contagem total de hemócitos em relação ao controle, não apresentando, portanto, um efeito subletal relacionado com a redução na contagem total de hemócitos.

Vários estudos estão sendo realizados em torno dos efeitos moduladores de agentes tóxicos sobre os organismos aquáticos. Dentre estes, alguns inseticidas como organofosforados, piretróides e carbamatos, que podem agir sobre o sistema imunológico de peixes (Iwana & Nakanishi, 1996). Porém, o exato mecanismo de ação destes tipos de substâncias sobre o sistema de defesa ainda não está elucidado. No entanto, alguns autores corroboram o fato de que as contaminações por este tipo de substâncias afetam tanto os mecanismos fisiológicos quanto os imunológicos (Iwana & Nakanishi, 1996; Pimpão, 2006).

3.1. Toxicidade do inseticida permetrina para os organismos aquáticos

O agrotóxico permetrina pertence ao grupo dos piretróides, os quais são largamente utilizados tanto na agricultura como nos ambientes industrializados, e atualmente ocupam de 30 a 35% da demanda mundial total de inseticidas. Os piretróides constituem uma formulação sintética produzida a partir das piretrinas, as quais são inseticidas naturais extraídos das flores de *Chrysanthemum cinerariifolium* (Silva, 2005).

A permetrina apresenta moderada a baixa toxicidade e, dependendo de sua formulação, pode ser considerada de classe I ou classe II (muito perigoso para o meio ambiente por ser bioacumulável) pela Agência de Proteção Ambiental (EPA). Sua nomenclatura segundo a IUPAC é 3-fenoxibenzil (*IRS,3RS;IRS,3SR*)-3-{2-diclorovinil)-2,2-dimetilcicloproancarboxilato e sua estrutura química pode ser visualizada na **Figura 1** (Santos *et al.*, 2007). Para um maior detalhamento, algumas de suas características físico-químicas estão resumidas na **Tabela 3**. O modo de ação do inseticida é não sistêmico e age no estômago e por contato, sendo efetivo contra uma ampla variedade de insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (Exttoxnet, 1996).

Apesar de apresentar baixa toxicidade para mamíferos, estudos toxicológicos recentes mostraram que os piretróides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (Viran *et al.*, 2003; Mello, 2007).

Os estudos referentes ao mecanismo de ação tóxica dos inseticidas piretróides não são conclusivos (Larini, 1999). Alguns compostos como a cipermetrina e a permetrina promovem um aumento de cálcio livre na terminação nervosa através da inibição de proteínas responsáveis pelas ligações intracelulares, causando um aumento na liberação dos neurotransmissores (Silva, 2005).

Sabe-se que os ecossistemas aquáticos são particularmente vulneráveis ao impacto da permetrina por existir um balanço frágil entre a qualidade e a quantidade de insetos que são utilizados como alimentos para algumas variedades de peixes e também devido ao elevado potencial de bioacumulação deste inseticida em organismos aquáticos. Conforme Schimmel (1983), os inseticidas piretróides são tóxicos para todas as espécies estuarinas testadas, as quais apresentaram LC50 (96h) menor ou igual a 0,0078 mg/L. Na **Tabela 4** encontram-se alguns resultados de toxicidade para diversos organismos aquáticos.

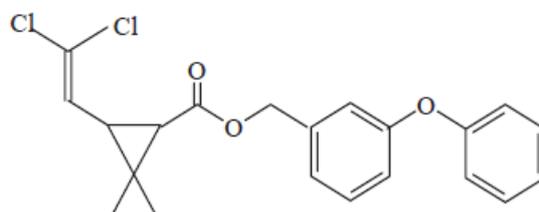


Figura 1. Estrutura química da permetrina (Santos *et al.*, 2007).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas da permetrina

Propriedades	Permetrina
Estado físico	Sólido cristalino incolor ou líquido viscoso de cor amarelo parda
Peso molecular	391,30
Solubilidade em água	0,2 mg/L
Ponto de fusão	34-35 °C
Densidade	1,19 - 1,27g/cm ³
Coeficiente de Partição	6,1004
Coeficiente de Adsorção	100

Fonte: Extoxnet (1996).

Tabela 4. Toxicidade da permetrina para organismos aquáticos

Espécie	Parâmetro analisado	Duração do teste (horas)	Concentração (mg/L)	Referências	
Insecta <i>Chironomus xanthus</i>	LC50	96	0,0004	Silva, 2005	
Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CP	3-72	3,91-39,1	Ganghi, 1988	
Crustacea	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC50	48	0,0001	Silva, 2005
	<i>Daphnia similis</i>	EC50	48	0,0003	Silva, 2005
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	LC50	96	0,00933	Mello, 2007
Peixe	Truta arco-íris	LC50	48	0,0125	Kidd <i>et al.</i> , 1991
	Salmão	LC50	48	0,0018	Kidd <i>et al.</i> , 1991

LC: Concentração letal; EC: Concentração efetiva; CP: Crescimento populacional

4. Toxicidade dos metais

O termo metais pesados é de definição ambígua, mas vem sendo intensamente utilizado na literatura científica como referência a um grupo de elementos químicos amplamente associados à poluição, contaminação e toxicidade. Conceitualmente, metais pesados são definidos como elementos que possuem densidade superior a 5 g/cm^3 ou raio atômico maior que 20. Essa definição é abrangente e inclui alguns ametais ou metalóides, como As e Se. Os principais elementos químicos enquadrados neste conceito são: alumínio, antimônio, arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cobalto, cromo, ferro, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, selênio e zinco (Tsutiya, 2006).

Alguns metais denominados pesados são micronutrientes essenciais aos seres vivos, como Cu, Zn, Mn, Co, Mo e Se, e outros não essenciais (Pb, Cd, Hg, As, Ti e U) são altamente tóxicos mesmo em baixas concentrações encontradas no ambiente. Os metais-traço são essenciais em várias etapas do metabolismo e crescimento de plantas e animais porque participam das reações enzimáticas como cofatores e são constituintes celulares. A necessidade nutricional dos metais essenciais varia conforme a espécie, todavia, geralmente são requeridos em baixas concentrações, acima das quais pode se observar um aumento significativo da mortalidade (Zagatto & Bertolleti, 2008).

Os metais pesados, quando bioacumulados nos organismos aquáticos, podem causar teratogenicidade, redução da fecundidade, prejudicar órgãos vitais, como o fígado e as brânquias, causar mudança de sexo por alteração hormonal e provocar inativação de enzimas (Oliveira, 2007).

4.1. Toxicidade dos íons alumínio, selênio, cádmio e molibdênio em organismos aquáticos

A) Alumínio

O alumínio (Al) é considerado um dos metais mais abundante na natureza, pois está presente em um total de 8,1% da crosta terrestre. Algumas propriedades químicas e físicas desse metal estão resumidas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Algumas propriedades físicas e químicas do Al

Propriedades	Alumínio (Al)
Número atômico (grupo)	13 (13)
Massa atômica relativa	26,9
Estados de oxidação	+3
Ponto de fusão	660 °C
Ponto de ebulição	2.467 °C
Densidade	2,7g/cm ³

Fonte: Tabela periódica on line (2008)

Por um longo tempo, o alumínio foi considerado um elemento atóxico e isto pode explicar seu grande emprego nos processos industriais, tais como na produção de celulose, clarificação de águas industriais, tratamento de águas residuárias e, até mesmo no tratamento terciário de esgotos para remoção de fósforo. Atualmente, o Al pode ser considerado um grande contaminante ambiental devido à ampla exposição em diversos organismos e ambientes (Gensemer & Playle, 1999).

A solubilidade deste metal e sua toxicidade é dependente do pH (Driscoll & Postek 1996; Howells *et al.*, 1990), sendo que em pH próximo da neutralidade (6,0-8,0), é relativamente insolúvel, mas na presença de ligantes e sob condições alcalinas ou ácidas (pH>8 ou pH<6), sua solubilidade e toxicidade se tornam maiores. Este íon metálico pode ser indiretamente mobilizado ou se tornar mais disponível devido à ocorrência das chuvas ácidas. A temperatura do ambiente também influencia na solubilidade do metal: em baixas

temperaturas (2°C) as espécies de Al permanecem sob formas mais tóxicas (Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{+2}$), e o mesmo pode ocorrer nas condições de pH e temperaturas elevados (Gensemer & Playle, 1999).

Sabe-se que os invertebrados aquáticos acumulam Al por todo o corpo, particularmente em superfícies respiratórias ou íon-regulatórias. Havas (1986) utilizou o corante hematoxilina para localizar o Al em organismos aquáticos expostos a 1 mg.L^{-1} de Al por 24 horas (pH 5, $62 \mu\text{M Ca}$). O pesquisador observou que as células dos crustáceos *Branchinecta paludosa*, *Daphnia magna*, and *Holopedium* sp., coradas na presença do Al, localizavam-se no intestino posterior e papila anal, locais onde ocorre a absorção de íons. Os efeitos íon-regulatórios do Al em invertebrados sensíveis ao meio ácido pode ser resultado do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Locke, 1991; Gensemer & Playle, 1999).

A toxicidade do Al aos invertebrados aquáticos tem sido pouco estudada se comparado com os peixes, mas, em geral, os invertebrados são mais resistentes (Ormerod *et al.*, 1987; Sparling & Lowe, 1996; Sparling *et al.*, 1997).

Há vários relatos de que o Al pode alterar a dinâmica do fósforo (P) em ecossistemas de água doce acidificados, causando uma condição limitante do nutriente e levando os organismos fito e zooplânctônicos ao estresse. Este estresse se dá por inibição das funções fisiológicas de aquisição e utilização do P, mais especificamente, por alteração da atividade de fosfatases extracelulares. Alguns autores (Stumm & Morgan, 1981; Nalewajko & Paul, 1985) apoiaram a hipótese de Jansson (1981) de que o Al complexa com o P e impede que este último se ligue ao sítio ativo da fosfatase ácida. Bittl *et al.* (2001), entretanto, comprovaram quantitativamente a hipótese de que o Al age como inibidor competitivo da fosfatase ácida.

Embora os eventos toxicológicos relatados para os compostos de Al sejam bem descritos, poucos estudos têm focado no esclarecimento do seu mecanismo de toxicidade e sua disponibilidade nos sistemas biológicos. O Al é um íon metálico trivalente (Al^{3+}) que pode se ligar fortemente a moléculas doadoras de oxigênio (hidróxidos e ácidos carboxílicos), tais como os ácidos cítrico, láctico, ascórbico, tartárico, succínico, oxálico ou málico (Gensemer & Playle, 1999). Associados ao baixo pH, estes compostos podem aumentar a solubilidade do Al, tornando-o mais disponível para internalização celular. Em

meio neutro, assim como nas amostras biológicas e nos rios, o íon metálico tende a se precipitar e/ou formar complexos polinucleares (Gensemer & Playle, 1999). Além disso, estes íons reagem com sítios ligantes de alta afinidade de proteínas funcionais presentes em fluídos biológicos, como: transferrina, albumina, proteínas de baixo peso molecular, etc. (Domingo *et al.*, 1988; Exley *et al.*, 1996) ou com substâncias vegetais naturalmente encontradas em águas, como: compostos fenólicos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, para formar complexos estáveis (Jekel, 1986; Gjessing *et al.*, 1989; Sauvart *et al.*, 1999).

B) Selênio

O selênio (Se) é um metalóide considerado um micronutriente essencial para a maioria dos animais, porém em concentrações elevadas é considerado tóxico. Algumas propriedades físico-químicas desse metal estão resumidas na **Tabela 6**.

Tabela 6. Algumas propriedades físico-químicas do Se

Propriedades	Selênio (Se)
Número atômico (grupo)	34 (16)
Massa atômica relativa	78,96
Estados de oxidação	-2, 0, (+2), +4, +6
Ponto de fusão	217 °C
Ponto de ebulição	685 °C
Densidade	4,26-4,79 g/cm ³

Fonte: Seixas (2004)

Atividades humanas como a queima de combustíveis fósseis e o escoamento de águas de drenagem dos efluentes industriais e agrícolas podem redistribuir o Se no ambiente, causando bioacumulação e toxicidade aos organismos (Nriagu, McNeal & Balistrieri, Ohlendorf, 1989).

No ambiente aquático, o Se pode existir nas formas inorgânicas (selenito, selenato, selênio elementar, selenetos metálicos) e orgânicas, com ligações diretas Se-C (Kölbl, 1995 *apud* Seixas, 2004). Seu estado oxidável vai depender das condições do ambiente, como pH e atividade biológica (Séby *et al.*, 2001). Cada forma química de Se vai diferir na sua

biodisponibilidade e toxicidade para os organismos aquáticos. Por exemplo, o selenato (Se^{6+}) e o selenito (Se^{4+}) são espécies solúveis típicas de ambientes óxidos, sendo que o selenito é a espécie mais biodisponível e é cerca de 5 a 10 vezes mais tóxica que a anterior (Seixas, 2004).

Vários estudos relatam que a bioacumulação do Se e sua toxicidade ocorrem principalmente pela transferência via cadeia alimentar (Ohlendorf, 1989; Presser, 1994; Hamilton, Skorupa, 1998). Existe uma diferença no metabolismo dos organismos aquáticos entre o Se absorvido diretamente da água e o ingerido via dieta, sendo o último mais tóxico. Hodson & Hilton (1983) propuseram que o Se absorvido diretamente da água pelas brânquias dos peixes circularia através da maioria dos tecidos antes de chegar ao fígado. Já o Se assimilado através da alimentação passaria todo pelo fígado após absorção intestinal e teria ampla acumulação neste órgão, causando maior toxicidade.

Gillespie & Bauman (1986) e Seixas (2004) observaram que o Se tende a se acumular em tecidos que apresentam metabolismo intenso, como gônada (tecido germinativo) e fígado (órgão de detoxificação). Ohlendorf (1995) notou que níveis elevados de Se na água ou dieta podiam resultar em toxicidade aguda, alterações patológicas teciduais, prejudicar a reprodução (incluindo mortalidade de embriões e anormalidades no desenvolvimento dos jovens) e causar toxicidade crônica em animais adultos. Por outro lado, alguns pesquisadores sugerem que o Se pode exercer função protetora contra a ação tóxica do mercúrio, principalmente para os mamíferos marinhos (Palmisano *et al.*, 1995; Dietz *et al.*, 2000). Todavia, certas espécies de organismos marinhos, tais como tubarões, crustáceos e moluscos não apresentaram correlação entre os níveis de Hg e Se (Barghigiani *et al.*, 1991).

O mecanismo pelo qual o excesso de Se pode causar toxicidade nos organismos ainda não está totalmente esclarecido. Lemly (1997) sugere que, devido a sua similaridade com enxofre, o Se em excesso pode substituí-lo durante a síntese das proteínas. Estas trocas afetam as ligações S-S (pontes dissulfeto) que são essenciais para manter a estrutura e função de determinadas proteínas, resultando em sua inativação biológica (estrutural e catalítica).

C) Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal de transição relativamente raro e não ocorre na natureza na forma pura, estando associado a outros elementos como oxigênio (óxido de Cd), cloro (cloreto de Cd), ou enxofre (sulfato ou sulfeto de Cd) (Lima, 2007). As propriedades físico-químicas deste metal estão resumidas na **Tabela 7**.

As fontes antropogênicas de Cd variam desde produtos do extrativismo do zinco, combustão do carbono, fabricação de baterias níquel-cádmio, produção de fertilizantes e pesticidas, fabricação de ligas metálicas com grande resistência e na indústria automobilística em galvanoplastia (Lima, 2007). Compostos contendo Cd são utilizados como componentes fluorescentes em televisores e como amálgama em odontologia.

Na indústria de medicamentos e agroquímicos, o óxido e antranilato de Cd são utilizados como anti-helmínticos em suinocultura e avicultura e o CdCl_2 é usado como fungicida (Melo *et al.*, 2004). Pelo seu uso industrial e medicamentoso, há grande possibilidade do Cd aparecer nos esgotos e efluentes, assim como no lodo resultante do tratamento do esgoto. A aplicação de lodo de esgoto para fertilização do solo agrícola pode levar a um aumento na concentração de Cd total, em função de sua presença no resíduo (Melo *et al.*, 2004).

O Cd é bioacumulado por plantas aquáticas, anfípodos (Casini & Depledge, 1997), ostras (Bou-Olayan *et al.*, 1995), mexilhões (Bellotto, 2000), moluscos (Ferreira *et al.*, 2000), crustáceos (Masutti *et al.*, 2000) e peixes (De Conto Cinier *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1999). O Cd é extremamente persistente no ambiente e, portanto, tende a se acumular ao longo da cadeia trófica (Guan & Wang, 2006). Devido a essas características, a Agência de Registro para Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2007) listou o Cd em sétimo lugar dentre os 275 poluentes prioritários para o monitoramento ambiental. No Brasil, a Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) estabeleceu as concentrações máximas permissíveis para o Cd em corpos de água doces, classificados conforme a qualidade destes, conforme observado na **Tabela 8**.

Sabe-se que o Cd provoca alterações nas atividades enzimáticas dos organismos por ligação aos seus grupos funcionais (sulfidril, carboxil, imidazol, etc.), ou por competição

com vários íons bivalentes (como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}) por sítios de ligação de metais associados à enzima que servem como cofatores (Lionetto *et al.*, 2000; Inácio, 2006). Este metal pode, ainda, ligar-se a nucleotídeos e danificar a fita de DNA. (Wang *et al.*, 1997).

Nos animais aquáticos, Cd é um potente antagonista do cálcio, capaz de prejudicar a assimilação deste último e sua homeostase (Verboost *et al.*, 1988). Este pode entrar nas células através dos canais de cálcio (Ca^{2+}) devido à similaridade química entre ambos. Este mecanismo de ação, entre outros, parece ser baseado na competição com íons Ca^{2+} e alterações de processos Ca-dependentes (Szczerbik, 2006). O Cd também induz estresse oxidativo, resultando em lipoperoxidação de membranas e dano tecidual (Stoys & Bagchi, 1995).

Tabela 7. Algumas propriedades físico-químicas do Cd

Propriedades	Cádmio (Cd)
Número atômico (grupo)	48 (12)
Massa atômica relativa	112,411
Estados de oxidação	+2 (levemente básico), +1 (instável)
Ponto de fusão	321,07 °C
Ponto de ebulição	767 °C
Densidade	8650 mg/mL

Fonte: Tabela periódica on line (2008)

Tabela 8. Valores máximos permitidos do metal Cd nos corpos de água doce

Padrões de Classificação das Águas	Cádmio Total (mg.L^{-1})
Classe 1	0,001
Classe 2	0,001
Classe 3	0,01
Classe 4	-----

Fonte: CONAMA (2005)

D) Molibdênio

O molibdênio (Mo) é um metal de transição pertencente ao grupo 6B da Tabela Periódica, e algumas de suas propriedades físico-químicas estão resumidas na **Tabela 9**. De todos os micronutrientes, o Mo é o menos abundante na crosta terrestre, e este pode ser encontrado principalmente nas valências +4, que corresponde ao mineral MoS₂ (molibdenita), mais comum, e +6, que corresponde aos molibdatos (Krauskopf, 1972).

O molibdênio é o único metal da segunda série de transição cuja essencialidade é reconhecida do ponto de vista biológico; é encontrado em algumas enzimas com diferentes funções, concretamente em oxotransferases (função de transferência de elétrons), como por exemplo a xantina oxidase, e na nitrogenase (função de fixação de nitrogênio molecular) (Krauskopf, 1972).

O Mo em excesso é tóxico, especialmente para animais sob pastejo. O sintoma característico é forte diarreia. O metal também afeta o metabolismo do cobre, pois observa-se que em animais tratados com forragem contendo alto teor de Mo podem apresentar deficiência de cobre, levando à molibdenose (Abreu *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos sobre determinação de molibdênio em ambiente aquático não encontrou acúmulo deste na água, sedimento ou em peixes (Karadede & Ünlü, 2000; Gümüş *et al.*, 1994). Teles *et al.* (2008) dosaram o nível de metais presentes em músculo dorsal de peixes herbívoros e carnívoros e dentre os metais analisados, o Mo não obteve resultado detectável em nenhuma das amostras. A International Molybdenum Association - IMO (2009) estabeleceu os níveis de LC50, EC50 e IC50 para cultivo de peixes, daphnias e algas, respectivamente, para as diversas formas de molibdênio encontradas no ambiente, conforme apresentado na **Tabela 10**.

Tabela 9. Algumas propriedades físico-químicas do Mo

Propriedades	Cádmio (Cd)
Número atômico (grupo)	42 (6)
Massa atômica relativa	95,94
Estados de oxidação	0, +2, +3, +4, +5
Ponto de fusão	2610 °C
Ponto de ebulição	5560 °C
Densidade	10,2 g/cm ³

Fonte: Tabela periódica on line (2008)

Tabela 10. Toxicidade de diversas formas de Mo para peixes, daphnias e algas

Substância	Toxicidade (mg/L)		
	Aguda LC ₅₀ 96h (peixes) ^a	Aguda EC ₅₀ 48h (daphnias) ^b	Crescimento algal IC ₅₀ 72h ^c
Trióxido de Mo (puro)	130	150	100
Trióxido de Mo (impuro) ^d	77	88	100
Dimolibdato de amônio ^e	420	140	41
Molibdato de sódio	7600	330	>100

Fonte: IMOA (2009)

^a O ensaio de toxicidade aguda com peixes representa a toxicidade relativa dos vertebrados aquáticos. Foram utilizadas 10 trutas por concentração, sob condições semi-estáticas, por 96h.

^b O ensaio de toxicidade aguda com daphnia representa a toxicidade relativa dos invertebrados aquáticos. Daphnias (20/concentração) foram expostas a várias concentrações de cada substância, sob condições estáticas, por 48 h.

^c A inibição do crescimento de algas é representativo da toxicidade relativa de plantas aquáticas. Cada forma do Mo foi adicionada em culturas de algas e incubadas por 72 hs. O crescimento foi monitorado pela medida da absorbância de cada cultura a 665nm.

^d A toxicidade aquática de óxido impuro varia conforme o nível de impurezas, principalmente o cobre. Altos níveis de cobre na amostra resultam em baixos valores nos ensaios com peixes e daphnias.

^e A toxicidade do dimolibdato de amônio para algas é esperada ao se considerar a toxicidade da amônia, a qual é comumente utilizada como bactericida e desinfetante.

5. Biologia do gênero *Daphnia*

Daphnia (Filo: Arthropoda, Subfilo: Crustacea, Classe: Branchiopoda, Ordem: Cladocera) são microcrustáceos caracterizados por apresentar segmentação reduzida do corpo, tórax e abdomen fundidos em um tronco, no qual estão inseridos quatro a seis pares de apêndices na porção anterior, os quais funcionam individualmente como brânquias e estruturas filtradoras para captação de alimento. Apresentam carapaça única e dobrada na porção dorsal, dando impressão de estrutura bivalva, a qual encerra todo tronco, mas usualmente não a parte cefálica (Rocha & Güntzel, 1999). O tegumento é composto de quitina e é pouco pigmentado, podendo ser completamente transparente. A cabeça é uma peça compacta, na qual a estrutura mais proeminente é o olho composto, formado por numerosas lentes hialinas circundadas por uma massa de pigmentos granulares. Um ocelo, em geral pequeno, situa-se posteriormente ao olho (Brooks, 1959).

Os dafnídeos são organismos planctônicos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e outras partículas em suspensão. O intestino destes organismos é tubular e composto de 3 partes: esôfago, intestino médio e posterior. Contrações peristálticas da parede do intestino promovem a passagem do alimento e as células epiteliais absorvem as moléculas liberadas da digestão. O restante de alimento é expelido do intestino posterior por movimentos peristálticos e pela pressão de partículas de alimentos recém adquiridas. A coloração de *Daphnia* se adapta ao alimento que é predominante em sua dieta (Ebert, 2005).

Dafnídeos possuem circulação aberta e o coração está localizado dorsalmente e anterior à câmara incubadora de ovos. O sistema nervoso é caracterizado por um gânglio cerebral que se situa próximo do olho. O corpo destes organismos é formado por (ântero-posteriormente): antênulas, antenas, maxilar e mandíbulas, 5 ou 6 membros sobre o tronco utilizados para alimentação e respiração. Abaixo de seu abdômen existe um par de espinhos. O corpo dos cladóceros pode ter de 0,5 a 6,0mm de comprimento. Os machos (**Figura 2B**) diferem-se das fêmeas (**Figura 2A**) por terem menor tamanho, antênulas

maiores, pós-abdômen modificado e os primeiros apêndices parecem estar armados (Ebert, 2005).

O ciclo de vida abrange tanto reprodução assexuada por partenogênese quanto reprodução sexuada. Na reprodução sexuada, a fertilização geralmente ocorre na câmara incubadora e os ovos fertilizados são mantidos dentro da carapaça, em uma estrutura modificada fortemente melanizada, denominada efípio, o qual é liberado durante a muda e pode eclodir induzido por um estímulo externo, tais como fotoperíodo apropriado, aumento de temperatura, ou simplesmente a presença de água quando estão em ambiente seco. Dos efípios surgem somente fêmeas, que geralmente produzem ovos partenogenéticos, mas sob diversas condições podem também produzir efípios (ovos de resistência) (Rocha & Güntzel, 1999; Ebert, 2005). A produção de ovos de resistência segue a assexuada de machos diplóides ($2n$), os quais são necessários para a fertilização dos ovos haplóides (n). Os machos são geralmente produzidos sob condições adversas, tais como superpopulação, baixas temperaturas, redução drástica do nível de água ou escassez de alimento (Brusca & Brusca, 1990). Devido à formação de ovos efípias, os dafinídeos apresentam ampla distribuição geográfica, alguns sendo realmente cosmopolitas (Rocha & Güntzel, 1999).

Os ovos partenogenéticos da fêmea também são armazenados na câmara incubadora e, a 20°C , os embriões eclodem dos ovos após um dia, mas permanecem na câmara até se desenvolverem mais. Os jovens são liberados da mãe por flexão ventral depois de 3 dias, estes são semelhantes à forma adulta, exceto que ainda não possuem câmara formada. Na maioria das espécies, o organismo juvenil passa por 4 a 6 instars (estágio de desenvolvimento de um artrópodo) antes de produzir seus primeiros ovos, ocorrendo por volta de 5-10 dias a 20°C . Entretanto, este período pode se prolongar sob condições de escassez de alimentos. Uma fêmea adulta pode produzir uma ninhada de ovos (até 100) a cada 3 a 4 dias, até a sua morte. Em condições laboratoriais, as fêmeas podem viver até 2 meses e alcançam maior tempo de vida sob alimentação escassa e reproduzindo assexuadamente. O crescimento típico dos dafinídeos produz ovos diplóides ($2n$) que se desenvolvem diretamente sem a fase de resistência, na qual são produzidos os efípios (Ebert, 2005). O ciclo de vida de *Daphnia* está esquematizado na **Figura 3**.

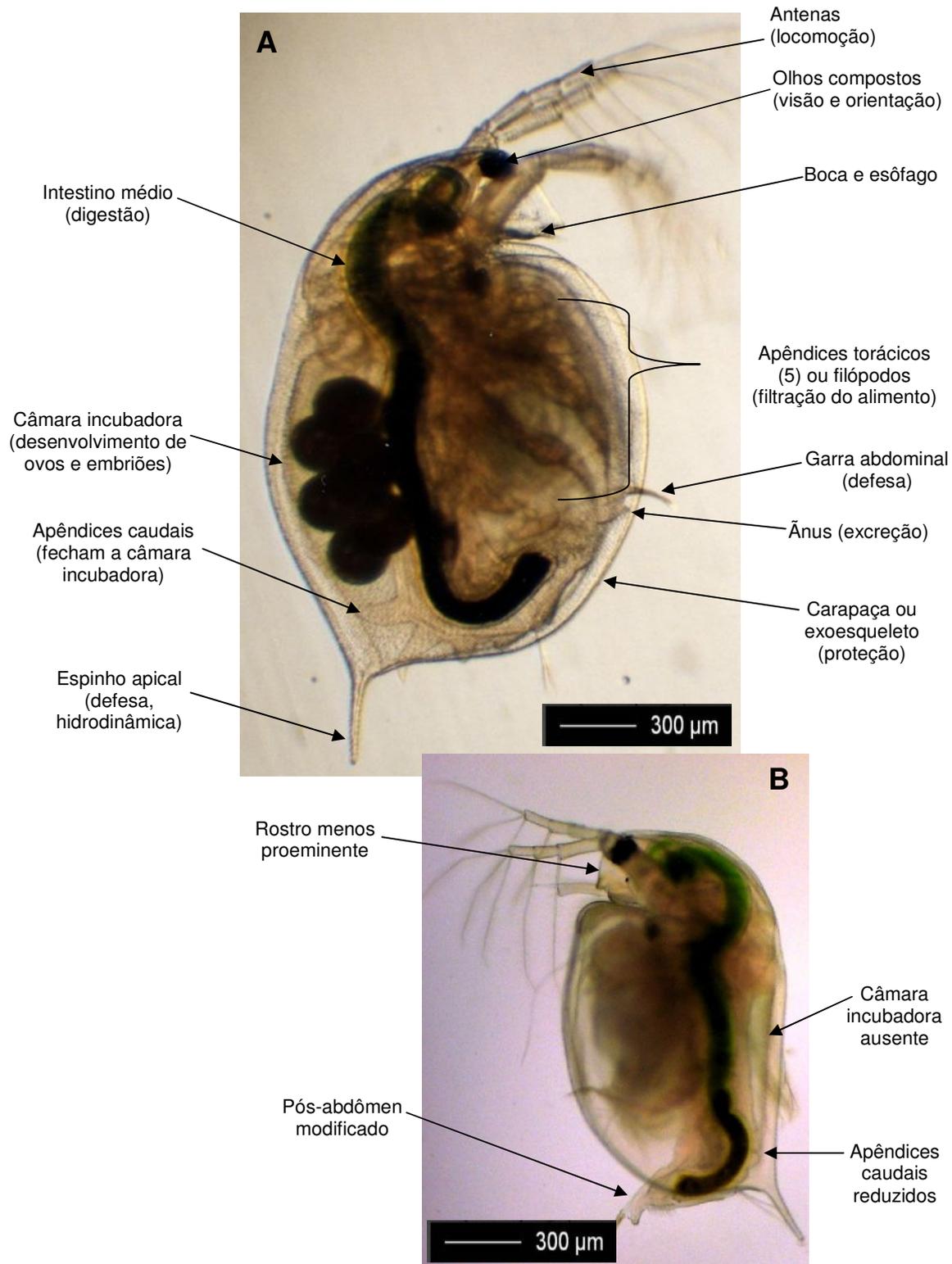


Figura 2. A: *Daphnia magna* fêmea e suas estruturas funcionais. B: *Daphnia magna* macho e algumas estruturas responsáveis pela sua caracterização (Adaptado a partir de Ebert, 2005).

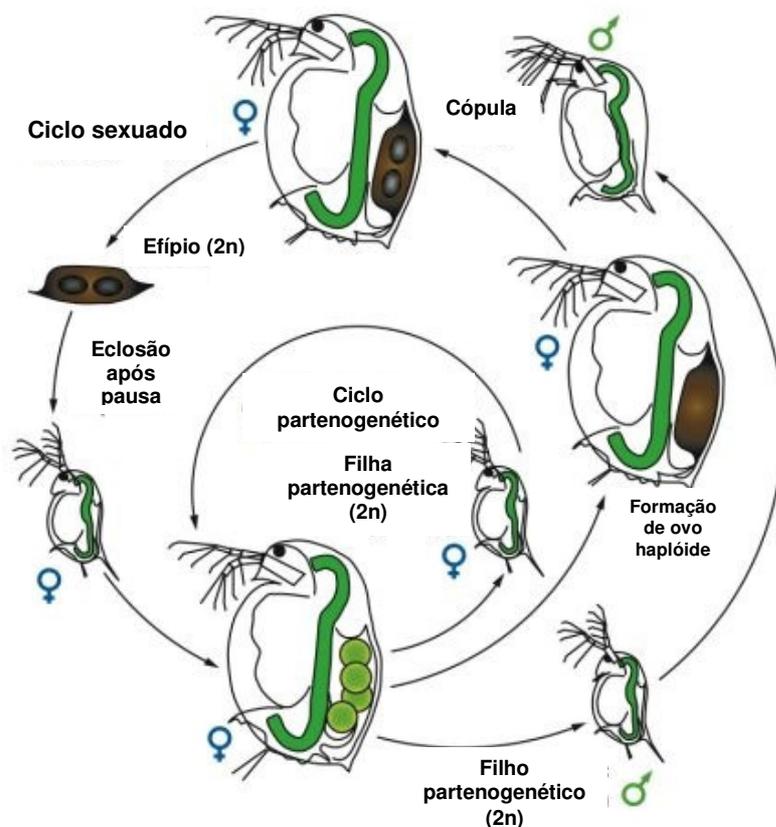


Figura 3. Ciclo de vida do gênero *Daphnia*.

No ciclo partenogenético ou assexuado, a daphnia fêmea produz ovos diplóides que irão desenvolver novas fêmeas (2n). O ciclo sexuado inicia-se sob condições adversas (superpopulação, baixas temperaturas, redução drástica do nível de água ou escassez de alimento), a partir da formação de machos partenogenéticos (2n) e produção de ovo haplóide fortemente melanizado. O macho irá fertilizar o ovo efípio (2n) que somente irá se eclodir quando o ambiente estiver favorável (Adaptado de Ebert, 2005).

5.1. Importância do gênero *Daphnia*

Daphnia sp. são abundantes em água doce, apresentam alta produtividade secundária e representam, juntamente com outros grupos que compõem o zooplâncton, o elo intermediário da cadeia alimentar, através do qual a energia armazenada na matéria orgânica produzida pelos produtores secundários flui para os níveis tróficos superiores, chegando até peixes, aves aquáticas e o homem, entre outros. Seja via herbivoria direta,

seja através do elo microbiano, esses invertebrados são importantes componentes na rede trófica dos sistemas aquáticos de água doce (Rocha & Güntzel, 1999).

Além disso, devido ao fácil cultivo em laboratório, ao curto tempo de desenvolvimento e à alta taxa intrínseca de aumento natural, esses microcrustáceos são largamente empregados como fonte natural de alimento para larvas e alevinos de peixes em aquicultura. Diversas espécies de cladóceros são organismos sensíveis e foram mundialmente padronizados como modelos biológicos nos estudos de ecotoxicologia (OECD, 1984; CETESB, 1994; ABNT, 2004). As espécies *D. magna*, *D. similis* e *C. dubia* são internacionalmente padronizadas. De acordo com a sua sensibilidade aos poluentes ambientais, diversas espécies de *Daphnia* podem ser utilizadas como bioindicadores ecotoxicológicos (Jardim, 2004).

5.2. Uso de *Daphnia* como indicador de toxicidade ambiental

Cladóceros, particularmente do gênero *Daphnia*, têm sido muito utilizados na avaliação toxicológica de diversos tipos de substâncias, incluindo agrotóxicos, efluentes industriais e drogas, além de serem empregados como biomarcadores de qualidade da água (CETESB, 1994; Jonsson & Maia, 1999; Guilhermino *et al.*, 2000a; Yoshimura & Endoh, 2005; Rodriguez, 2006; Heckmann *et al.*, 2007; Damásio *et al.*, 2007).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB do estado de São Paulo tem conduzido testes de toxicidade com *D. similis* para analisar a qualidade da água tratada e controlar efluentes líquidos, sendo que os bioensaios têm sido utilizados como complemento das análises químicas da água (CETESB, 1994). Barros *et al.* (2007) utilizaram *D. magna* como bioindicador da poluição gerada por efluentes de abatedouros de aves e suínos do estado de São Paulo e verificaram que, dentre os efluentes industriais tratados e lançados em corpos d'água de Classes II e III, três efluentes de abatedouros avícolas e dois de suínos apresentaram potencial impactante.

Jonsson & Maia (1999) utilizaram *D. similis* para avaliar a toxicidade dos herbicidas clomazone e quinclorac para os organismos aquáticos na presença e ausência de sedimento. Os autores constataram que, tanto na presença quanto na ausência de sedimento, o clomazone foi mais tóxico que o quinclorac para *D. similis*.

O microcrustáceo *Daphnia* (0,5 a 5 mm de comprimento) está amplamente distribuído em ambientes de água doce, sendo freqüentemente utilizado como indicador de contaminação ambiental. Dessa forma, os efeitos de poluentes sobre a biologia deste organismo podem prever a saúde do ecossistema (Chang, 2003; Jardim, 2004; Lampert, 2006; Barros *et al.*, 2007). Jardim (2004) analisou amostras de água e sedimento coletadas em sete pontos ao longo do rio Corumbataí (SP) quanto à toxicidade aguda e crônica, utilizando organismos indicadores como o cnidário *Hydra attenuata*, os cladóceros *D. magna* e *D. similis*, a alga unicelular *Selenastrum capricornutum* e bulbos de *Allium cepa*. Concluiu em seu estudo que os organismos mais indicados para analisar a toxicidade da água e sedimento foram *D. magna* e *D. similis*, os quais apresentaram boa correspondência com a contaminação por metais.

A *Daphnia* é capaz de se reproduzir por partenogênese cíclica, resultando na produção de animais geneticamente idênticos que minimizam erros analíticos causados por variação genética (Barata, 2000; Wu *et al.*, 2007). Outras vantagens de usar a *Daphnia* como modelo biológico inclui o seu ciclo de vida curto (cerca de 40 dias a 20°C), a facilidade de cultivo e de manutenção e a praticidade para realizar bioensaios devido ao seu tamanho (Khangarot & Rathore, 2003, Wu *et al.*, 2007).

Wu *et al.* (2007) comparou algumas características biológicas relevantes aos testes de ecotoxicidade entre seis espécies de cladóceros, incluindo *D. magna*, *D. carinata*, *D. pulex*, *Ceriodaphnia quadrangular*, *Bosmina longirostris* e *Simocephalus vetulus*. Os resultados obtidos mostraram que *D. carinata* apresentou vantagens sobre as demais espécies, mostrando maior sensibilidade ao tóxico de referência ($K_2Cr_2O_7$) e ciclo de reprodução mais curto que *D. magna*, particularmente para análise ecotoxicológica de ambientes aquáticos de áreas tropicais e subtropicais. Embora a espécie *D. magna* seja recomendada pelos órgãos internacionais para a realização de testes de ecotoxicidade, sua distribuição geográfica se restringe às regiões de alta e média latitudes, e portanto, esta espécie não é ecologicamente relevante para os ambientes aquáticos tropicais e subtropicais.

6. Biomarcadores

Os biomarcadores são atualmente definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (Depledge, 1993 *apud* Zagatto & Bertolletti, 2008). Leonzio & Fossi (1993) ampliaram a definição e propuseram chamar de biomarcadores ecotoxicológicos como as variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações. Zagatto & Bertolletti (2008) propuseram três classes de biomarcadores: de exposição, de efeito e de suscetibilidade.

Os biomarcadores de exposição são os que estimam a dose interna ou biodisponibilidade de um xenobiótico particular, ou de seus metabolitos, em um organismo exposto. Podem envolver desde indicadores de estresse generalizado a indicadores específicos de exposição a um poluente particular. Deve representar uma resposta bem caracterizada que leve em conta a farmacodinâmica e as propriedades físico-químicas do organismo e agente, respectivamente (Zagatto & Bertolletti, 2008). Exemplos bem caracterizados são: indução de metalotioneínas sob exposição a metais (Shaw *et al.*, 2007) e indução do citocromo P-450 1A (CYP1A) monoxidase (sistema enzimático envolvido no processo de biotransformação de contaminantes), sob exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos planares (Zagatto & Bertolletti, 2008).

Os biomarcadores de efeito geralmente não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que pode ser reversível quando o estressor deixar de agir. Caracterizam-se pela indução de mecanismos de defesa celular, os quais se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular-bioquímico. Todavia, se esse mecanismo falhar serão desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas que podem ser irreversíveis. Dessa forma, o organismo pode ter afetada sua capacidade de reprodução ou crescimento. Alguns exemplos desse tipo de biomarcador são: enzimas transaminases indicativas de danos ao tecido hepático (Mayer *et al.*, 1992); enzimas

envolvidas com a peroxidação de lipídeos ou estresse oxidativo (Barata *et al.*, 2005; Jemec *et al.*, 2008).

Biomarcadores de suscetibilidade são definidos como indicadores de processos que causam variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Barret *et al.*, 1997), determinando condições que aumentam a taxa de transição entre esses dois extremos. Os organismos de mesma espécie podem não responder igualmente à exposição aos xenobióticos. Sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento são parâmetros de variação na resposta a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população (Zagatto & Bertolletti, 2008).

De acordo com Zagatto & Bertolletti, para a escolha apropriada do biomarcador utilizado para a detecção e o monitoramento de exposição e efeitos, são sugeridos alguns critérios:

- Facilidade de medida, permitindo a quantificação de múltiplos indivíduos;
- Resposta-dose ou tempo-dependente ao contaminante, de modo a poder determinar a magnitude da exposição ou efeito;
- Significância biológica, ou seja, o biomarcador deve estar relacionado a processos biológicos-chave;
- Capacidade de atuar como indicador geral, respondendo a uma variedade de contaminantes, podendo ser útil como indicador geral de exposição a misturas complexas e para o monitoramento de varredura (*screening*).

6.1. Marcadores bioquímicos

Os testes de toxicidade aquática aguda e crônica, cujo alvo é um organismo específico do ecossistema, apesar de serem muito empregados no monitoramento ecológico, não revelam o poluente responsável pela contaminação e também geram pouca informação sobre seu mecanismo de toxicidade (Chapman, 2000; Hutchinson *et al.*, 2006). Alterações ao nível bioquímico ou molecular são normalmente as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis em uma mudança do meio ambiente. Variações nos sistemas bioquímicos são freqüentemente indicadores mais sensíveis e específicos que os de maiores níveis de organização biológica, tais como células, organismos e populações

(Stegeman *et al.*, 1992). Essas alterações normalmente apresentam um tempo de exposição mais curto que os demais biomarcadores. Por causa destas características, os marcadores bioquímicos são apontados como sistemas de “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental (Payne *et al.*, 1987; Haux & Forlin, 1988; McCarthy & Shugart, 1990; Diamantino *et al.*, 2000).

Os padrões de acumulação de xenobióticos são diferentes para distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e eliminação dos compostos químicos em questão. Portanto, devido às diferenças entre as espécies na metabolização dos xenobióticos, existe a necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos, e não somente analisar a qualidade do ambiente em que eles vivem. Esta necessidade originou o estudo e desenvolvimento de biomarcadores moleculares, bioquímicos ou fisiológicos, capazes de detectar efeitos toxicológicos nos organismos (Bianchini, 2000; Jonsson 2005). A partir do processo de bioacumulação, os poluentes podem se concentrar em diferentes tecidos e promover a indução ou inibição de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais celulares, tais como o das fosfatases (Jonsson, 2005), enzimas de óxido-redução (Vega & Pizarro, 2000; Borgeraas & Hessen, 2002; Barata *et al.*, 2005), acetilcolinesterase (Guilhermino *et al.*, 2000b) e glutathione S-transferase (Jemec *et al.*, 2007). O interesse no uso de biomarcadores bioquímicos para análise de risco ambiental tem aumentando constantemente (Adams, 2002). Allan *et al.* (2006) propôs no European Water Directors (Directive 2000/60/EC, 2000) a utilização destes no monitoramento da qualidade da água para prover uma análise mais precisa do impacto dos contaminantes aos organismos aquáticos.

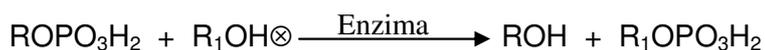
7. Fosfatases: definição e classificação

As fosfatases ou ortofosfato mono éster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que catalisam a desfosforilação de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transfosforilação (Saeed *et al.*, 1990), como esquematizado abaixo:

Hidrólise



Transfosforilação



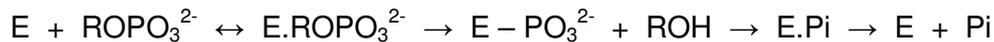
⊗ Aceptor de fosfato

Estas hidrolases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais (Granjeiro *et al.*, 1997, Jonsson, 2005) e vegetais (Ferreira *et al.*, 1998, Granjeiro *et al.*, 1999) e são classificadas em fosfatases ácidas ou fosfatases alcalinas.

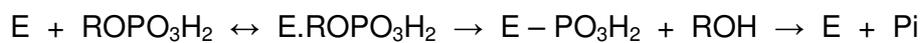
A distinção entre fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas era baseada somente no pH ótimo para a catálise enzimática. Posteriormente, Neuman (1968) observou que as fosfatases alcalinas, além da hidrólise dos substratos usuais, catalisavam também a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosforotióico (RSPO_3Na_2) do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tio-álcool correspondente. As fosfatases ácidas, por sua vez, catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosforotióico do tipo ROPO_2SKH , produzindo álcool e o tiosfato. Este fato permitiu observar mecanismos diferentes de reação para as duas enzimas, uma vez que a fosfatase ácida requer para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato, enquanto que a fosfatase alcalina utiliza um enxofre. Chaimovich & Nome (1970), observaram que as fosfatases ácidas eram insensíveis à adição de cátions mono e bivalentes ao meio de reação, ao contrário das

alcalinas que necessitam de metais para a sua catálise, principalmente o Mg^{2+} . As enzimas podem também ser diferenciadas segundo o mecanismo de catálise:

Fosfatase Alcalina



Fosfatase Ácida



No caso da fosfatase alcalina, em pH acima de 7, o complexo E.Pi limita a velocidade, e a espécie $E-PO_3^{2-}$ contém um grupo fosfoserina considerado lábil em meio alcalino e estável em meio ácido. Todavia, para a fosfatase ácida não foi observado o complexo E.Pi, mas provavelmente o mesmo possa ser um intermediário, uma vez que o Pi atua inibindo competitivamente a reação enzimática (Gonçalves, 2000).

7.1. Importância das fosfatases para organismos aquáticos

A quantidade de fósforo inorgânico (Pi) disponível no ambiente aquático é frequentemente insuficiente para satisfazer as necessidades do plâncton, sendo considerado um fator limitante no crescimento desses organismos. Nesse contexto, as fosfatases possuem um papel crucial no metabolismo desses organismos aquáticos, disponibilizando o Pi a partir da hidrólise de fosfomonoésteres orgânicos. As fosfatases, produzidas por fitoplâncton, zooplâncton ou bactérias, podem ser encontradas dissolvidas na água de lagos e a atividade destas pode ser detectada principalmente em condições limitantes de Pi, sugerindo uma produção adaptativa destas enzimas (Boavida & Heath, 1984; Jansson *et al.*, 1988; Lespilette *et al.*, 2007).

Wynne & Gophen (1981) observaram que *Daphnia magna* liberava tanto a fosfatase ácida quanto a alcalina e que estas atividades diferiam de acordo com a fonte de alimentação. Boavida & Heath (1984) investigaram se as fosfatases liberadas pela *D.*

magna eram produzidas por estas ou se eram provenientes de seu alimento, a alga verde *Chlamydomonas acidophila*. As fosfatases alcalina e ácida de cada organismo diferiram nos valores de constante de Michaelis (Km), grau de inibição por orto-fosfato e comportamento cromatográfico. Os autores concluíram que *D. magna* produz suas próprias fosfatases, sugerindo que estas participam diretamente no mecanismo de regeneração do fósforo que auxilia no crescimento de sua fonte de alimento. Zhao *et al.* (2006) analisaram as propriedades físico-químicas da fosfatase alcalina excretada por *D. magna*. Estes autores observaram que o cladóceros libera uma quantidade maior de fosfatase alcalina que fosfatase ácida. A fosfatase alcalina estudada apresentou um pH ótimo de 8,05 - 10,0, temperatura ótima de 30 - 35°C, Km de $0,15 \pm 0,02$ mM quando pNPP foi utilizado como substrato e Vmax de $0,43 \pm 0,01 \mu\text{M mg}^{-1} \text{DWh}^{-1}$ (peso seco). A enzima foi fortemente inativada por EDTA e pareceu ser zinco dependente.

7.2. Efeito de poluentes sobre as fosfatases de organismos aquáticos

Alguns trabalhos têm observado alterações na atividade de fosfatases em organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar quando foram expostos a agrotóxicos e metais pesados.

No crustáceo *Metapenaeus monóceros*, exposto ao inseticida metilparathion, Reddy & Rao (1990) verificaram *in vivo* um aumento da atividade de fosfatase ácida do hepatopâncreas, enquanto que a atividade da fosfatase alcalina foi reduzida. Esta inibição pode ser atribuída à presença de um resíduo de serina no sítio ativo que seria comprometido na presença de um inseticida organofosforado, similarmente ao fenômeno que ocorre com a acetilcolinesterase (Kumar & Ansari, 1986). As atividades *in vitro* das fosfatases em diferentes tecidos deste crustáceo foram diminuídas em todos os tecidos analisados, em diferentes concentrações do inseticida aldrin (Reddy *et al.*, 1991).

Khangarot & Rathore (2003) observaram redução na atividade das fosfatases ácida e alcalina de *D. magna* exposta ao cobre nas concentrações de 0,05 mg/L e 0,1 mg/L por 48 horas. Jonsson & Aoyama (2007), estudando o efeito *in vitro* de poluentes na atividade de fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, observaram alteração da atividade enzimática ($\geq 50\%$) na presença de LAS (alquil benzenosulfonato linear) e dos

metais pesados Hg^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} , constatando também efeitos aditivos entre Hg^{2+} e Al^{3+} e antagônicos entre Hg^{2+} e LAS (alquil benzenosulfonato linear). Jonsson *et al.* (2009) obteve um mecanismo de inibição não competitivo para o Hg^{2+} e uma inibição competitiva para LAS e *in vivo* mostrou que a atividade específica da fosfatase ácida da alga foi inibida durante 7 dias de tratamento com estes poluentes.

8. Legislação e necessidades de pesquisa

No Brasil, a legislação que regula a emissão e concentração máxima permissível (CMP) de agroquímicos, assim como de outros compostos tóxicos em corpos de água superficiais para a preservação das comunidades aquáticas apresenta-se muito deficitária, pois se observa que a Resolução N° 357 (17 /março/2005) do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), especifica CMP, em diferentes classes de água, para relativamente poucos compostos de uso agrícola, sendo que alguns destes já foram retirados do mercado ou estão aparentemente em desuso. Surge, portanto, a necessidade de se gerar dados que auxiliem no estabelecimento de parâmetros de análise seguros para os vários contaminantes que atingem os corpos d'água. A aplicação de métodos mais sensíveis no monitoramento de áreas ecológicas pode promover vantagem econômica quando comparados à aplicação de protocolos de análise que utilizam reagentes e equipamentos de alto custo e maior tempo de análise, como os testes de toxicidade crônica.

A importância do presente estudo consiste em identificar o grau de eficiência das fosfatases como biomarcadores quanto às respostas aos diversos poluentes, com vistas ao uso no monitoramento de agentes agrotóxicos e metais. Em *D. similis* e outros organismos aquáticos até o momento são escassos os relatos sobre a atividade das fosfatases frente à enorme variedade de agentes com potencial poluente.

II. OBJETIVOS

Desde a década de 90, o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Aoyama tem estudado sistematicamente as fosfatases sobre o âmbito de purificação, caracterização e regulação (Granjeiro *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1998; Granjeiro *et al.*, 1999; Gonçalves, 2000; Cavagis *et al.*, 2004; Cavagis *et al.*, 2006).

Com relação aos organismos aquáticos, foram estudados os efeitos *in vitro* e *in vivo* de diversos poluentes sobre a fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson, 2005; Jonsson & Aoyama, 2007; Jonsson & Aoyama, 2009; Jonsson *et al.*, 2009; Jonsson & Aoyama, 2010).

Dando continuidade a uma das linhas de pesquisa do laboratório, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar os efeitos *in vitro* e *in vivo* de agentes agroquímicos e metais sobre fosfatases ácidas e alcalinas, utilizando-se como modelo biológico o microcrustáceo *D. similis*.

Desta maneira, os objetivos específicos foram:

- Caracterização cinética da fosfatase ácida total (FAT) presente no extrato bruto de *D. similis*.
- Caracterização das atividades de serina-treonina fosfatases e tirosina fosfatases, através da utilização de substratos e inibidores específicos.
- Triagem dos poluentes que alteraram a atividade da fosfatase ácida e/ou fosfatase alcalina *in vitro*.
- Avaliação do tipo de inibição e determinação da constante de inibição da FAT com os agentes que promoveram maior efeito inibitório *in vitro*.
- Análise *in vivo* da atividade da FAT frente aos agentes poluentes anteriormente selecionados nos ensaios *in vitro*, observando os efeitos individuais e conjuntos de tais compostos.
- Análise da possível utilização das fosfatases como marcadores bioquímicos a partir de níveis de exposição derivados de ensaios de toxicidade aguda aos contaminantes selecionados.

III. METODOLOGIA

1. Organismos e condições de cultivo

Como organismo-teste, foi utilizado o microcrustáceo da espécie *Daphnia similis* (**Figura 4A**), conhecido popularmente como pulga d'água. Originalmente, o cultivo do microcrustáceo foi transferido do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente para o Laboratório de Enzimologia do Depto. de Bioquímica da Unicamp.

D. similis é cultivada, baseando-se na norma da OECD (1984), em água reconstituída (**Anexo 1**) ou de torneira decolorizada e mantida em estufa de germinação (Eletrolab) na temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ (**Figura 4B**), com intensidade luminosa de 1000 lux e fotoperíodo 16-8hs (claro/escuro) e diariamente alimentada com suspensão de algas clorofíceas unicelulares das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* (**Figura 4C**), preparada conforme **Anexo 2**, e *Chlorella pyrenoidosa* (**Figura 4D**). Esta última foi manipulada na concentração de 500mg na forma de cápsulas. Para o preparo da suspensão algácea de *C. pyrenoidosa*, o conteúdo de uma cápsula foi dissolvido em 500mL de água destilada, podendo ser utilizado para alimentação das daphnias por uma semana.

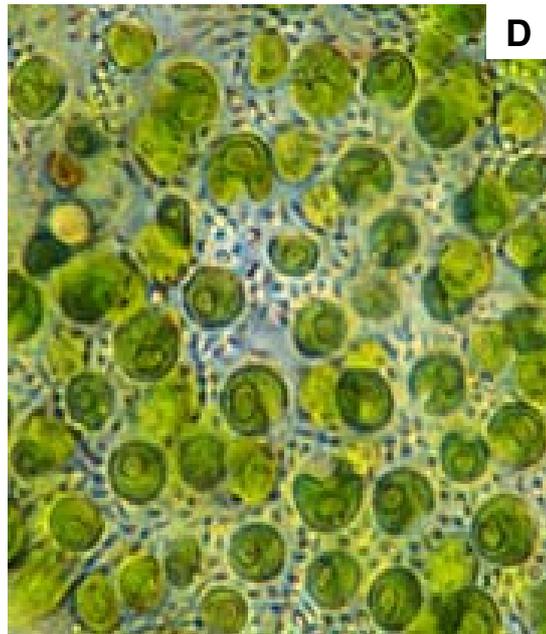
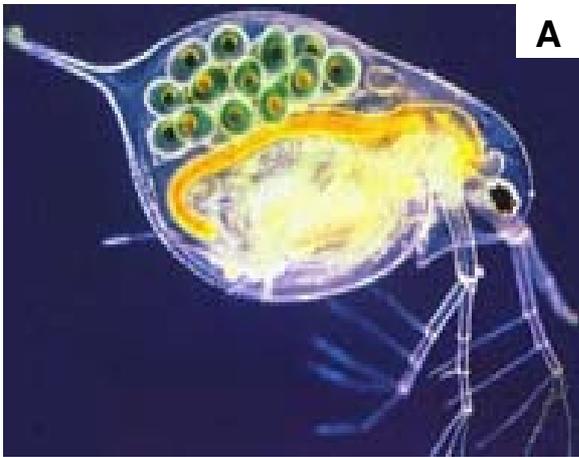


Figura 4. Organismos e condições de cultivo. A: Microcrustáceo *Daphnia similis*, IPEN (2006). B: Interior da estufa de germinação. C: Alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (aumento: 100x). D: Alga *Chlorella pyrenoidosa* (aumento 100x).

2. Preparo do extrato

O extrato contendo fosfatases de *Daphnias* foi preparado coletando-se aproximadamente 70 organismos adultos não alimentados por um período de 6 horas para evitar interferência de seu alimento durante as dosagens, com auxílio de peneira Granutest (0,5 mm, ABNT 35), correspondente a cerca de 100 mg de peso úmido. Posteriormente, os microcrustáceos foram macerados em tampão acetato de sódio 1 M, pH 5,0 (1:4, m:v) com homogeneizador tipo Potter. Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante constituiu o extrato límpido a ser utilizado nas dosagens bioquímicas.

3. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada por dois métodos, dependendo do substrato utilizado:

3.1. Dosagem do p-nitrofenol (pNP)

A atividade das fosfatases foi determinada medindo-se o p-nitrofenol (pNP) liberado, quando se utiliza p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato, de acordo com o método descrito por Jonsson & Aoyama (2007). Foram realizadas as seguintes dosagens:

a) Fosfatase ácida total (FAT):

Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da amostra a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0) e 10 mM de p-nitrofenil fosfato (pNPP). Após incubação por 40 min, a 37°C, a paralisação da reação foi feita pela adição de 1,0 mL de NaOH 1 M. A absorbância foi mensurada a 405 nm (coeficiente de extinção molar de $1,83 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto e a atividade específica (AE) é expressa como UE por miligrama de proteína.

b) Fosfatase alcalina:

Para dosagem da fosfatase alcalina, foi utilizado o mesmo protocolo para FAT, com algumas exceções: o tampão utilizado foi glicina 250 mM (pH 9,4) e foi adicionado $MgCl_2$ 20mM, como cofator.

3.2. Dosagem do fosfato

A reação procedeu-se como descrito em 3.1a, exceto pela substituição do p-nitrofenilfosfato por outro substrato e a paralisação da mesma, que foi feita pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão 0,2 M, pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molíbico foi adquirida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0) como redutor, conforme o método descrito por Lowry & Lopez (1945). Após 30 min, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 700 nm. O coeficiente de extinção molar do complexo reduzido é de $4.000 M^{-1}cm^{-1}$.

4. Determinação de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

5. Estudos cinéticos da fosfatase ácida total (FAT) presente no extrato bruto

5.1. Estabilidade da FAT de *D. similis* durante o armazenamento a baixas temperaturas

Verificou-se a estabilidade da FAT sob diferentes condições de estocagem, freezer (-20°C), geladeira (5°C) e biofreezer (-70°C). A atividade da enzima foi monitorada a cada 20 dias para os extratos armazenados em freezer e geladeira durante um período de 60 dias.

Realizou-se também uma análise comparativa da atividade enzimática específica entre os grupos abaixo especificados:

- a) Extrato bruto armazenado a -70°C .
- b) 100mg de daphnias congeladas com nitrogênio e armazenadas a -20°C .
- c) 100mg de daphnias congeladas com nitrogênio e armazenadas a -70°C .

A atividade específica da FAT de todos os grupos foi determinada após 2 semanas, sendo que para o grupo de daphnias armazenadas em biofreezer, realizou-se uma segunda dosagem após 1 mês de estocagem. A AE determinada da FAT do extrato fresco, dosado no mesmo dia em que foi preparado, foi considerada como 100%. Todos os extratos foram preparados conforme item 2 descrito em Materiais e Métodos.

5.2. Efeito do pH na atividade da FAT de *D. similis*

A atividade enzimática do extrato foi avaliada em uma faixa de pH de 3,1-10,0, utilizando-se 0,1 M dos tampões citrato (pH 3,1), acetato (pH 5,0), HEPES (pH 6,2), imidazol (pH 7,3) e glicina (pHs 8,6; 9,4; 10,0), na presença ou ausência de MgCl_2 (20mM).

5.3. Determinação das constantes cinéticas da FAT de *D. similis*

A determinação da atividade da FAT foi realizada variando-se a concentração do substrato pNPP (0,05-20 mM), conforme descrito no item 3.1.a. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados pelo gráfico de duplos-recíprocos (Lineweaver & Burk, 1934). A constante de especificidade (V_{max}/K_m) foi obtida pela razão entre os parâmetros acima.

A energia de ativação (E_a) foi determinada através do gráfico de Arrhenius, logaritmo da velocidade em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$). A velocidade da reação enzimática, utilizando-se 10 mM de pNPP, foi determinada em cinco temperaturas diferentes. A E_a (Kcal.mol^{-1}) foi calculada através da inclinação da reta obtida por regressão linear simples, sendo o valor da constante real dos gases R igual a $1,987 \text{ cal.grau}^{-1} \text{ .mol}^{-1}$ (Prista *et al.*, 1979).

6. Caracterização das atividades de serina-treonina fosfatases e tirosina fosfatases do extrato bruto

6.1. Especificidade por substratos das fosfatases de *D. similis*

Substratos sintéticos e não-sintéticos (naturais) foram adicionados ao sistema de reação na concentração final de 10 mM. A atividade enzimática foi determinada pela liberação de Pi, conforme descrito em 3.2.

6.2. Efeito de inibidores na atividade das fosfatases de *D. similis*

A atividade da fosfatase ácida e alcalina foi avaliada, de acordo com protocolo descrito em 3.1 (a e b), na ausência e na presença de potenciais inibidores: tartarato e fluoreto, nas concentrações de 10, 100 e 200mM, o-vanadato (10 mM) e p-hidroximercuribenzoato (pHMB) nas concentrações de 0,1 mM e 1mM.

Embora em *D. similis* não exista a classificação de fosfatases ácidas de baixa, intermediária e alta massa molecular relativa como nos vertebrados superiores, foram testadas atividades enzimáticas, dosando-se a liberação de pNP como anteriormente descrito no subitem 3.1a, em presença de inibidores específicos para cada uma das classes de fosfatases mencionadas. Para isso foram realizados os seguintes experimentos:

a) Fosfatase ácida de baixa massa molecular (FAB):

Foi adicionado ao sistema de reação tartarato (100 mM) e fluoreto (10 mM), inibidores das fosfatases ácidas de alta e intermediária massa molecular, respectivamente. A atividade residual observada foi devido à fosfatase ácida do tipo baixa massa molecular relativa.

b) Fosfatase ácida intermediária ou tartarato-resistente (FATR):

Adicionou-se ao sistema de reação tartarato (100 mM) e pHMB (1mM), respectivos inibidores das fosfatases ácidas de alta e baixa massa molecular. A atividade residual foi atribuída à fosfatase ácida de massa molecular intermediária, também denominada fosfatase ácida tartarato-resistente (FATR).

7. Avaliação do efeito *in vitro* de poluentes na atividade das fosfatases de *D. similis*

7.1. Agentes químicos

Soluções estoque de 29 compostos orgânicos, potencialmente bioacumuláveis em organismos aquáticos, foram preparadas em acetona (Merck®), dissolvendo 10mg do poluente em 10mL do solvente. A concentração da solução estoque e a solubilidade dos compostos orgânicos podem ser visualizados em **Apêndice 1**. Foram utilizados agrotóxicos do grupo dos organosfosforados (acefato, azinfós etil, clorpirifós, dimetoato, fenamifós, metamidofós, tricolorfon), organoclorados (alacoloro, aldrina, BHC-hexaclorobenzeno, clorotalonil, clorexidina, dieldrina, diflubenzuron, dimetomorfe, endrina, endosulfan, procloraz, tetradifon), carbamatos (aldicarbe, benomil), triazinas (atrazina, simazina), piretróides (deltametrina, permetrina,), amida (trifluralina), diurético (diuron), neonicotinoide (tiametoxan) e quinona (ditianona). Informações sobre alguns dos compostos orgânicos analisados são encontrados em **Anexo 3**.

Foram analisados metais poluentes de corpos hídricos, efluentes e lodo de esgoto quanto à capacidade de alterar a atividade da FAT e de causar toxicidade aos organismos aquáticos. As soluções dos metais sob a forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , CdCl_2 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7$ foram preparadas em água Milli-Q. Todos os agentes químicos testados como poluentes foram de grau P.A. ou cromatográfico.

No presente trabalho, a fosfatase alcalina de *D. similis* foi exposta a 27 poluentes de origem agrícola, e a fosfatase ácida, a 37 agentes potencialmente tóxicos. A razão para

o número de compostos analisados serem diferentes entre as fosfatases reside no fato de que o meio alcalino exigido para a reação da fosfatase alcalina mostrou-se incompatível com a solubilidade de alguns compostos orgânicos. Todos os poluentes foram testados em condições de pré-incubação para se avaliar os efeitos *in vitro* sobre as fosfatases de *D. similis*. De acordo com Jonsson (2005), a razão para o uso desta condição é que em um sistema pré-incubado a enzima é submetida a uma condição mais severa de interação com o agente químico, sem a presença de compostos, como por exemplo, o substrato, que possa proteger a enzima, pela formação de um complexo enzima-substrato.

7.2. Avaliação comparativa do efeito *in vitro* de poluentes na atividade das fosfatases ácida e alcalina de *D. similis*

A atividade enzimática no extrato bruto foi determinada pré-incubando-se a enzima (20 min / 37°C) na presença de cada poluente na concentração máxima de 2 mM (suficiente para alterar a atividade da enzima) ou na concentração máxima do poluente na forma solúvel no sistema de reação, ou ainda, numa concentração apropriada que não promovia interferência no método de dosagem da enzima. A concentração testada para cada poluente pode ser visualizada em **Apêndice 1**. Alíquotas de soluções estoque dos poluentes em acetona foram submetidas a uma leve corrente de N₂ até a evaporação completa do solvente. De modo a se obter a solubilidade máxima dos compostos, foi usado 75 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) como adjuvante de solubilização obtendo-se uma concentração final de 7,5%, pois estudos prévios demonstraram que atividade da enzima praticamente não foi afetada por esta concentração de DMSO (**Apêndice 2**).

Alíquotas apropriadas dos metais solúveis em água foram adicionadas ao sistema de reação na ausência de DMSO. As amostras foram analisadas juntamente com um controle (sem poluente), na ausência ou presença de 7,5% de DMSO. A atividade foi determinada pela produção de pNP, conforme descrito anteriormente em 3.1, na presença de 10 mM do substrato.

7.3. Determinação da IC50 e constantes de inibição (Ki) dos íons alumínio, selênio e molibdênio na FAT

Os íons metálicos Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} foram selecionados para determinação da constante e tipo de inibição da FAT porque foram os compostos que promoveram maior atividade inibitória ($\geq 50\%$) da enzima em estudo. Assim sendo, a concentração de inibição média (IC50) e seu intervalo de confiança 95% foram calculados pelo ajuste dos dados das curvas de regressão obtidos pela determinação da atividade enzimática em função de diferentes concentrações de cada poluente inibidor.

Para a determinação da K_i , a atividade foi avaliada numa faixa de concentração de pNPP de 0,1-20,0 mM, na ausência ou na presença de três concentrações dos poluentes. A K_i para a inibição competitiva foi calculada a partir do gráfico de inclinação das retas obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk em função da concentração de inibidor. Para a não competitiva, o valor de K_i foi determinado a partir do gráfico de Dixon (Dixon & Webb, 1979), o qual plota os valores das intersecções ($1/V$), obtidas do gráfico de Lineweaver-Burk, para cada concentração de inibidor.

7.4. Efeito do cádmio sobre a energia de ativação da FAT

Como o cádmio foi o poluente que promoveu maior ativação ($>50\%$) da FAT, este foi utilizado para determinar sua influência sobre a energia de ativação (E_a) da enzima, conforme descrito anteriormente em 5.3, em amostras contendo a FAT na ausência e na presença de 0,5 mM de Cd^{2+} .

8. Estudos *in vivo*

8.1. Ensaaios de toxicidade aguda com *D. similis*

O teste de toxicidade aguda com *D. similis* foi realizado com base no protocolo da OECD (1984) e ABNT (2005). O método consistiu na exposição de 20 indivíduos jovens de *D. similis* a cada concentração dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} e permetrina (anteriormente selecionados por causarem alteração significativa na fosfatase ácida), por um período de 48 horas, em incubadora a 22°C e sem alimentação. No controle foi utilizado somente o meio de cultivo e para o teste ser aceitável, a sobrevivência neste foi de 90% no mínimo. Os indivíduos móveis foram contados como sobreviventes (visualmente a olho nu). Os teores de oxigênio dissolvido (OD), pH e dureza total foram registrados no meio de diluição antes e após o experimento. Tal procedimento permitiu obter a EC50 (Concentração Média Efetiva), a qual se refere à concentração do poluente que mata ou imobiliza 50% dos organismos expostos por um tempo específico. Duas concentrações subletais abaixo da EC50 foram usadas neste estudo: a EC1 (concentração do poluente que imobiliza apenas 1% do total de organismos) e o FT (Fator de Toxicidade – menor diluição da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre os organismos).

Simultaneamente ao ensaio com os poluentes especificados foi realizado um teste de sensibilidade do organismo-teste, avaliado através da EC50 (48hs) ao poluente de referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), sendo a faixa aceitável de 0,04 a 0,17 mg/L para *D. similis*.

8.2. Efeito da ação conjunta dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} e Mo^{6+} sobre *D. similis*

Levando-se em consideração que os organismos estão expostos a misturas de contaminantes no meio ambiente e que estas podem ocasionar interações toxicológicas e acarretar uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente da esperada pela ação dos contaminantes sozinhos, foram realizados testes de toxicidade aguda 48hs, conforme

descrito no item 8.1, com a mistura dos íons metálicos $Al^{3+} + Cd^{2+}$, $Al^{3+} + Se^{4+}$, $Al^{3+} + Mo^{6+}$, $Cd^{2+} + Se^{4+}$, $Cd^{2+} + Mo^{6+}$, $Se^{4+} + Mo^{6+}$, com o intuito de caracterizar possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos. Com a intenção de facilitar os experimentos, simplificar o estudo da ação conjunta de poluentes e a caracterização desses efeitos levou-se em consideração somente a análise da mistura binária dos metais anteriormente selecionados, excluindo, portanto, o inseticida orgânico permetrina por se tratar de um poluente estruturalmente mais complexo.

Para avaliar a interação entre as substâncias foi utilizado o modelo descrito por Marking (1985) devido a sua simplicidade. Esse modelo expressa a soma da atividade de diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA), os quais são descritos a seguir:

Soma da aditividade das substâncias

$$S = (A_m / A_i) + (B_m / B_i)$$

Em que:

S = a soma da aditividade, sendo que através desta é possível determinar o efeito conjunto da mistura;

A_m = concentração da substância A na mistura que causa 50% de efeito (EC50);

B_m = concentração da substância B na mistura que causa 50% de efeito;

A_i = concentração da substância A que, isolada, provoca 50% de efeito;

B_i = concentração da substância B que, isolada, provoca 50% de efeito;

Portanto, através de S foi possível determinar o efeito interativo dos íons metálicos, caracterizado por:

$S > 1$, o efeito da mistura é menos que aditivo;

$S = 1$, o efeito é aditivo;

$S < 1$, o efeito é mais que aditivo.

O Índice da Aditividade (IA) indica quantas vezes a toxicidade da mistura é maior ou menor que a soma da toxicidade das substâncias testadas individualmente. Assim, o IA da mistura de substâncias foi considerado como:

Se S for > 1 , então $IA = S - 1 + 1/S$

Se S for < 1 , então $IA = 1/S - 1$

8.3. Efeito *in vivo* dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} e permetrina na atividade da FAT de *D. similis*

D. similis (n=40) foram expostas por 48 horas a EC50, EC1 e ao FT de cada poluente ou de cada mistura de poluentes, sendo o controle não tratado, para posteriormente seguir com a extração e dosagem da FAT, conforme descrito nos itens 2 e 3.1, respectivamente.

9. Análise dos resultados

Todos os resultados foram expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística com o software GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA), utilizando-se de testes de variância (ANOVA) e o teste de Dunnet para comparações de médias em relação ao controle (Zarr, 1996). Valores de *p* iguais ou menores que 0,05, indicadores do nível de significância de pelo menos 5% entre as diferenças encontradas, foram considerados estatisticamente significativos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudos cinéticos da FAT presente no extrato bruto

1.1. Estabilidade da FAT de *D. similis* durante o armazenamento a baixas temperaturas

Podemos observar na **Figura 5** que, após um período de 20 dias, o extrato armazenado a -20°C , ainda possuía 76% de atividade fosfatásica, enquanto o mantido a 5°C já havia perdido 37% de atividade enzimática original. As fosfatases ácidas dos extratos armazenados a -20°C e 5°C perderam 36% e 40% de sua atividade, respectivamente, após 60 dias, quando comparadas com a atividade do extrato dosada no início do estudo. A atividade específica da FAT do extrato bruto armazenado a -70°C foi pouco alterada após 2 semanas, mantendo 80% de atividade (**Figura 6**).

Outra forma de analisarmos a estabilidade da FAT durante o armazenamento foi a partir do congelamento do organismo íntegro a -20°C ou a -70°C . Observamos uma redução de 40% na AE da FAT extraída de *D. similis* armazenadas a -20°C durante 2 semanas, enquanto a atividade específica da FAT extraída de *D. similis* estocadas a -70°C manteve-se estável durante o mesmo período, e se reduziu a cerca de metade de sua atividade após 1 mês (**Figura 6**). Os resultados do presente estudo mostraram que a atividade da fosfatase ácida se manteve estável em biofreezer (-70°C), a partir do armazenamento do organismo íntegro por 2 semanas, sendo portanto utilizado esse método de armazenagem com o intuito de se ter material biológico suficiente para os experimentos *in vitro*. A atividade da enzima em estudo apresentou discreta alteração quando dosada no extrato bruto armazenado sob as mesmas condições (-70°C).

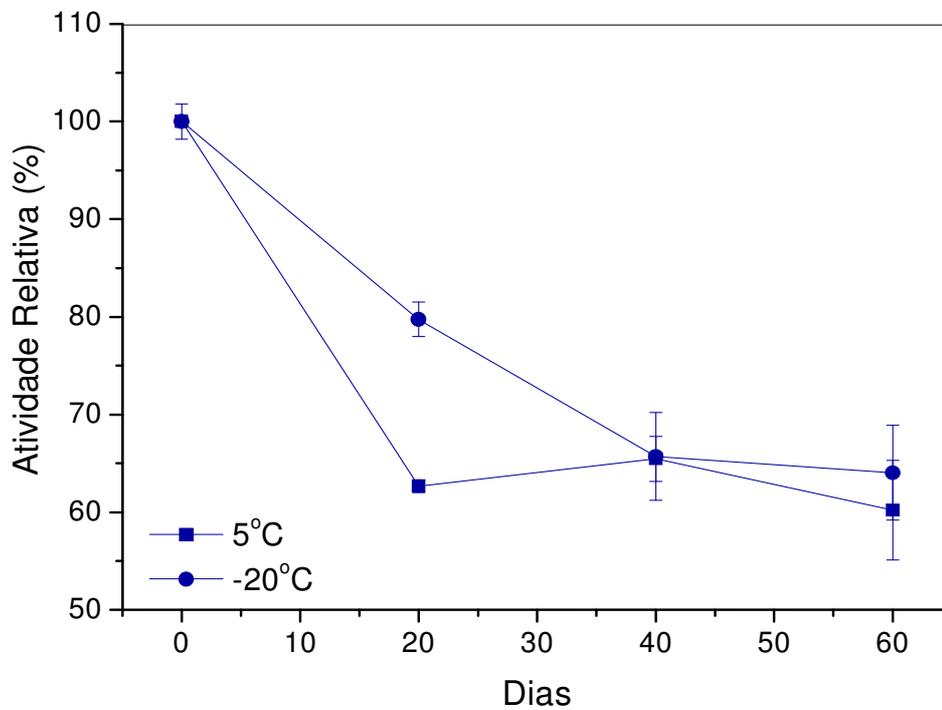


Figura 5. Estabilidade da FAT de *D. similis*.

Alíquotas dos extratos foram analisadas periodicamente durante o armazenamento a -20°C e 5°C, através das medidas das atividades enzimáticas remanescentes, utilizando-se pNPP como substrato. A atividade medida no início do estudo (tempo zero) foi considerada como 100%. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

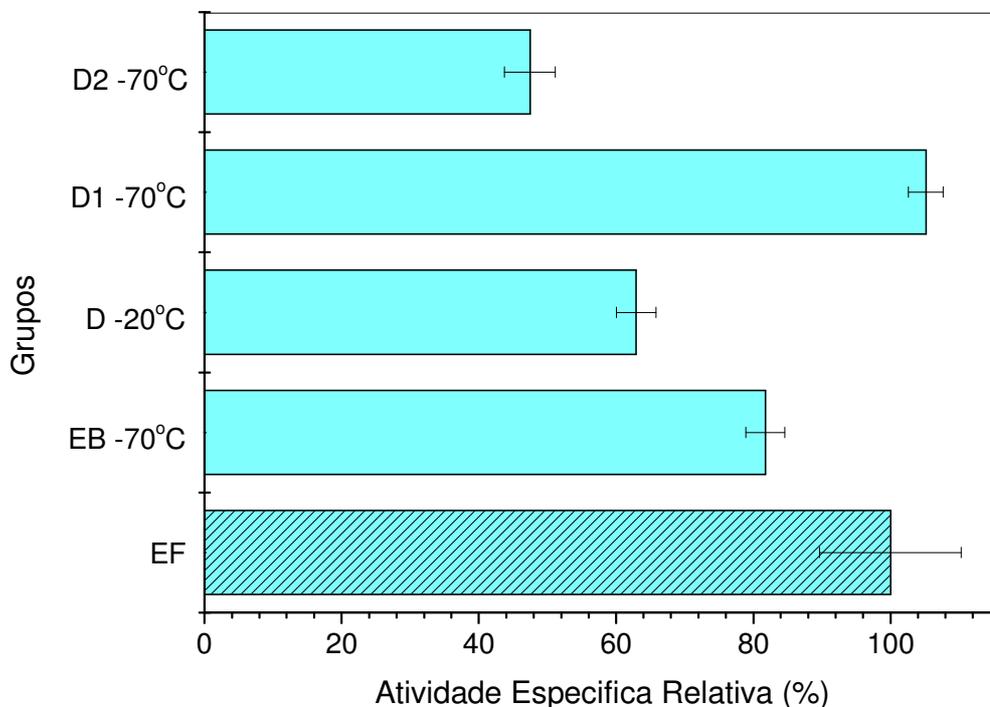


Figura 6. Análise comparativa da atividade específica da FAT de *D. similis* sob diferentes condições de estocagem.

A atividade específica da FAT, descrita em Métodos, foi determinada para os grupos EB -70°C, D -20°C e D1 -70°C, após o período de 2 semanas, e para o grupo D2 -70°C, após o período de 1 mês, utilizando-se pNPP como substrato. A AE da fosfatase ácida do grupo EF (controle) foi considerada como 100%, e os valores dos demais grupos, como porcentagens deste valor. Grupos: EF. Extrato fresco, EB -70°C. Extrato bruto armazenado a -70°C por 2 semanas, D -20°C. *D. similis* armazenadas a -20°C por 2 semanas, D1 -70°C. *D. similis* armazenadas a -70°C por 2 semanas, D2 -70°C. *D. similis* armazenadas a -70°C por 1 mês. Todos os extratos foram preparados conforme item 2, descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

A maioria dos trabalhos envolvendo a atividade das fosfatases ácidas em crustáceos é realizada imediatamente após extração enzimática e geralmente a reação ocorre na temperatura ambiente, 20-25°C, (Gambin *et al.*, 1999; Bittl *et al.*, 2001; Jean *et al.*, 2003; Lespilette *et al.*, 2007) ou a 37°C (Boavida, 1984; Blom & Jüttner, 2005). Um dos poucos estudos referente à estabilidade de fosfatases desses organismos foi desenvolvido por Zhao *et al.* (2006), no qual se investigou a estabilidade da fosfatase alcalina liberada de *Daphnia magna* em meio contendo clorofórmio. Após 13 dias, a atividade enzimática ainda possuía 54% da atividade original. Em estudos anteriormente realizados em nosso laboratório, com fosfatase ácida extraída da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson, 2005), a estabilidade da enzima foi mantida durante aproximadamente 6 meses quando armazenada a -20°C e teve considerável redução quando estocada a 5°C.

1.2. Efeito do pH na atividade da FAT de *D. similis*

A enzima demonstrou atividade numa ampla faixa de pH (3,0-7,0) e apresentou pH ótimo de 5,0 (**Figura 7A**). Considerando-se como 100% a atividade no pH ótimo, nos valores de pH 3,1 e 7,3 a enzima ainda manteve cerca de 60 e 67% de sua atividade, respectivamente. Provavelmente, o aumento da atividade em pH 8,6 foi devido à interferência da fosfatase alcalina que também se encontra no extrato bruto e demonstrou atividade sem adição de seu cofator magnésio, sugerindo que este íon esteja presente no extrato e seja oriundo do próprio organismo. A curva de pH na presença de magnésio (**Figura 7B**) comportou-se semelhantemente à anterior, apresentando dois picos de atividade em pH 5,0 e em pH 9,5, sendo o primeiro correspondente ao pH ótimo da fosfatase ácida e o segundo, da fosfatase alcalina.

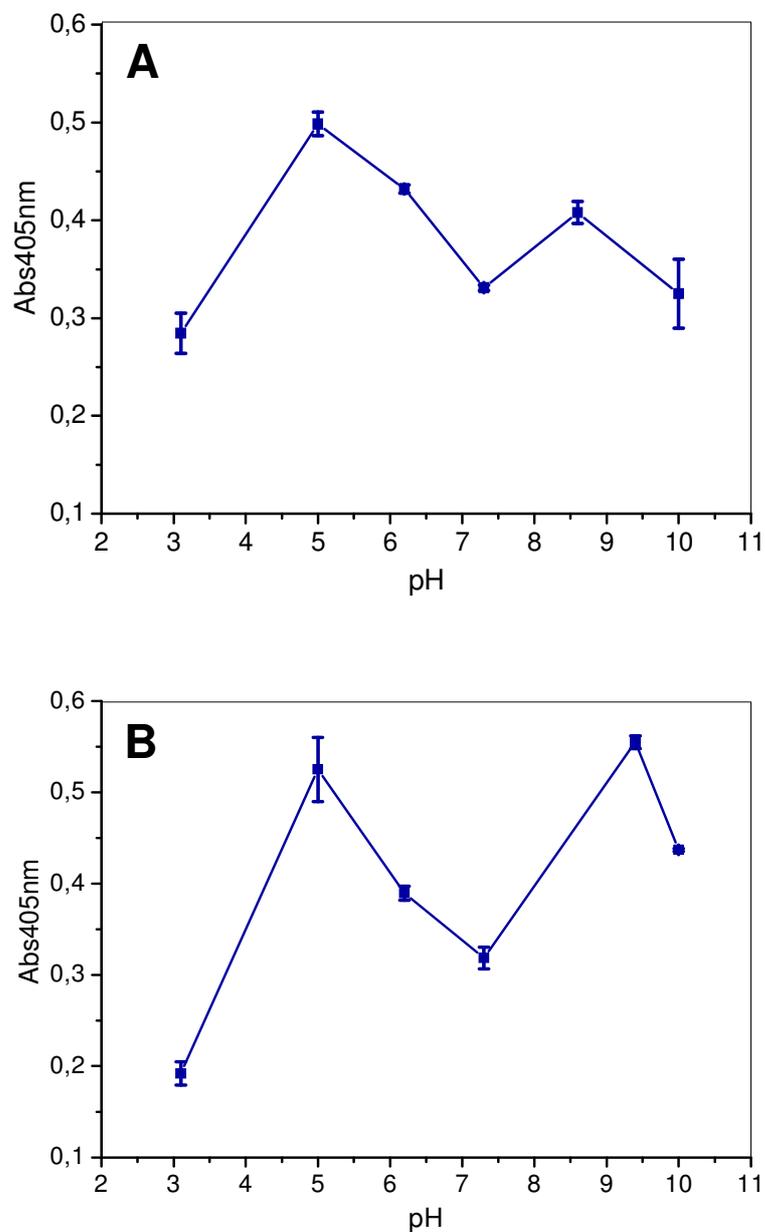


Figura 7. Atividade das fosfatases de *D. similis* em função do pH.

A atividade das fosfatases foi determinada como descrito em Métodos, utilizando-se pNPP como substrato, na ausência (A) ou presença de $MgCl_2$ 20mM (B), adicionando-se os seguintes tampões na concentração final de 0,1 M: citrato (pH 3,1), acetato (pH 5,0), HEPES (pH 6,2), imidazol (pH 7,3), glicina (nos valores de pH 8,6; 9,4 e 10,0). Os resultados estão expressos como média \pm dp de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

Os 2 picos de atividade enzimática máxima na presença de magnésio, ocorrido em nossos resultados, evidencia a presença de fosfatase ácida e fosfatase alcalina. Valores de pH semelhantes aos encontrados em nosso trabalho foram obtidos para as fosfatases de outras espécies de microcrustáceos, como náuplios cirripédios (Lespilette *et al.*, 2007) e para a fração de microplâncton (>90 μ m) coletada em litoral mediterrâneo (Gambin *et al.*, 1999). Em lagos acidificados, Bittl *et al.* (2001) observaram que as fosfatases extracelulares oriundas do plâncton tiveram atividade máxima em torno de pH 5,0 (fosfatases ácidas) e um discreto aumento em pH 9,0, atribuído às fosfatases alcalinas.

Em contraste com os resultados do presente estudo, Zhao *et al.* (2006) não obtiveram um pH ótimo para a fosfatase alcalina liberada de *Daphnia magna*, a qual atingiu atividade máxima na faixa de pH 8,6-10,0.

1.3. Determinação das constantes cinéticas da FAT de *D. similis*

Quando a atividade da enzima foi medida em várias concentrações de pNPP, o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk gerou uma reta (**Figura 8**) que permitiu calcular os valores de Km e Vmax (\pm desvio padrão), equivalentes a $0,38 \pm 0,11$ mM e $0,35 \cdot 10^{-3} \pm 0,09$ μ mol. min⁻¹, respectivamente (**Tabela 11**).

A energia de ativação (Ea) foi determinada a partir da inclinação da reta obtida no gráfico de Arrhenius (**Figura 9**), através da variação de temperatura de 24 – 56 °C. A Ea (\pm desvio padrão) calculada foi equivalente a $14,84 \pm 7,4$ Kcal.mol⁻¹ (**Tabela 11**).

Tabela 11. Parâmetros cinéticos da FAT de *D. similis*.

PARÂMETRO	VALOR
Km (mM)	$0,38 \pm 0,11$
Vmax (μ mol.min ⁻¹)	$0,35 \cdot 10^{-3} \pm 0,09$
Vmax/Km (U.mM ⁻¹)	$0,94 \cdot 10^{-3} \pm 0,17$
Ea (Kcal.mol ⁻¹)	$14,84 \pm 7,4$

Os valores de Km e Vmax foram obtidos do gráfico de Lineweaver-Burk e o de energia de ativação, através do gráfico de Arrhenius, como descrito em Métodos, utilizando-se pNPP como substrato.

A constante de Michaelis (K_m) é um importante parâmetro para a caracterização enzimática, indicando a quantidade de substrato que a enzima necessita para se saturar (V_{max}) e sua afinidade pelo mesmo. A atividade da fosfatase ácida de *D. similis* obedeceu ao modelo cinético de Michaelis-Menten (**Figura 8B**) e o valor de K_m (0,38 mM) foi semelhante ao obtido para a fosfatase ácida purificada de *D. magna*, que correspondeu a 0,45 mM (Boavida & Heath, 1984).

De maneira geral, o valor da K_m em nossos resultados foi da mesma ordem de grandeza quando comparado aos demais valores de K_m descritos para fosfatases de organismos planctônicos: 0,15 mM para a fosfatase alcalina liberada de *D. magna* (Zhao, 2006); 0,27 mM para a fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson, 2005); 0,29 mM para fosfatase ácida de *Euglena gracilis* (Bennun & Blum, 1966); 0,5 mM para a enzima da alga *O. danica* (Patni & Aaronson, 1974); 0,19 mM para a enzima extraída da alga verde unicelular *C. reinhardtii* (Lien & Knutsen, 1973); 0,7-0,9mM para a fosfatase obtida de frações de micro, nano e picoplâncton (Gambin *et al.*, 1999); 0,15-0,42mM para a enzima de zooplâncton coletado em diferentes sistemas de água doce (Heath, 1986).

A constante de especificidade (V_{max}/K_m) determinada para a fosfatase ácida de *D. similis* ($0,94 \text{ mU}\cdot\text{mM}^{-1}$) foi duas ordens de grandeza menor que a obtida para a fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson, 2005), cujo valor foi de $137,78 \text{ (mU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1})$. Os valores de K_m e de V_{max}/K_m determinados para a fosfatase ácida de *D. similis* mostram que a enzima deste minicrustáceo possui uma menor afinidade pelo pNPP quando comparado com a afinidade da alga. O mesmo comportamento pode ser observado para fosfatases de cladóceros, onde Lespillete *et al.* (2007) encontrou valores de K_m abaixo de 0,02 mM.

Com relação aos valores de energia de ativação, o obtido para a fosfatase ácida de *D. similis* ($14,84 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) foi consistente com os determinados para fosfatases de fitoplâncton, correspondendo a $9 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a enzima de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Jonsson, 2005), $10,7 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para as fosfatases da alga clorofícea *C. reinhardtii* (Lien & Knutsen, 1973) e também para enzimas de outros organismos, como para a fosfatase alcalina do fungo micorrízico *Cenococcum graniforme*, $9,9 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Kwang & Larry, 1989).

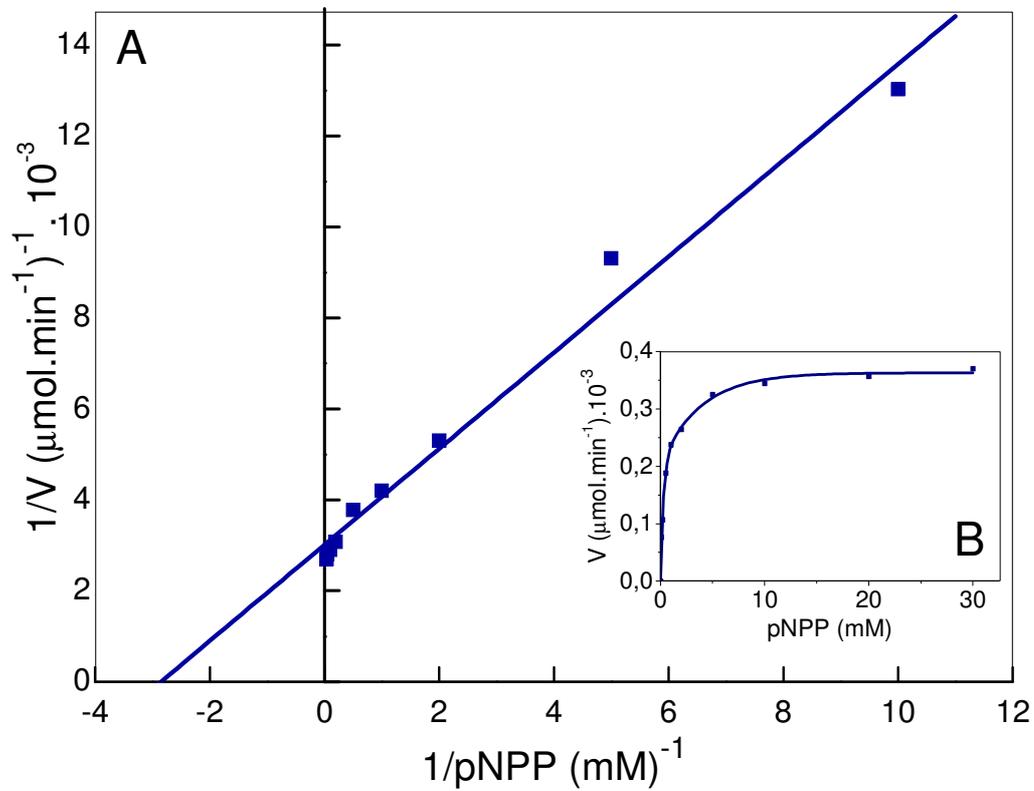


Figura 8. Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação de K_m e V_{max} da fosfatase ácida de *D. similis*.

A velocidade (V) foi calculada pela produção de pNP em amostras incubadas durante 40 minutos a 37 °C. B: gráfico de Michaelis-Menten.

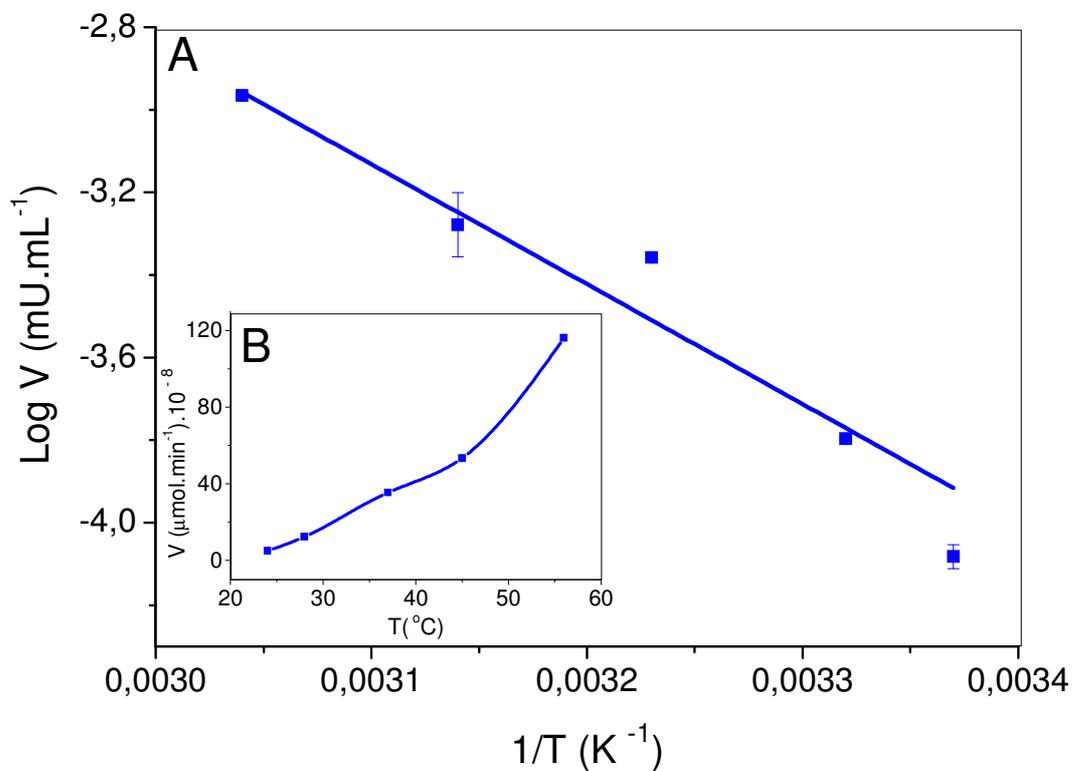


Figura 9. Gráfico de Arrhenius na determinação energia de ativação (E_a) da fosfatase ácida de *D. similis*.

A velocidade inicial (V) foi calculada pela produção de pNP em amostras incubadas durante 40 minutos em diferentes temperaturas. B: gráfico de velocidade da FAT *versus* temperatura.

2. Caracterização das atividades de serina-treonina fosfatases e tirosina fosfatases do extrato bruto

2.1. Especificidade por substratos das fosfatases de *D. similis*

As fosfatases apresentaram capacidade de hidrolisar eficientemente uma ampla variedade de substratos e tiveram comportamentos semelhantes quanto à especificidade pelos mesmos, reagindo preferencialmente com frutose 1,6-bisfosfato, serina-fosfato e pirofosfato (**Figuras 10 e 11**). A atividade da fosfatase alcalina e da FAT perante o substrato pirofosfato foi de 2,3 vezes (**Figura 10**) e 4,3 vezes (**Figura 11**) maior do que na presença do pNPP, respectivamente. A atividade da fosfatase alcalina aumentou cinco vezes na presença de frutose-1,6-bisfosfato (**Figura 10**), em relação ao pNPP, enquanto que a fosfatase ácida apresentou um acréscimo de 3,5 vezes em sua atividade na presença do mesmo açúcar (**Figura 11**). Esses resultados sugerem que o pirofosfato e a frutose-1,6-bisfosfato podem ser potenciais substratos fisiológicos das fosfatases em estudo. Por outro lado, a α -D-glicose-1P mostrou baixa taxa de hidrólise, de 20% para a fosfatase alcalina e 10% para a fosfatase ácida, em relação ao pNPP. A flavina monofosfato foi o único substrato que as enzimas de *D. similis* não foram capazes de hidrolisar.

As enzimas foram capazes de hidrolisar tanto os substratos sintéticos (pNPP, β -naftil-fosfato) quanto os naturais (açúcares e aminoácidos fosforilados), mostrando uma baixa especificidade. A fosfatase ácida da alga *P. subcapitata* (Jonsson, 2005) apresentou perfil semelhante às enzimas em estudo quanto à capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de substratos, entretanto, diferiu quanto ao padrão de especificidade pelos mesmos substratos. Contrastando com os resultados do presente estudo, a fosfatase da alga mostrou elevada taxa de hidrólise de flavina mononucleotídeo (FMN), superior a 100% em relação ao controle (pNPP). Eficientes taxas de hidrólise de FMN foram também observadas para fosfatases ácidas de *Chlamydomonas reinhardtii* (Matagne *et al.*, 1976) e de rim bovino (Granjeiro *et al.*, 1997). Por outro lado, em analogia aos resultados obtidos neste trabalho, a fosfatase de *P. subcapitata* hidrolisou em grande proporção frutose-1,6-

bifosfato, semelhantemente à fosfatase alcalina extraída da alga *Scenedesmus quadricauda* (Chawla *et al.*, 1987).

A alta atividade das fosfatases de *D. similis* para o pirofosfato (PPi) não foi atribuída à presença de pirofosfatases por 3 razões: a presença de cátion, normalmente o Mg^{2+} , é necessária para a reação catalisada pelas pirofosfatases; as mesmas costumam ser bastante específicas e normalmente não são inibidas pelo fluoreto (Ferreira, 1995). Embora a fosfatase alcalina em estudo também necessite de íons Mg^{2+} para que a reação ocorra, esta foi inibida pelo fluoreto (conforme discutido no item 2.2). Além do mais, o pirofosfato também foi eficientemente hidrolisado pela fosfatase ácida, a qual não requer a presença do cofator Mg^{2+} . Portanto, as fosfatases de *D. similis* não são pirofosfatases devido às características acima mencionadas. Comportamento semelhante quanto à eficiência em hidrolisar PPi também foi observado em fosfatases da alga *Euglena gracilis* (Bennum & Blum, 1966), da planta aquática *Spirodela oligorrhiza* (Nakazato *et al.*, 1997), em enzima do fígado de cação (Gonçalves, 2000), em fosfatases extraídas de sementes de soja (Ferreira, 1995) e na fosfatase ácida do fungo *Penicillium implicatum* (Nakagi, 2007). Este último autor constatou, a partir do estudo cinético da hidrólise do pNPP e do PPi, isoladamente ou presentes simultaneamente no meio de reação, pela fosfatase ácida extracelular, que a hidrólise destes ésteres de fosfato ocorreu através de uma única classe de sítios de fixação do substrato à enzima. Essa interpretação foi baseada no fato que o produto liberado pela hidrólise dos substratos não foi aditiva e localizou-se entre as velocidades obtidas para cada substrato isoladamente.

Em relação aos aminoácidos fosforilados, podemos observar nas **Figuras 10 e 11**, que embora a tirosina-P tenha sido hidrolisada a uma taxa superior a 100%, indicando a presença de tirosina-fosfatases no extrato bruto, a serina-P apresentou uma taxa de hidrólise em torno de três vezes maior que o aminoácido tirosina, sugerindo a predominância de serina-treonina fosfatases ou a presença de proteína tirosina fosfatases com especificidade dual no extrato. No genoma de *Daphnia pulex* foi verificado tanto a existência de fosfatases com especificidade dual quanto a de serina-treonina fosfatases (WFLEABASE, 2007).

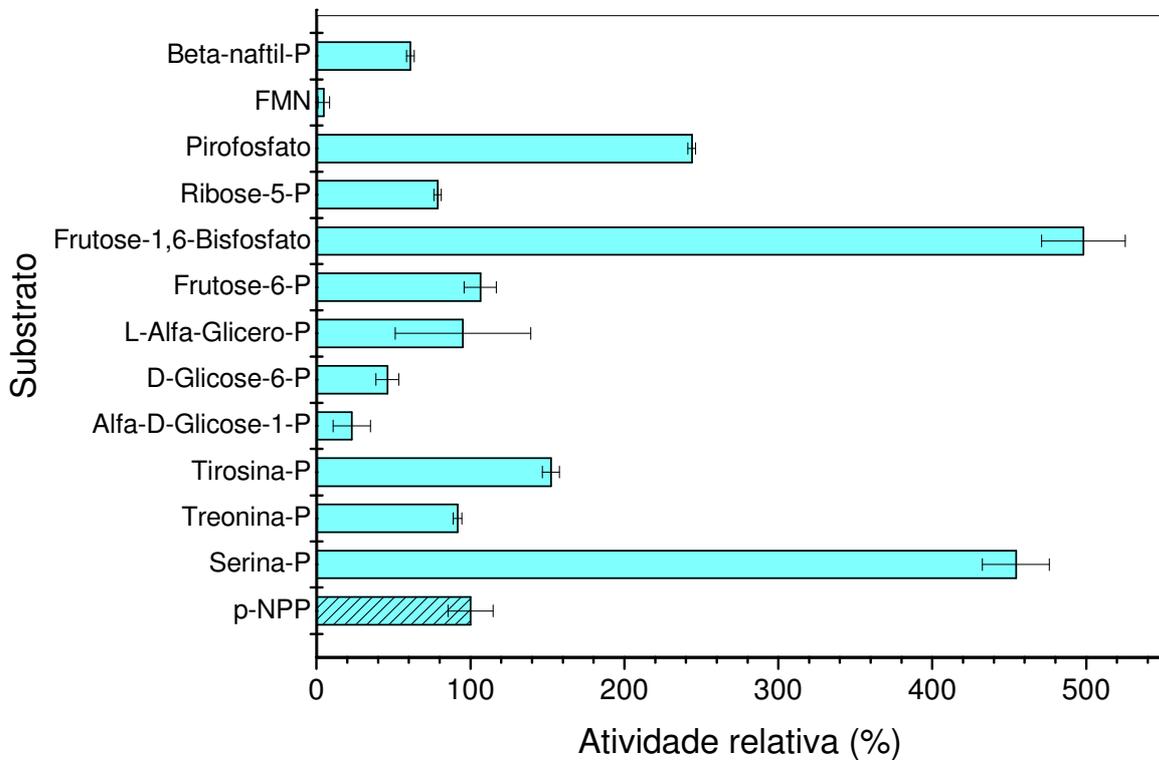


Figura 10. Especificidade para substratos da fosfatase alcalina de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, utilizando-se cada um dos substratos indicados, na concentração final de 10mM, e medindo-se a liberação de Pi. A hidrólise do pNPP (10 mM) foi considerada como 100% e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

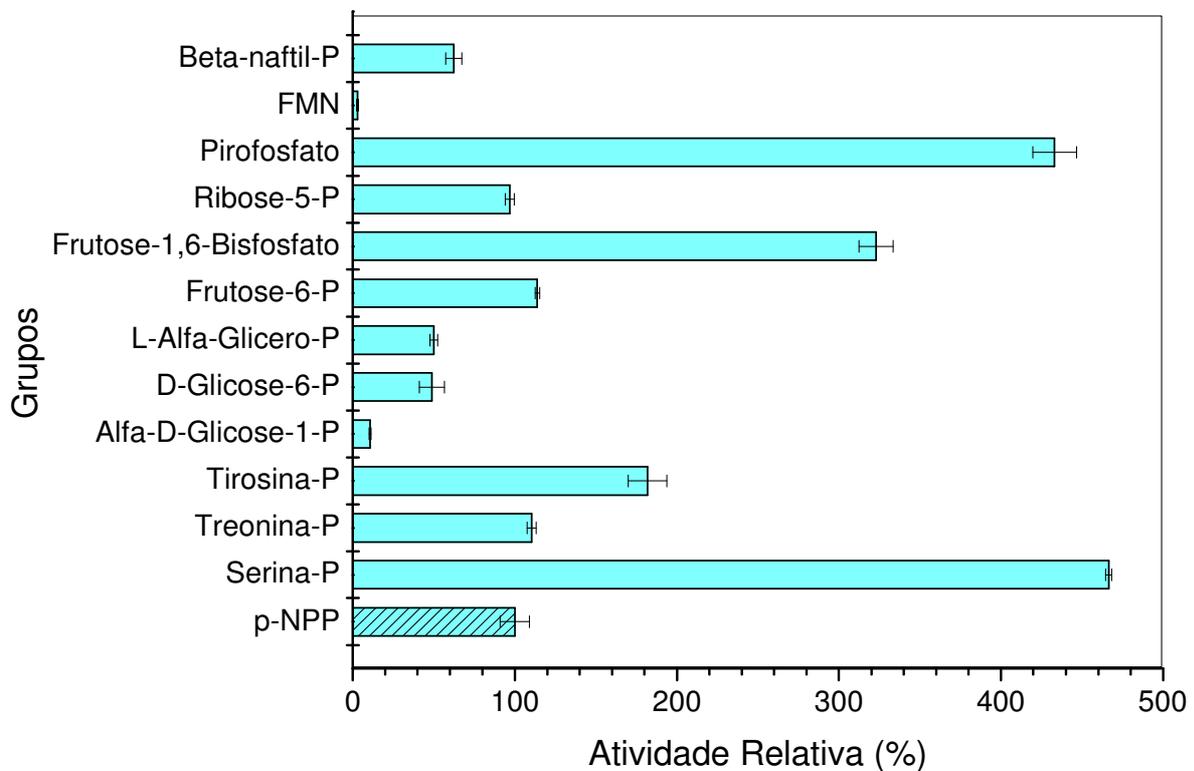


Figura 11. Especificidade para substratos da fosfatase ácida de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, utilizando-se cada um dos substratos indicados, na concentração final de 10mM, e medindo-se a liberação de Pi. A hidrólise do pNPP (10 mM) foi considerada como 100% e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

Verificou-se, portanto, que as fosfatases extraídas de *D. similis* foram eficientes em hidrolisar todos os 3 aminoácidos fosforilados testados, porém apresentou maior especificidade para serina-fosfato. Essa característica mostrou-se incomum dentre a maioria das fosfatases de plâncton testadas, as quais apresentaram grande especificidade para tirosina-P, enquanto a serina-P foi pouco hidrolisada (Jonsson, 2005; Bennum & Blum, 1966).

2.2. Efeito de inibidores na atividade das fosfatases de *D. similis*

As fosfatases extraídas de *D. similis* mostraram-se relativamente insensíveis aos inibidores testados, apresentando redução de atividade somente a partir de altas concentrações dos compostos, embora a fosfatase ácida tenha se apresentado mais sensível a ação de potenciais inibidores (**Figura 13**) do que a fosfatase alcalina (**Figura 12**).

A fosfatase alcalina foi relativamente pouco inibida pelo tartarato e pHMB, apresentando apenas 20% de redução de sua atividade em relação ao controle, além de não se observar acréscimo de efeito inibitório com o aumento da concentração destes inibidores. O fluoreto em altas concentrações mostrou uma considerável inibição da fosfatase alcalina, 42% de redução da atividade enzimática a 100 mM e 53% a 200 mM. O inibidor mais efetivo para a fosfatase alcalina foi o o-vanadato, o qual, no entanto, adicionado em concentração relativamente alta (10 mM) inibiu somente 62%. Para a fosfatase ácida, o tartarato inibiu em torno de 60% nas concentrações de 100 mM e 200 mM (**Figura 13**). O pHMB a 1mM exibiu uma discreta inibição de 23% e os inibidores mais efetivos foram o fluoreto 200mM e o o-vanadato 10mM, os quais inibiram 70%. Esses resultados sugerem uma predominância de isoformas de alta massa molecular relativa (AMr) e a existência de tirosina-fosfatases no extrato de *D. similis*.

O estudo de inibição é uma ferramenta útil para se determinar o tipo predominante de fosfatase presente em um extrato celular (Mackintosh & Mackintosh, 1994; Freire, 2002). A partir do uso concomitante dos inibidores tartarato e pHMB observou-se uma atividade residual de aproximadamente 30% atribuída às fosfatases ácidas de massa molecular relativa (Mr) intermediária (20–100 kDa). O ensaio com tartarato e fluoreto permitiu detectar

uma atividade residual por volta de 35%, atribuída às fosfatases de baixa massa molecular relativa (BMr, <20 kDa). Considerando os valores de atividade residual obtidos para as fosfatases ácidas de baixa e intermediária Mr, observou-se que a fosfatase ácida de AMr obteve uma atividade residual em torno de 35% (**Figura 13**).

Todavia, levando-se em consideração de que, em microcrustáceos, não existe esta classificação de fosfatases ácidas de baixa, intermediária e alta Mr, como nos vertebrados superiores, enfatizamos que a inibição das fosfatases de *D. similis* pelo fluoreto e, em menor grau, pelo tartarato, em comparação com o reduzido efeito inibitório exibido pelo pHMB, foi condizente com a predominância de isoformas de AMr. Jonsson (2005) constatou uma alta inibição da fosfatase ácida de *P. subcapitata* pelo fluoreto, e parcial pelo p-cloromercuribenzoato (p-CMB), que o autor atribuiu à predominância de isoformas de alta Mr no extrato. Verjee (1969) observou que as isoenzimas de fosfatase ácida de gérmen de trigo foram inibidas pelo fluoreto e tartarato e mostraram-se insensíveis ao pCMB.

Em analogia aos nossos resultados, fosfatases ácidas de diversos organismos celulares sofreram inibição pelo fluoreto, relatada para a enzima do protozoário *Mayorella paletinensis* (Lasman, 1967), da ameba *Chaos chaos* (Holter & Lowry, 1959) e de *Salmonella typhimurium* (Carillo-Castaneda & Ortega, 1967).

Os inibidores fluoreto e vanadato foram os compostos mais efetivos na inibição das fosfatases alcalina e ácida de *D. similis*. O vanadato, análogo ao fosfato inorgânico (Pi), inibe competitivamente as tirosina-fosfatases. Portanto, seu efeito inibitório nas fosfatases em estudo, testado em alta concentração, indicou a presença de uma pequena fração de tirosina-fosfatases no extrato. Em comparação com os resultados obtidos, o vanadato, em menor concentração, inibiu mais fortemente a fosfatase ácida de cação (Gonçalves, 2000), a enzima de sementes de soja (Ferreira, 1995) e a de rim bovino (Granjeiro, 1994).

A partir do emprego de inibidores de BMr, tais como o pCMB, concomitantemente com cada poluente analisado, pode-se realizar um estudo adicional para verificar a importância das fosfatases de AMr na detecção de metais e agroquímicos. Silva (2000) analisou o efeito do acetato de chumbo na atividade da FAT, de AMr e de BMr dos órgãos (testículo, intestino, rim, baço, fígado, estômago, coração, pulmão, cérebro e cóclea) de ratos wistar tratados diariamente com o metal intragasticamente por 42 dias, e verificou uma redução significativa na atividade da FAT em todos os órgãos do tratado, enquanto

que observou uma diminuição de 70% na atividade das fosfatases de AMr e BMr, exceto para o estômago que exibiu maior inibição (85%). Para a autora, o estudo do efeito do chumbo na AE da fosfatase ácida na presença de compostos inibidores (tartarato 0,1M e p-hidroximercuribenzoato - pHMB 10mM) permitiu observar o efeito tóxico do metal sobre as fosfatases ácidas de BMr e de AMr, respectivamente, já que o tartarato inibe as fosfatases de AMr e o pHMB as de BMr.

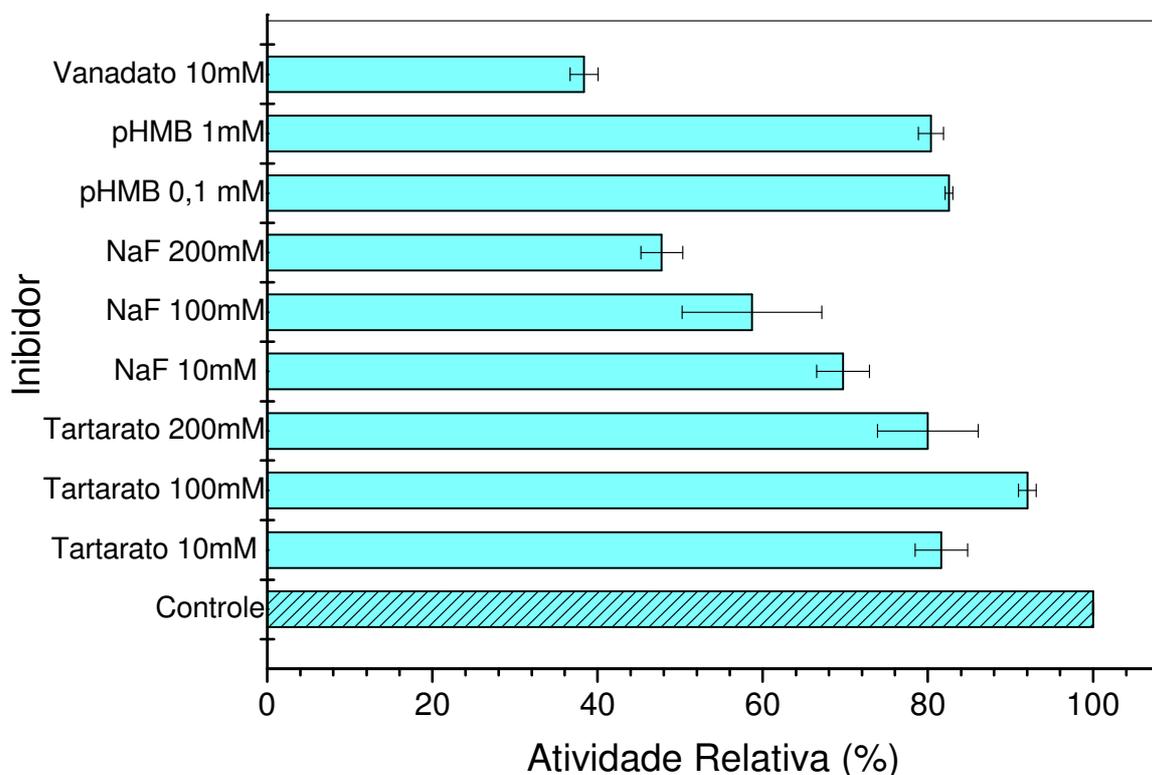


Figura 12. Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase alcalina de *D. similis*.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos inibidores indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do inibidor (Controle) foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

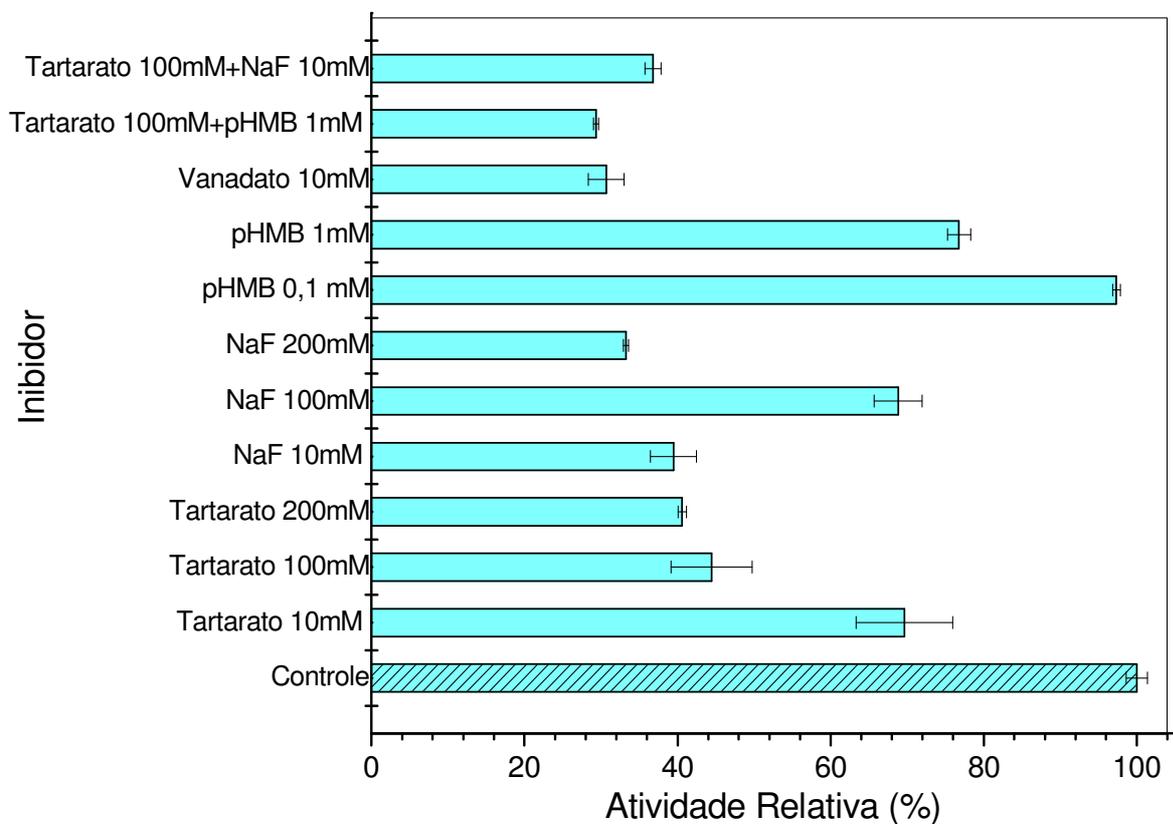


Figura 13. Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase ácida de *D. similis*.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos inibidores indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do inibidor (Controle) foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

3. Avaliação do efeito *in vitro* de poluentes na atividade das fosfatases de *D. similis*

3.1. Avaliação comparativa do efeito *in vitro* de poluentes na atividade das fosfatases ácida e alcalina de *D. similis*

Na **Figura 14** podemos observar os efeitos de 20 compostos orgânicos e 7 metais na hidrólise do pNPP pela fosfatase alcalina. Os poluentes simazina, Co^{2+} e Cd^{2+} promoveram ativação da fosfatase alcalina, enquanto que os íons Se^{4+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Mo^{6+} e Hg^{2+} inibiram sua atividade, significativamente. Entretanto, nenhum desses compostos exibiu efeito marcante ($\geq 50\%$) sobre a atividade da enzima. O discreto efeito inibitório, em torno de 30%, dos metais Cu^{2+} e Hg^{2+} na fosfatase alcalina, corrobora a hipótese da enzima conter uma pequena fração de isoformas que possuem cisteína em seu sítio ativo.

A partir do ensaio *in vitro* de atividade da fosfatase ácida na presença de 29 compostos orgânicos e 8 metais, observa-se na **Figura 15** que os poluentes aldrina, fenamifós, tiametoxan, Cd^{2+} e permetrina ativaram consideravelmente a atividade da fosfatase ácida, sendo que somente os 2 últimos compostos mencionados promoveram ativação $\geq 50\%$. A enzima foi significativamente inibida por Cu^{2+} e Co^{2+} e, na presença dos íons Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} , apresentou inibição superior a 50%.

O ensaio *in vitro* de atividade das fosfatases na presença de agroquímicos foi útil no sentido de realizar a triagem dos compostos mais efetivos como inibidores ou ativadores das enzimas e para avaliar qual fosfatase apresentou maior sensibilidade em relação aos diversos agroquímicos. A fosfatase ácida mostrou-se mais sensível a ação de poluentes porque exibiu alteração ($\geq 50\%$) em sua atividade, em relação à fosfatase alcalina e, portanto, foi selecionada para a realização dos ensaios mais detalhados *in vitro* e para os experimentos *in vivo*. Portanto, os poluentes Cd^{2+} e permetrina, que apresentaram ativação mais significativa da FAT, foram selecionados para os ensaios *in vivo*, e os íons metálicos Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} , que promoveram maior inibição da enzima, foram utilizados para determinação da constante e tipo de inibição e para os ensaios *in vivo*.

Podemos constatar que, embora alguns compostos orgânicos tenham alterado significativamente as atividades das fosfatases, as mesmas mostraram-se mais sensíveis à ação dos íons metálicos. Jonsson (2005) obteve resultados compatíveis com os do presente estudo ao expor a fosfatase ácida de *P. subcapitata* a diversos poluentes orgânicos e metais, sendo estes últimos mais efetivos em alterar a atividade da enzima.

As fosfatases do presente trabalho mostraram comportamentos diferentes perante alguns poluentes, como o Co^{2+} e Hg^{2+} , e para outros, apresentaram as mesmas alterações, porém em variados graus, como o Se^{4+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Mo^{6+} e Cd^{2+} . Para a fosfatase alcalina, o íon metálico Co^{2+} aumentou consideravelmente sua atividade, enquanto que para a fosfatase ácida, o mesmo agiu como inibidor. O íon Hg^{2+} inibiu significativamente a fosfatase alcalina e não apresentou efeito para a fosfatase ácida.

Analisando os resultados encontrados no presente estudo em comparação com o efeito de poluentes sobre outras enzimas de cladóceros, nota-se que Coen & Janssen (1997) obtiveram inibição de enzimas digestivas de *D. magna* após exposição por 48 horas à concentrações sub-letais de Cd^{2+} e Hg^{2+} , entretanto, não observaram inibição das enzimas pelos poluentes após exposição prolongada (96 horas) e, até mesmo, um aumento da atividade enzimática foi determinado pelo Cd^{2+} . O autor justifica que o aumento na atividade de enzimas digestivas reflete uma alteração na eficiência de assimilação de alimento pelo organismo. Em analogia aos nossos resultados, Jemec *et al.* (2007) constataram um aumento da atividade da acetilcolinesterase de *D. magna* exposta ao Cd^{2+} .

Em contradição com os resultados do presente estudo, López *et al.* (2006) constataram que a presença de inseticidas organoclorados (aldrina e lindano), inseticidas organofosforados (dimetoato, metidation e metil-paration), herbicida (atrazina) e fungicida (captan) aumentaram significativamente a atividade da fosfatase coletada em água de lago natural (Laguna Grande, Espanha), após 28 dias de incubação. Comparativamente com os resultados apresentados neste trabalho, Zhao *et al.* (2006) obtiveram inibição da fosfatase alcalina de *D. magna* por Cu^{2+} , porém, diferentemente do observado para a fosfatase alcalina de *D. similis*, a enzima de *D. magna* foi inibida por Co^{2+} .

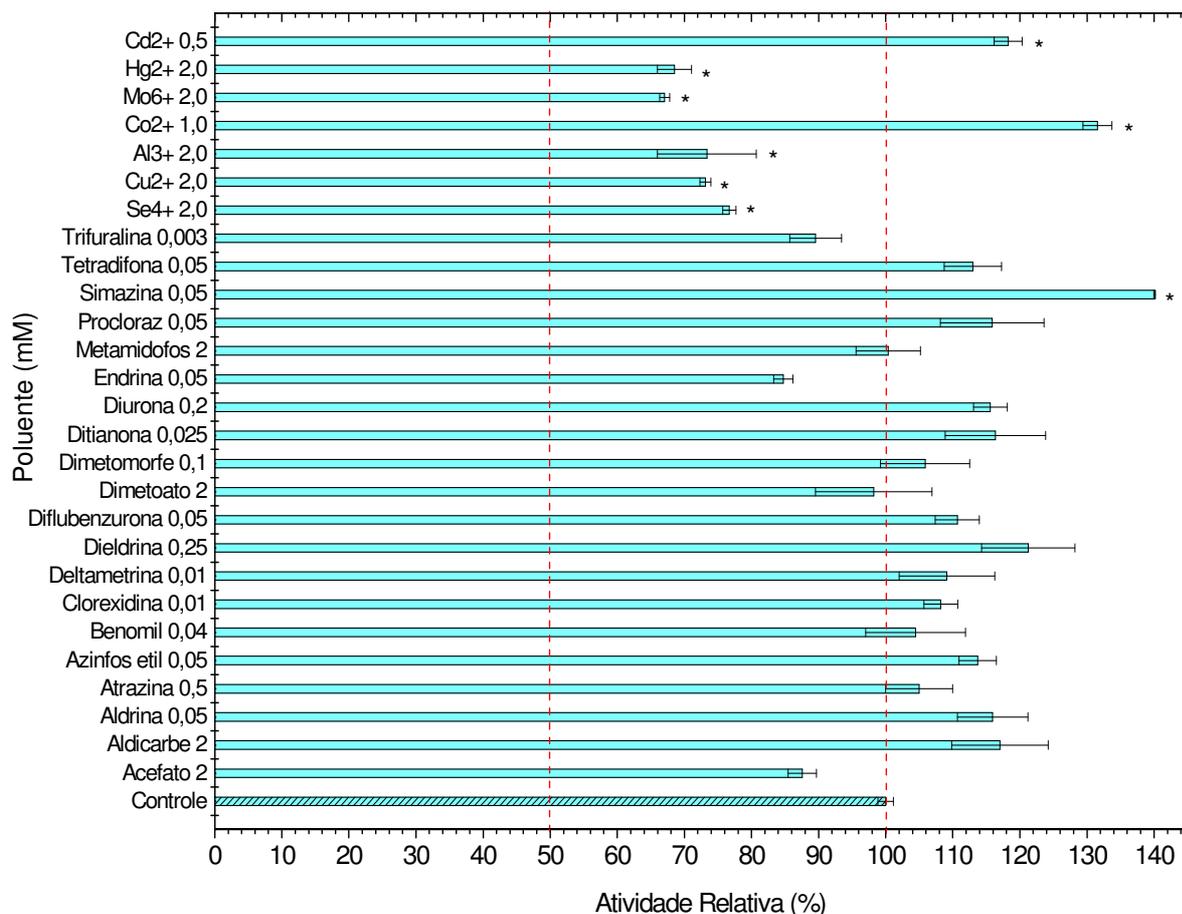


Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina de *D. similis* afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola.

A enzima foi pré-incubada por 20 minutos a 37°C na presença de cada um dos compostos discriminados, e a atividade foi determinada utilizando-se pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

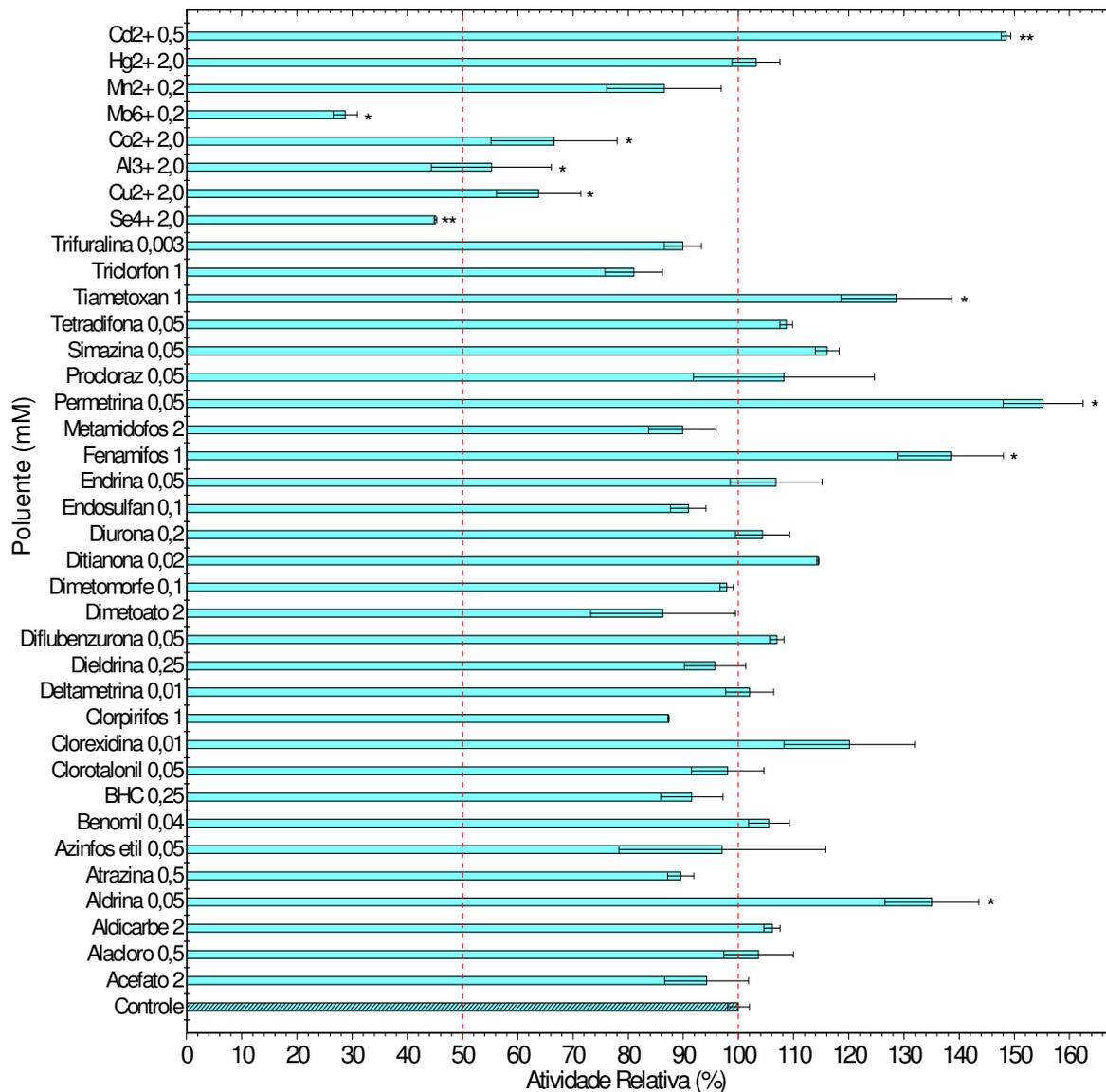


Figura 15. Atividade da fosfatase ácida de *D. similis* afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola.

A enzima foi pré-incubada por 20 minutos a 37 °C na presença de cada um dos compostos discriminados, e a atividade foi determinada utilizando-se pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle.

3.2. Determinação da IC50 e constantes de inibição (Ki) dos íons alumínio, selênio e molibdênio na atividade da FAT

Para se calcular o valor de IC50, a inibição foi avaliada para várias concentrações de Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} e os dados obtidos foram ajustados por regressão não linear que gerou uma curva tipo log-x ($y=a1+(a2-a1)/(1+ 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$) (**Figuras 16, 17 e 18**). Os valores de IC50 e seus intervalos de confiança 95% foram 0,54 (0,43-0,64) e 1,23 (0,99-1,50) mM, respectivamente, para Se^{4+} e Al^{3+} e 0,9 μM (0,49-1,9) para o Mo^{6+} .

Para a determinação das constantes de inibição, os metais Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} foram mantidos em três concentrações diferentes, enquanto que a concentração do pNPP foi variada, permitindo a medida da atividade com o aumento da concentração de substrato (**Figuras 19, 20 e 21**). O gráfico de Lineweaver-Burk para Al^{3+} foi consistente com uma inibição do tipo não competitiva (**Figura 19**). A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico de valores das intersecções (1/V) para cada concentração de Al^{3+} proporcionaram, na intersecção com o eixo da concentração do inibidor, o valor da K_i de 0,9 mM (**Figura 19B**). Para o Se^{4+} a inibição foi do tipo competitivo como demonstrado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 20**). A constante de inibição obtida por meio do gráfico da inclinação das retas contra concentrações de Se^{4+} correspondeu a 0,62 mM (**Figura 20B**). Com relação ao Mo^{6+} , o gráfico dos duplos recíprocos mostrou tratar-se de uma inibição competitiva (**Figura 21**). O gráfico da inclinação das retas contra concentrações do metal permitiu encontrar a menor K_i dentre os inibidores testados, 1,32 μM .

A partir dos valores de IC50 e K_i , determinados para os íons metálicos Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} , podemos constatar que o íon molibdênio foi o agente inibidor mais potente. Este apresentou o menor valor de K_i , da ordem de 3 vezes inferior ao obtido para os íons Al^{3+} e Se^{4+} , mostrando que o Mo^{6+} interage com uma afinidade maior no sítio ativo da enzima. Este último mostrou-se um potente inibidor competitivo, com um valor de K_i cerca de 280 vezes menor que o valor de K_m calculado para FAT. De acordo com Heo *et al.* (2002), o molibdênio é um análogo estrutural do fosfato e atua como inibidor competitivo potente de fosfatases ácidas, ligando-se à enzima com afinidade maior que a do próprio fosfato. O molibdênio costuma ser utilizado nos testes de inibidores de

fosfatases para se detectar a presença de grupos –SH livres essenciais para a catálise enzimática. Verjee (1969) observou que as isoenzimas de gérmen de trigo foram fortemente inibidas por molibdênio. Semelhante aos nossos resultados, Ferreira (1998) determinou que o Mo^{6+} apresentava inibição do tipo competitiva e um menor valor de K_i , dentre os inibidores testados (fosfato, fluoreto, vanadato), para a fosfatase ácida de sementes de soja.

Os resultados do presente trabalho sugerem uma maior inibição pelo Se^{4+} , quando comparado com o Al^{3+} , devido ao menor valor de IC_{50} , e aos intervalos de confiança que não se sobrepunham. Entretanto, ambos poluentes Se^{4+} e Al^{3+} demonstraram uma afinidade similar pela enzima, visto que os valores de K_i apresentaram semelhante ordem de grandeza, embora a inibição tenha ocorrido por dois mecanismos diferentes. O Se^{4+} , de maneira análoga ao Mo^{6+} , apresentou uma inibição do tipo competitiva, enquanto o Al^{3+} mostrou uma inibição não competitiva. Esse resultado contrasta com os determinados por Bittl *et al.* (2001) para as fosfatases extracelulares de lagos acidificados. Esses autores obtiveram uma inibição competitiva e diferentes valores de K_i , para o substrato 4-metilumbeliferil fosfato (MUFP), conforme a variação de pH: 0,021 mM em pH 4,5 e 0,014 mM em pH 4,8.

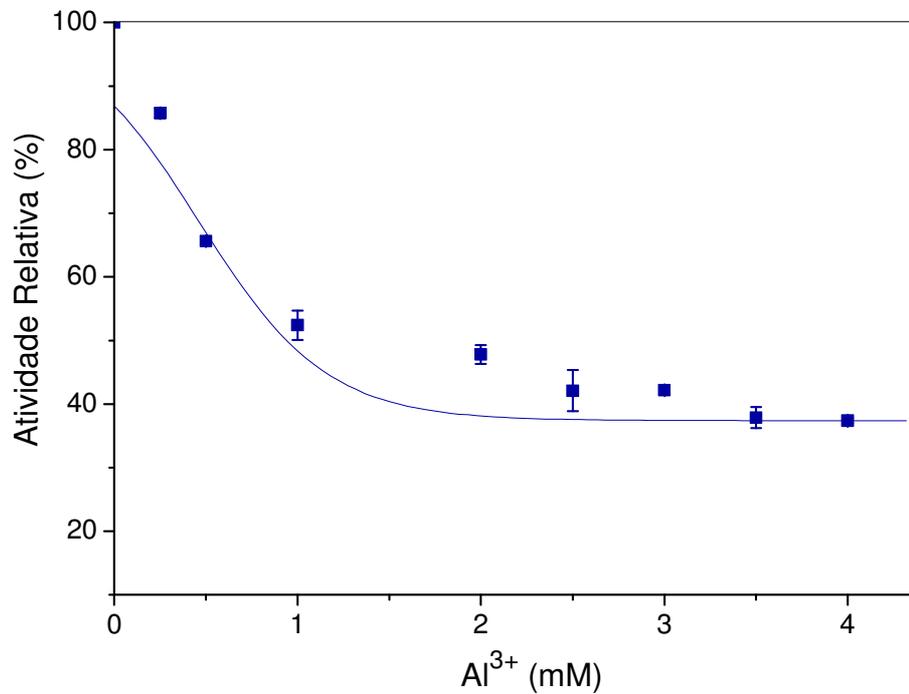


Figura 16. Efeito da concentração do íon alumínio na atividade da FAT de *D. similis*. A atividade enzimática foi determinada por incubação da enzima (40 min, 37 °C), conforme especificado em Métodos, em presença de diferentes concentrações de Al^{3+} , utilizando-se pNPP como substrato. A hidrólise do substrato na ausência dos metais foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

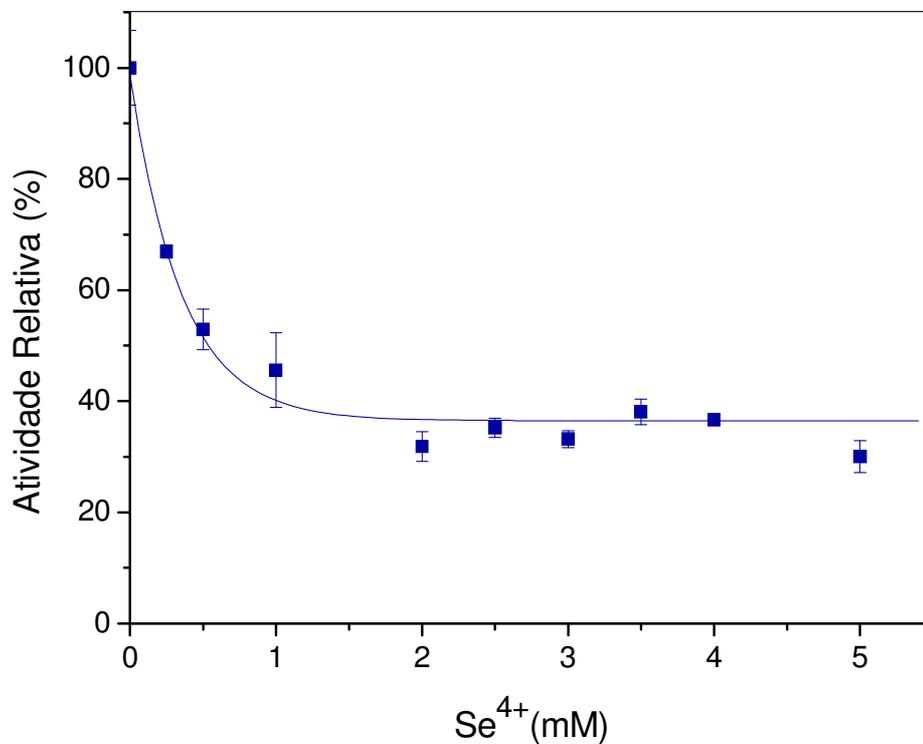


Figura 17. Efeito da concentração do íon selênio na atividade da FAT de *D. similis*. A atividade enzimática foi determinada por incubação da enzima (40 min, 37 °C), conforme especificado em Métodos, em presença de diferentes concentrações de Se^{4+} , utilizando-se pNPP como substrato. A hidrólise do substrato na ausência dos metais foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

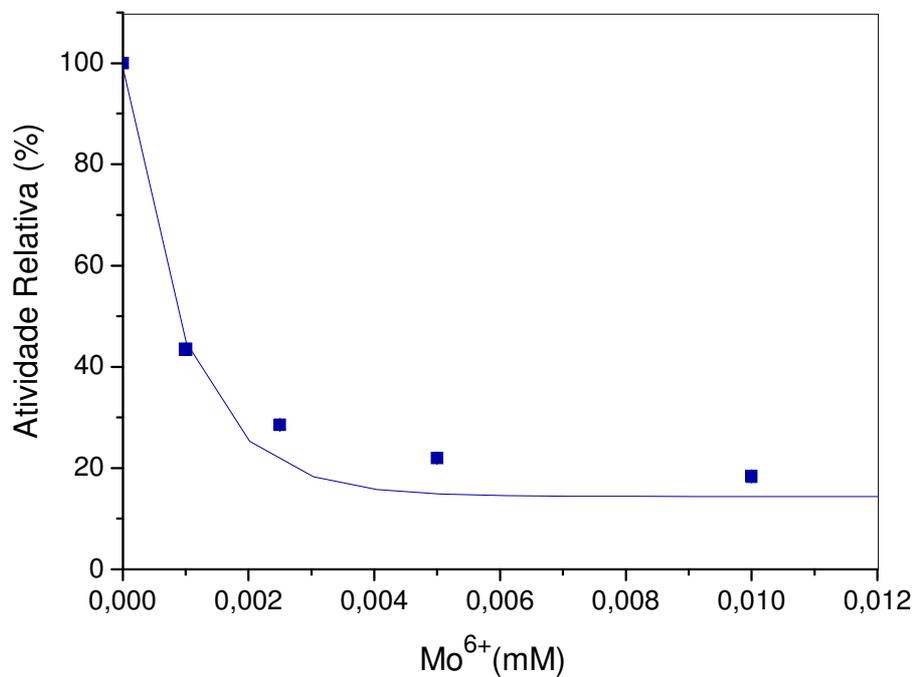


Figura 18. Efeitos das concentrações do íon molibdato na atividade da FAT de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada por incubação da enzima (40 min, 37°C), conforme especificado em Métodos, em presença de diferentes concentrações dos poluentes, utilizando-se pNPP como substrato. A hidrólise do substrato na ausência dos metais foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

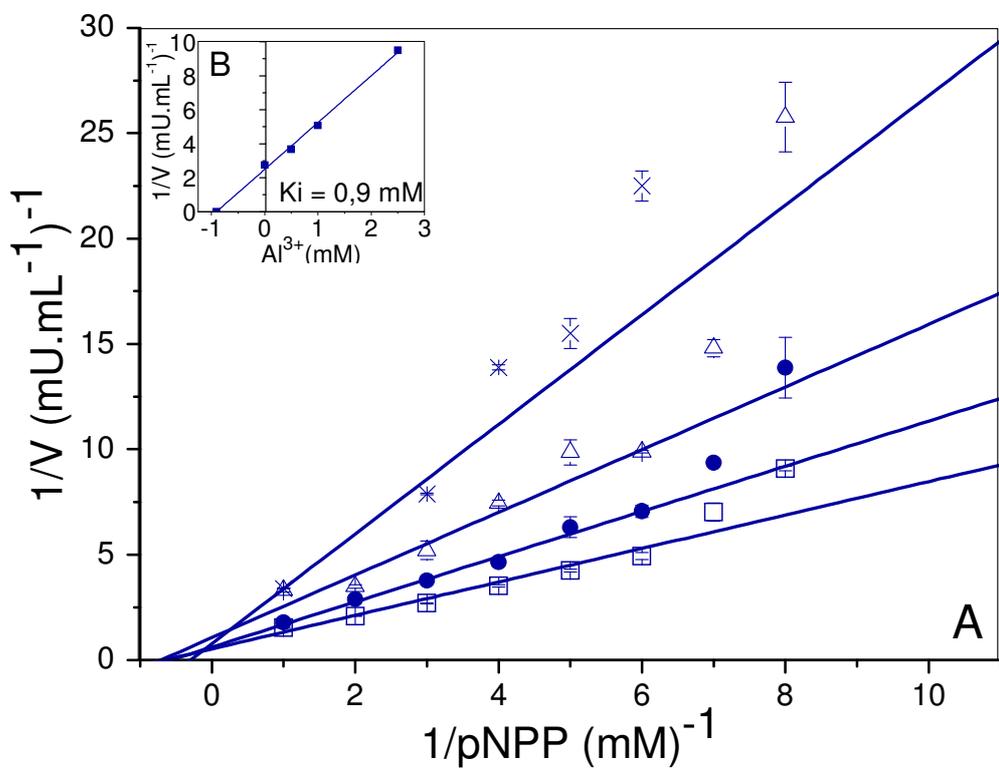


Figura 19. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da K_i do alumínio na inibição da FAT de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se a concentração de pNPP na ausência (\square), e em presença de 0,5 (\bullet), 1,0 (Δ) e 2,5 (\times) mM de Al^{3+} . B: Gráfico de Dixon (valores das interseções ($1/V$) em função da concentração do inibidor). Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

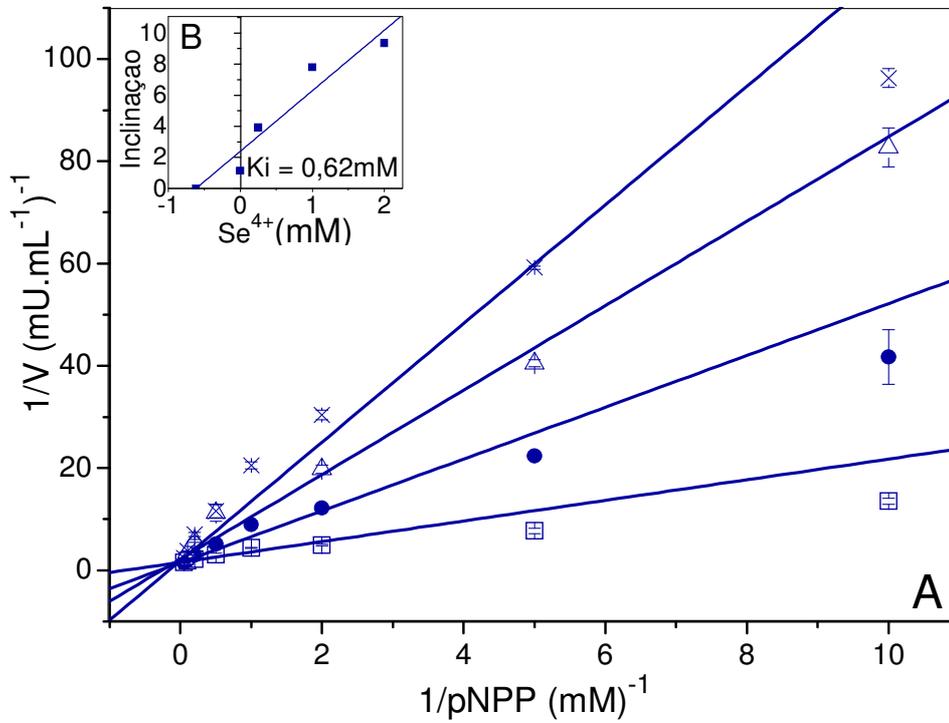


Figura 20. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da K_i do selênio na inibição da FAT de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se a concentração de pNPP na ausência (\square), e em presença de 0,25 (\bullet), 1,0 (Δ) e 2,0 (\times) mM de Se^{4+} . B: Gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

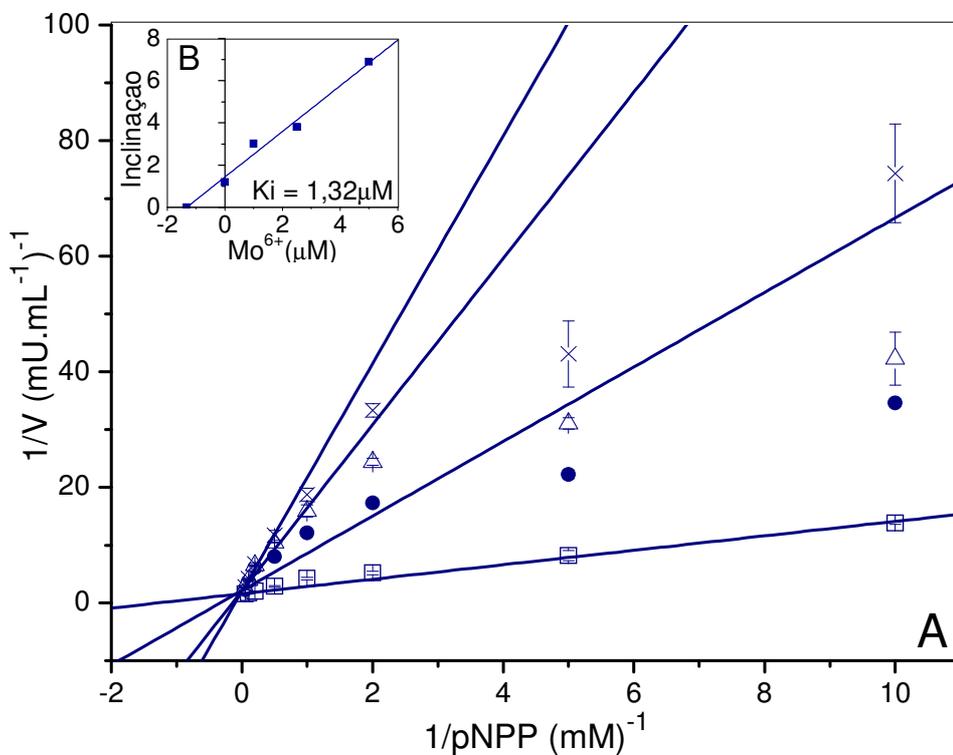


Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação da K_i do molibdênio na inibição da FAT de *D. similis*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se a concentração de pNPP na ausência (\square), e em presença de 0,001 (\bullet), 0,0025 (Δ) e 0,005 (\times) mM de Mo^{6+} . B: Gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

3.3. Efeito do cádmio sobre a energia de ativação da FAT

A energia de ativação (E_a) foi determinada através do gráfico de Arrhenius (**Figura 22**), variando-se a temperatura de incubação de 24 a 56 °C. Os valores de E_a , na ausência e na presença de 0,5 mM de Cd^{2+} , foram respectivamente $13,164 \pm 3,79 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e $10,374 \pm 1,90 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. A energia de ativação necessária para que ocorra a reação da fosfatase ácida foi discretamente diminuída na presença de 0,5mM de Cd^{2+} . Embora o poluente permetrina, aplicado na mesma concentração analisada para o Cd^{2+} , também tenha apresentado ativação enzimática >50%, este não exerceu influência na E_a da FAT (dados não apresentados). Não foram encontrados relatos sobre o efeito do Cd^{2+} em relação aos parâmetros cinéticos de outras fosfatases. A atividade da fosfatase ácida da alga *S. capricornutum* foi inibida em cerca de 20% na presença do Cd^{2+} aplicado na mesma concentração deste estudo (Jonsson, 2005).

A literatura reporta diferentes efeitos deste íon sobre diferentes enzimas de dafinídeos. Barata *et al.* (2005) e Jemec *et al.* (2007, 2008) observaram um aumento na atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutathione S-transferase e colinesterase (ChE) de *D. magna*, quando expostas ao Cd^{2+} em diferentes concentrações, enquanto Guilhermino *et al.* (1996) não observaram mudanças na atividade da ChE e Barata *et al.* (2005) constataram uma redução na atividade da catalase.

A atividade da AChE de *D. magna* teve um aumento superior a 50% exposta ao Cd^{2+} , *in vivo*, nas concentrações de 20-25 µg/L e sofreu considerável redução a partir de 40 µg/L de Cd^{2+} , sendo totalmente inibida a 90 µg/L de Cd^{2+} (Jemec *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual o íon pode exercer efeito ativador ainda não foi elucidado, mas os autores atribuíram o aumento na atividade enzimática como resultado da perda de homeostase.

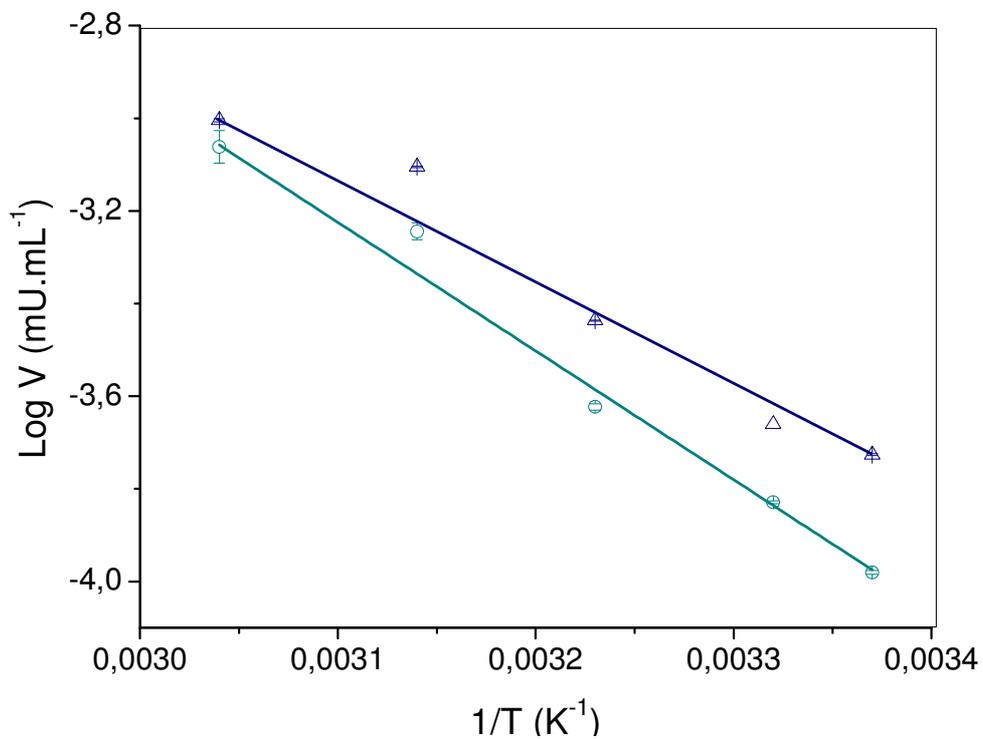


Figura 22. Gráfico de Arrhenius na determinação da energia de ativação (E_a) da fosfatase ácida de *D. similis* na ausência ou na presença de íons cádmio. A enzima e o substrato (pNPP) foram incubados na ausência (o) ou na presença de 0,5 mM de Cd^{2+} (Δ) durante 40 min a 37 °C e a atividade enzimática foi determinada conforme descrito em Métodos. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

Contrariamente, nenhuma mudança na atividade da AChE em *D. magna* foi verificada quando foi exposta a 5 µg/L de Cd²⁺ (Barata *et al.*, 2005) e foi observada inibição desta enzima em peixe *Procambarus clarkii*, quando exposto a 100 µg/L de Cd²⁺, por 96 h. Esses dados sugerem que o Cd²⁺ promove inibição enzimática quando administrado em altas concentrações, provavelmente devido a sua competição com outros íons bivalentes pelos sítios de ligação de cofatores das enzimas, e pode apresentar efeito ativador sobre a atividade enzimática em determinadas concentrações que interferem no equilíbrio fisiológico do organismo.

Felten *et al.* (2008) investigou os efeitos do Cd (7,5 e 15 µg/L) sobre as alterações fisiológicas de *Gammarus pulex* e constatou que a exposição ao metal causou uma diminuição significativa da osmolaridade e concentração de Ca²⁺ na hemolinfa, mas não alterou as concentrações de Na⁺ e Cl⁻, enquanto que a atividade da ATPaseNa⁺/K⁺ foi marcadamente aumentada.

4. Estudos *in vivo*

4.1. Ensaios de toxicidade aguda com *D. similis*

O cultivo do organismo-teste apresentou-se dentro da faixa de sensibilidade aceitável (0,04 a 0,17 mg/L) para o dicromato de potássio, e as variáveis físico-químicas (pH, oxigênio dissolvido - OD, condutividade e dureza) da água de diluição não sofreram alteração significativa antes e posteriormente ao ensaio. Portanto, os organismos estavam devidamente sensíveis para se proceder com os testes *in vivo*, durante os meses de agosto de 2009 a janeiro de 2010, apresentando um EC50 médio de 0,0486 mg/L (**Apêndices 3 e 4**).

Os valores de EC50 (concentração do poluente que imobiliza 50% dos organismos), níveis subletais EC1% (concentração do poluente que imobiliza apenas 1% dos organismos) e FT (Fator de Toxicidade – menor diluição da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre os organismos-teste), juntamente com seus respectivos valores de 95% de significância, para os poluentes Al³⁺, Cd²⁺, Se⁴⁺, Mo⁶⁺ e permetrina, podem ser observados na **Tabela 12** e na **Tabela 13**. As variáveis físico-químicas, em

geral, não foram alteradas durante os ensaios, exceto em presença do Al^{3+} que o pH reduziu consideravelmente, conforme observado no **Apêndice 5**.

Na **Tabela 12**, podemos observar que a permetrina se apresentou como o poluente mais tóxico para *D. similis* no ensaio de toxicidade aguda. O Cd^{2+} foi o íon metálico que causou maior toxicidade para o microcrustáceo dentre os demais analisados. A ordem de toxicidade, em mM, de cada poluente para o modelo biológico em estudo foi: Permetrina > Cd^{2+} > Se^{4+} > Mo^{6+} > Al^{3+} . O Al^{3+} aparentemente exerceu maior toxicidade que o Mo^{6+} nos valores expressos em mg/L, entretanto, quando consideradas as massas moleculares dos íons sob as formas de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, CdCl_2 , $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7$ e o resultado foi convertido para mM, verificou-se que o Al^{3+} foi menos tóxico para o organismo que o Mo^{6+} .

Tabela 12. Ensaio de toxicidade aguda 48hs com os poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} , e permetrina

Poluente	EC50* (mg/L)	EC50 (mM)
Al^{3+}	24,757 (12,795 – 37,206)	0,072 (0,037 – 0,108)
Cd^{2+}	0,279 (0,164 – 0,437)	0,00139 (0,0008 – 0,0022)
Se^{4+}	1,168 (0,825 – 1,433)	0,004 (0,003 – 0,005)
Mo^{6+}	29,983 (13,96 – 66,538)	0,024 (0,011 – 0,053)
Permetrina	0,022 (0,018 – 0,027)	0,000056 (0,000046 – 0,000069)

O EC50 e seus respectivos valores de 95% de significância, apresentados entre parênteses, foram calculados no programa EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM (v. 1.5)

*EC50 (Concentração Média Efetiva) = concentração do poluente que mata ou imobiliza 50% dos organismos expostos por um tempo específico.

Tabela 13. Níveis de toxicidade subletais para Al³⁺, Cd²⁺, Se⁴⁺, Mo⁶⁺ e permetrina

Poluente	EC1 ^a (mg/L)	FT ^b (mg/L)
Al ³⁺	2,16 (0,186 – 5,72)	1,0
Cd ²⁺	0,023 (0,001 – 0,061)	0,01
Se ⁴⁺	0,489 (0,115 – 0,734)	0,2
Mo ⁶⁺	4,887 (0,006 – 11,722)	3
Permetrina	0,005 (0,002 – 0,007)	0,004

Valores obtidos a partir do ensaio de toxicidade aguda 48hs com seus respectivos níveis de significância de 95%, apresentados entre parênteses, calculados no EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM (v. 1.5)

^aEC1 = concentração do poluente que imobiliza apenas 1% do total de organismos

^bFT (Fator de Toxicidade) = menor diluição da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre os organismos

Nos ensaios *in vivo* de toxicidade aguda (48h), o Mo⁶⁺ apresentou menor toxicidade para o organismo comparado ao íon Se⁴⁺, enquanto *in vitro* causou maior inibição da fosfatase ácida em relação aos demais, constatado pelo seu baixo valor de IC50 e Ki, da ordem de µM. Esse resultado sugere que o ensaio da fosfatase ácida *in vitro* foi mais sensível na detecção do Mo⁶⁺ em *D. similis* em relação ao ensaio de toxicidade aguda, enquanto para os íons Se⁴⁺ e Al³⁺ o ensaio de toxicidade *in vivo* apresentou maior sensibilidade. O Al³⁺ foi tóxico para 50% dos organismos na concentração de 0,072 mM no ensaio de toxicidade aguda realizado, enquanto necessitou-se de uma concentração maior (1,23 mM) para causar 50% de inibição da FAT. Similarmente, o Se⁴⁺ apresentou EC50 de 0,004 mM no teste de toxicidade aguda, enquanto somente na concentração de 0,54 mM pode causar 50% de inibição da FAT.

A permetrina, embora apresente baixa toxicidade aos mamíferos, tendo uma LD50 oral para ratos de 430 a 4000 mg/Kg (Exttoxnet, 1996), é altamente tóxica aos organismos aquáticos, principalmente aos crustáceos. Dessa maneira, era de se esperar que esse inseticida apresentasse o menor valor de EC50 (0,022 mg/L) para o microcrustáceo em estudo. Em relação ao presente trabalho, Silva (2005) obteve valores inferiores de LC50 (48h) para *C. dubia* e EC50 (48h) para *D. similis*, 0,0001 e 0,0003 mg/L, respectivamente.

Similarmente, Mello (2007) também obteve valor inferior de LC50 (96) (0,00933 mg/L) para o crustáceo *Litopenaeus vannamei*.

Existem diversos estudos de toxicidade de organismos aquáticos expostos ao Al^{3+} (Havas, 1985; Havas, 1986; Locke, 1991; Gensemer & Playle, 1999). Mackie (1989) expôs 5 espécies de invertebrados bênticos a seis concentrações de Al^{3+} de 0-400 $\mu g \cdot L^{-1}$ e em pH de 4 a 5 por 96 horas para determinar os valores de LC50 (concentração letal a 50% dos organismos). Todavia, foi observada mortalidade insuficiente para se calcular a LC50 nas concentrações testadas.

Khangarot & Ray (1989) examinaram a toxicidade de vários metais, dentre eles o íon Al^{3+} e correlacionaram com propriedades químicas de *D. magna*. Os valores de EC50 de 24 e 48 horas foram de 85,9 e 59,6 mg/L, respectivamente. Em comparação com os nossos resultados, *D. similis* apresentou maior sensibilidade ao Al^{3+} (EC50 48h de 24,757 mg/L) em relação aos valores de EC50 obtidos para *D. magna*, anteriormente especificados. Similarmente, *D. similis* mostrou ser mais sensível ao Mo^{6+} (EC50 48h de 29,98 mg/L) quando comparado com os valores obtidos para *D. magna* sob o mesmo tempo de exposição (2847 mg/L).

Segundo o IMO (2009), o molibdênio apresentou maior toxicidade para dafnídeos em ensaios de toxicidade aguda (48h) na sua forma de trióxido de molibdênio (EC50 de 88 mg/L) e foi menos tóxico sob a forma de molibdato de sódio (EC50 de 330mg/L), apresentando EC50 de 140mg/L como dimolibdato de amônio. Em nossos estudos observamos que o molibdênio, sob a forma de molibdato de amônio, obteve menor EC50 que as demais formas, anteriormente descritas e, conseqüentemente, maior toxicidade a *D. similis*. Sua maior toxicidade, comparada às demais formas químicas, pode ser atribuída ao íon amônio que é conhecidamente tóxico ou à espécie dafnídea utilizada nos ensaios apresentados pelo IMO, nos quais utilizaram *D. magna*. Esses resultados indicam uma maior sensibilidade de *D. similis* ao Mo em relação à *D. magna*.

Semelhantemente ao Al, o Se também tem sido muito estudado quanto a sua toxicidade aos organismos aquáticos (Johnston, 1987; Maier *et al.*, Brasher & Ogle, 1993; Hamilton, 2004; Hoang & Klaine, 2008; Khan & Wang, 2009). Johnston (1987) analisou os efeitos da toxicidade aguda e da exposição subaguda do Se, na forma de selenito de sódio e selenato de sódio, sobre o crescimento e reprodução de *D. magna*. O autor verificou que

os ovos e embriões foram os menos sensíveis (LC50 72h de 1,4 mg/L) para o selenato, enquanto as formas jovens foram mais sensíveis em relação aos adultos e apresentaram uma LC50 48h de 0,55 mg/L para o selenato. O selenito de sódio (LC50 = 0,68 mg/L) causou maior toxicidade que o selenato (LC50 = 0,75mg/L) para os adultos. A exposição subaguda do organismo ao selenato, a partir de concentrações supostamente utilizadas para reduzir a contaminação por Hg, causou supressão do crescimento e redução da produção de ovos.

No presente estudo, o Se na forma de selenito de sódio foi menos tóxico para *D. similis* (EC50 48h = 1,168 mg/L) comparado aos valores de LC50 obtidos para as formas jovens e adultas de *D. magna* do trabalho anteriormente mencionado.

Brix *et al.* (2001) avaliaram a toxicidade aguda (48 h) do selenato de sódio aos dafinídeos *C. dubia* e *D. pulex*, obtendo LC50 de 1,92 e 9,12, respectivamente. Os autores sugerem que as diferenças de valores de EC50 e LC50 encontrados para as mesmas espécies ou com parentesco próximo, observadas na literatura de diversos autores, são atribuídas às variações de pH ambiental ou do meio de cultivo.

Schultz *et al.* (1979) e Johnston (1989) analisaram as alterações ultra-estruturais causadas pela exposição aguda ao selênio e ambos os grupos encontraram densos depósitos de cálcio na matriz mitocondrial após 16 horas de exposição. Este fenômeno ainda é discutido em relação às alterações similares resultantes da exposição ao cádmio.

Sorvari & Sillanpää (1996) obtiveram os seguintes valores de EC50 (24h) para *D. magna* exposta ao Cd, na ausência ou presença de agentes quelantes: 0,98 mg/L para o Cd²⁺ ausente de quelantes; 310 mg/L para Cd²⁺ + EDTA; 11 mg/L para Cd²⁺ + DTPA.

Barata *et al.* (2002) correlacionaram os valores de EC50 (24h) e LC50 (48h) para *D. magna* e sua assimilação de Cd proveniente da água ou da fonte de alimento, ou de ambas as formas, e obtiveram os seguintes resultados (em µg/L): EC50 de 0,86 para o grupo alimentado com Cd; LC50 de 1,0 para o grupo no qual a água de cultivo continha Cd; LC50 de 0,5 para o grupo que recebeu Cd a partir da água de cultivo e do alimento. O autor constatou que houve correlação entre sobrevivência (LC50) e assimilação de Cd na água e uma forte relação negativa entre tolerância e assimilação do metal, sugerindo que os clones de *D. magna* menos sensíveis ao Cd acumulam mais o mesmo.

Comparando os resultados obtidos por Sorvari & Sillanpää (1996) com os do presente trabalho, verificou-se que o valor de EC50 (48h) obtido para *D. similis* (0,279 mg/L) foi menor que o EC50 (24h) para os grupos de *D. magna* expostos ao Cd com ou sem quelantes. Todavia, o EC50 (48h) para *D. similis* apresentou-se relativamente superior em relação aos valores de EC50 (24h) e LC50 (48h) obtidos por Barata *et al.* (2002).

Haap & Köhler (2009) caracterizaram a sensibilidade ao Cd, a expressão da hsp70 e o acúmulo do metal de sete clones de *D. magna* provenientes de diferentes regiões geográficas. Nos ensaios de imobilização aguda, os clones apresentaram diferenças significativas quanto à sensibilidade ao metal. O maior valor de EC50 obtido apresentou uma baixa expressão de hsp70. As variações clonais na sensibilidade e expressão da hsp70 não tiveram relação com o acúmulo de Cd. Esses resultados sugerem uma relação entre a sensibilidade ao Cd e expressão da hsp70 para os dafinídeos, além de enfatizar a diferença de toxicidade existente entre clones de uma mesma espécie de *Daphnia*. Obviamente, se observamos diferentes valores de toxicidade entre clones de uma mesma espécie dafinídea, também será encontrado valores diferentes entre *D. magna* e *D. similis*. Portanto, para se obter um valor de EC50 seguro para o monitoramento ambiental, deve-se levar em consideração o estudo de toxicidade aguda utilizando diferentes clones de uma espécie dafinídea ou complementar o ensaio com o auxílio de marcadores bioquímicos.

4.2. Análise da ação conjunta dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} e Mo^{6+} sobre a toxicidade aguda em *D. similis*

A partir da análise da **Tabela 14**, podemos observar que somente os poluentes Al^{3+} + Cd^{2+} e Al^{3+} + Mo^{6+} apresentaram $S < 1$ e, portanto, um efeito mais que aditivo (ou efeito sinérgico), sendo que a primeira mistura foi 0,7 vezes mais tóxica que a soma da toxicidade dos poluentes testados individualmente, enquanto que a segunda foi 0,05 vezes mais tóxica. As demais misturas de poluentes tiveram $S > 1$, o que significa que o efeito das misturas foi menos que aditivo (ou antagônico), apresentando menor toxicidade do que a soma da toxicidade destes compostos individualmente.

Existem diversos meios de avaliar os efeitos de poluentes testados em conjunto (Marking, 1985; Czuczwar *et al.*, 2001, Jonsson, 2007), a partir dos quais utilizam-se diferentes algoritmos matemáticos ou análises isobolográficas. Entretanto, muitas vezes as interações toxicológicas resultantes da exposição de uma mistura de contaminantes são extremamente complexas, podendo, por exemplo, exibir efeitos aditivos em baixas doses e antagônicos em altas (Zagatto & Bertolotti, 2008).

Eaton (1973) realizou um teste de toxicidade com a mistura de Cu, Cd e Zn utilizando o peixe *Pimephales promelas* e mostrou que os efeitos foram estritamente aditivos. Finlayson & Verrue (1982) testaram a mesma mistura no salmão *Oncorhynchus tshawytscha* e encontraram efeito tóxico não aditivo. Verificaram que a mistura de Cu e Cd foi aditiva enquanto que a de Zn e Cd foi antagonística. Sprague e Ramsay (1965) testaram uma mistura binária de Zn e Cu, utilizando salmão atlântico (*Salmo salar*) e observaram que um simples efeito aditivo ocorreu quando a concentração dos metais estava relativamente baixa e um efeito sinérgico foi constatado em altas concentrações.

Enfatizando a dificuldade de se estabelecer os efeitos tóxicos da mistura de poluentes, a utilização de marcadores bioquímicos, aliada aos estudos de toxicidade, pode auxiliar na detecção de níveis de toxicidade subletais e no estabelecimento da CMP de cada agente poluente em níveis seguros.

Existem, relativamente, poucos trabalhos que analisam a toxicidade da mistura de poluentes e a maioria analisa a mistura de metais, sendo que um destes em geral é

extremamente tóxico aos organismos, como a interação do Cd e Zn sobre o camarão de água doce *Paratya tasmaniensis* (Thorp & Lake, 1974); análise da toxicidade da mistura Cd, Pb e Zn em oligoquetos (Weltje, 1998); avaliação da toxicidade de misturas binárias equitóxicas de Cd, Cu e Co em *Vibrio fischeri* (Fulladosa *et al.*, 2005); estudos com Cd, Cu e Zn para prever a toxicidade (Kamo & Nagai, 2008); e o estudo da interação entre o Hg e Se (Khan & Wang, 2009).

Tabela 14. Toxicidade aguda e aditividade dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} e Mo^{6+} a *D. similis*

Mistura	Poluente	EC50; 48h (mg/L)		Soma da aditividade (S)	Índice de aditividade (IA)
		EC50 da substância individualmente	EC50 da substância na mistura		
$Al^{3+} + Cd^{2+}$	Al^{3+}	24,757	10,297	0,588	0,701
	Cd^{2+}	0,279	0,048		
$Al^{3+} + Se^{4+}$	Al^{3+}	*	15,242	1,761	-0,761
	Se^{4+}	0,489	0,560		
$Al^{3+} + Mo^{6+}$	Al^{3+}	*	9,467	0,951	0,052
	Mo^{6+}	29,983	17,037		
$Cd^{2+} + Se^{4+}$	Cd^{2+}	*	0,088	1,724	-0,724
	Se^{4+}	*	0,689		
$Cd^{2+} + Mo^{6+}$	Cd^{2+}	*	0,245	2,417	-0,586
	Mo^{6+}	*	46,138		
$Se^{4+} + Mo^{6+}$	Se^{4+}	*	0,907	2,850	-0,649
	Mo^{6+}	*	29,83		

* Valor anteriormente especificado nesta tabela

4.3. Efeito *in vivo* dos poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Mo^{6+} , Se^{4+} e permetrina na atividade da FAT de *D. similis*

Pela análise da **Figura 23A**, verificamos que o Al^{3+} inibiu significativamente a atividade da FAT em 35% na concentração de toxicidade EC50, enquanto que a enzima apresentou maior sensibilidade ao Cd^{2+} (**Figura 23B**), cuja inibição, de 50%, ocorreu ao nível subletal (EC1). Todavia, a FAT não foi inibida pelo Cd^{2+} na sua maior concentração testada (EC50), sugerindo que a inibição enzimática foi independente da concentração deste. Enquanto nos experimentos *in vitro* o Cd^{2+} agiu como ativador da FAT (**Figura 15**), *in vivo* foi o poluente que inibiu mais fortemente a enzima. No ensaio de toxicidade aguda (48h), o Cd^{2+} foi o metal mais tóxico à *D. similis* devido ao seu baixo valor de EC50 (0,279 mg/L) em relação aos demais metais.

O Mo^{6+} foi o único poluente que não alterou, *in vivo*, a atividade da FAT (**Figura 23C**). Todavia, nos ensaios *in vitro*, ele foi considerado o mais potente inibidor da enzima. Diferentemente dos demais poluentes testados *in vivo*, o Se^{4+} causou ativação enzimática superior a 70% em todos os níveis de toxicidade analisados (**Figura 24A**), enquanto *in vitro* promoveu inibição maior que 50%.

Similarmente ao Al, o inseticida permetrina promoveu inibição significativa de 40% (**Figura 24B**) na atividade da FAT na concentração de toxicidade EC50. Entretanto, quando testada *in vitro*, a permetrina promoveu ativação da atividade enzimática.

Os estudos de avaliação da atividade enzimática *in vitro* têm sido muito utilizados na triagem de vários agentes poluentes e em áreas de monitoramento (Repetto *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2004), como métodos de análise qualitativa e quantitativa de poluentes orgânicos e metais pesados (Skladal *et al.*, Mazzei *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1990a). Nestes estudos, tem se mostrado que a medida da atividade enzimática pode ser usada como um bioindicador de toxicidade de poluentes, pois alguns efeitos qualitativos tendem a ser semelhantes aos que ocorrem nos organismos vivos (Gill *et al.*, 1990b; El Demerdash & Elagamy, 1999). Contrariamente ao observado por estes pesquisadores, no presente trabalho constatou-se que a comparação entre os dados dos ensaios enzimáticos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram a inexistência de uma correlação entre ambos, exceto para o poluente Al^{3+} . Embora a FAT tenha apresentado alterações significativas tanto *in vitro* quanto *in vivo*

para os poluentes Cd^{2+} , Se^{4+} e permetrina, os resultados apresentaram-se qualitativamente diferentes. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que no organismo vivo existem inúmeras vias de sinalização que podem ativar e/ou inativar diferentes isoformas de fosfatases ácidas, culminando com uma resposta diferente para a observada *in vitro*.

Sentürk *et al.* (2009) analisaram os efeitos *in vitro* e *in vivo* de alguns pesticidas sobre a atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase dos eritrócitos da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os autores verificaram que os pesticidas cipermetrina e propoxur inibiram a atividade da enzima somente *in vitro*, e apenas a deltametrina foi capaz de inibir a glicose 6-fosfato desidrogenase tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A ordem de inibição da atividade da FAT *in vivo* foi semelhante à obtida nos ensaios de toxicidade aguda ($\text{Cd}^{2+} > \text{permetrina} > \text{Al}^{3+} > \text{Mo}^{6+}$), sugerindo uma relação entre alteração de atividade enzimática com a toxicidade dos poluentes ao modelo biológico em estudo. Baseando-se nos resultados dos experimentos *in vivo* com a FAT, verificamos que a alteração da enzima pode ser utilizada como biomarcadora da toxicidade dos poluentes Al, permetrina, Cd e Se para *D. similis*. Ainda mais importante é o fato de que as alterações da FAT foram detectadas aos níveis de toxicidade subletais para Cd e Se, sendo que essas podem ser relevantes na predição de impacto ambiental.

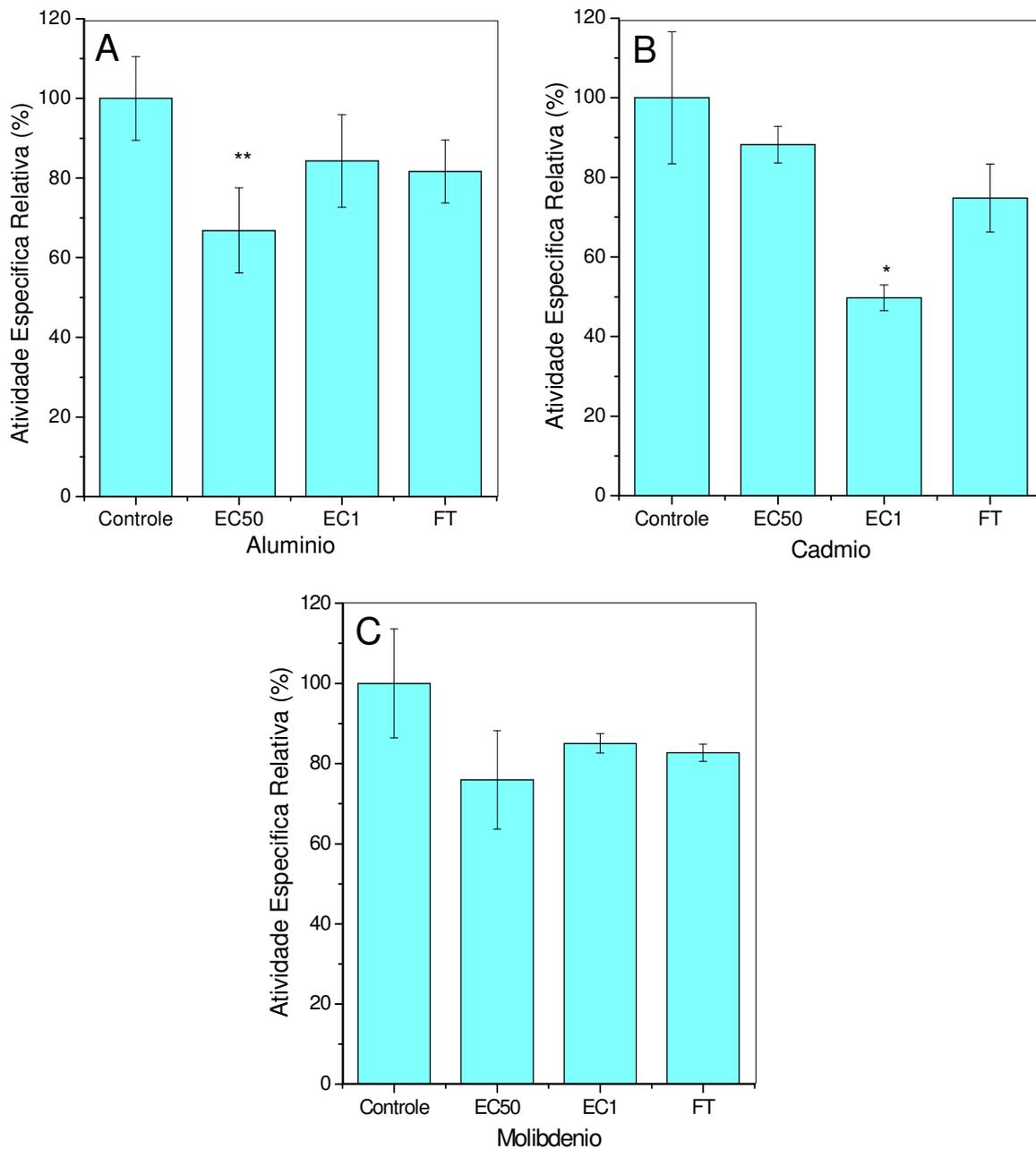


Figura 23. Atividade da FAT de *D. similis* exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: **A.** Alumínio, **B.** Cádmio, **C.** Molibdênio.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos poluentes indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do poluente (Controle) foi considerada como 100%. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle; ** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle.

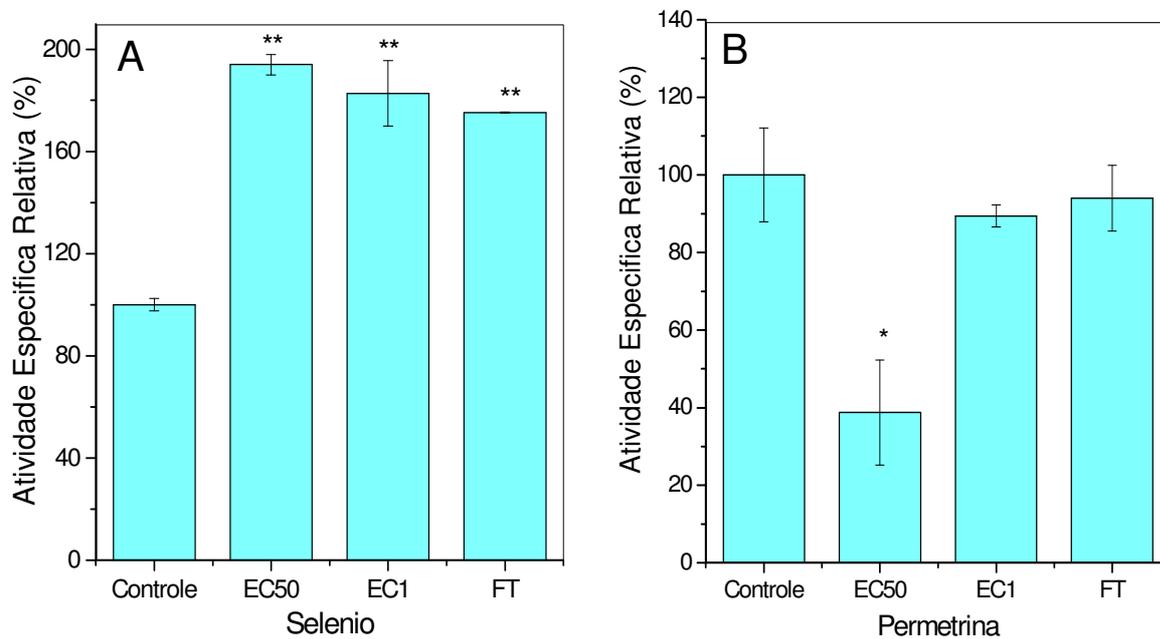


Figura 24. Atividade da FAT de *D. similis* exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Selênio, B. Permetrina.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos poluentes indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do poluente (Controle) foi considerada como 100%. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle.

O uso de fosfatases como indicadoras da toxicidade de poluentes aos organismos aquáticos é relativamente recente, de modo que poucos relatos foram observados para o estudo com microcrustáceos. A maioria dos relatos observados refere-se aos estudos de contaminantes com peixes (Parthasarathi & Karuppasamy, 1998; Johal *et al.*, 2002; Das & Mukherjee, 2003; Borges *et al.*, 2007; Saha & Kaviraj, 2009).

Jonsson e colaboradores publicaram diversos trabalhos sobre o estudo da fosfatase ácida da alga *P. subcapitata* exposta a poluentes orgânicos e inorgânicos (Jonsson & Aoyama, 2007; Jonsson *et al.*, 2009, Jonsson & Aoyama, 2010); Khangarot & Rathore (2003) dosaram a atividade das fosfatases de *D. magna* expostas ao Cu^{2+} por 48h como um dos parâmetros bioquímicos para avaliar a toxicidade do poluente; Saha & Kaviraj (2009) avaliaram os efeitos da cipermetrina sobre alguns parâmetros bioquímicos, dentre estes as fosfatases, do peixe *Heteropneustes fossilis*. Similarmente aos resultados obtidos para a FAT de *D. similis* com a permetrina, esses últimos autores verificaram a redução da atividade da fosfatase ácida do fígado de *H. fossilis* exposto às duas concentrações subletais de cipermetrina (inseticida piretróide similar a permetrina) que, aliado a outros parâmetros bioquímicos, indicava que o organismo estava estressado. Resultados semelhantes também foram observados no peixe *Channa punctatus* exposto ao inseticida piretróide fenvalerato (Parthasarathi & Karuppasamy, 1998). A redução na atividade enzimática foi atribuída ao aumento da glicogenólise ou às mudanças na membrana mitocondrial.

Em oposição à inibição da enzima, *in vivo*, observada para *D. similis* na presença do Cd, a exposição do peixe de água doce *Channa punctatus* em meio contendo Cd causou um aumento na atividade da fosfatase ácida e uma inibição na atividade da colinesterase no fígado (Dubale & Shah, 1981).

4.4. Efeito *in vivo* da mistura dos poluentes Al³⁺, Cd²⁺, Mo⁶⁺ e Se⁴⁺ sobre a atividade da FAT de *D. similis*

A atividade da FAT de *D. similis* foi significativamente alterada pela mistura binária dos metais Al, Cd, Mo e Se, tanto na concentração de EC50 quanto nas concentrações subletais (EC1, FT), conforme observado nas **Figuras 25 e 26**, exceto para a mistura Al + Se. A mistura Al + Cd promoveu maior inibição da FAT para a concentração de EC50, correspondente a 90% (**Figura 25A**). A ordem de inibição da atividade da FAT para a concentração de EC50 e seus respectivos percentuais foram: Al + Cd (90%) > Al + Mo (78%) > Se + Cd (72%) > Mo + Cd (32%). Contraditoriamente, a mistura Se + Mo promoveu uma ativação de 50% na atividade enzimática no nível de EC50 (**Figura 26C**). Tanto a mistura binária de Al e Cd como a de Cd e Se exibiram o mesmo e o maior percentual de inibição da atividade da enzima sob o nível subletal EC1, cujo valor foi de 88% (**Figura 25A, Figura 26A**). De maneira geral, os níveis subletais avaliados promoveram inibição da atividade enzimática com valores semelhantes ou até superiores aos observados para o EC50, como para a mistura Cd e Se que promoveu 88% de inibição da atividade da FAT. Isso significa que a FAT foi sensível à mistura binária de metais tanto para a concentração de EC50 como para as concentrações subletais.

Enquanto nos ensaios de toxicidade aguda com a mistura dos metais Al, Cd, Mo e Se, somente Al + Cd e Al + Mo (**Tabela 14**) apresentaram efeito sinérgico sobre *D. similis*, a exposição da FAT aos mesmos metais revelou a ocorrência de alterações bioquímicas subletais em todas as misturas analisadas, exceto para Al + Se. Esses resultados evidenciam a necessidade de complementar os testes de toxicidade aguda com mistura de poluentes a partir da utilização de biomarcadores enzimáticos, tais como a FAT.

O uso de biomarcadores enzimáticos tem sido muito útil para avaliar a resposta do organismo aos agentes tóxicos individuais ou presentes em misturas (Svendensen *et al.*, 2004; Gastaldi *et al.*, 2007; Adam *et al.*, 2009). A enzima NADPH citocromo c redutase é importante na detoxificação de xenobióticos orgânicos (Arun & Subramanian, 2003); a catalase é uma enzima antioxidante bem caracterizada, e o aumento de sua atividade nos organismos pode indicar estresse (Durou *et al.*, 2007); a inibição da Ache é intimamente ligada aos mecanismos de ação tóxica de alguns pesticidas (Galgani & Bocquené, 1991).

Jonsson & Aoyama (2007) analisaram a ação conjunta dos poluentes LAS, Hg^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} *in vitro* sobre a atividade da fosfatase ácida de *P. subcapitata*. Os autores observaram que o Hg^{2+} foi o inibidor mais potente em comparação com Al^{3+} ou LAS e que a mistura Hg^{2+} + Al^{3+} apresentou efeito aditivo sobre a atividade da enzima, enquanto Hg^{2+} + LAS mostrou efeito antagônico. O Cu^{2+} , que demonstrou efeito ativador quando pré-incubado sozinho com a enzima comportou-se como antagonista para o efeito inibidor do Hg^{2+} .

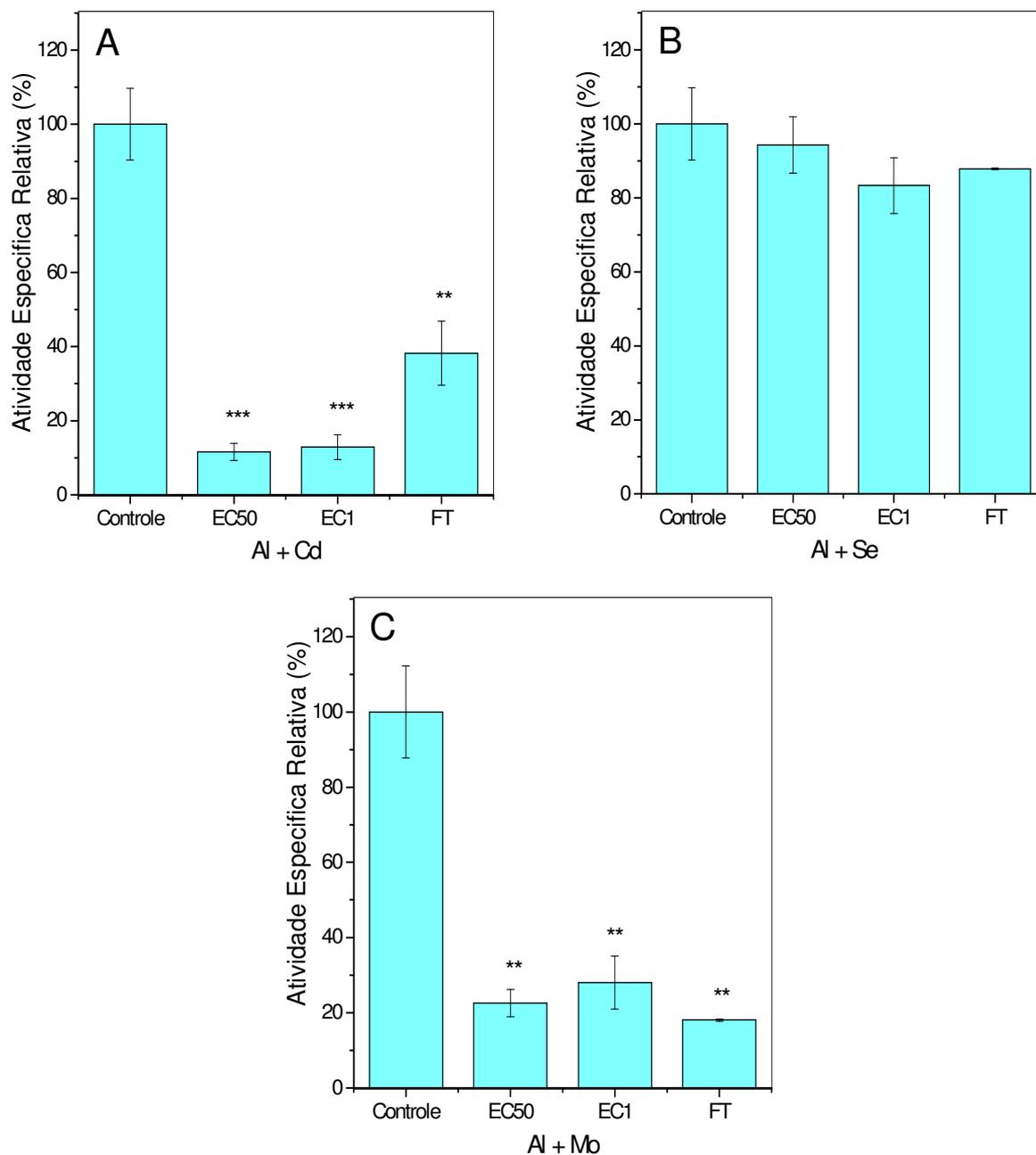


Figura 25. Atividade da FAT de *D. similis* exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Al + Cd, B. Al + Se, C. Al + Mo.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos poluentes indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do poluente (Controle) foi considerada como 100%. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle.

*** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle.

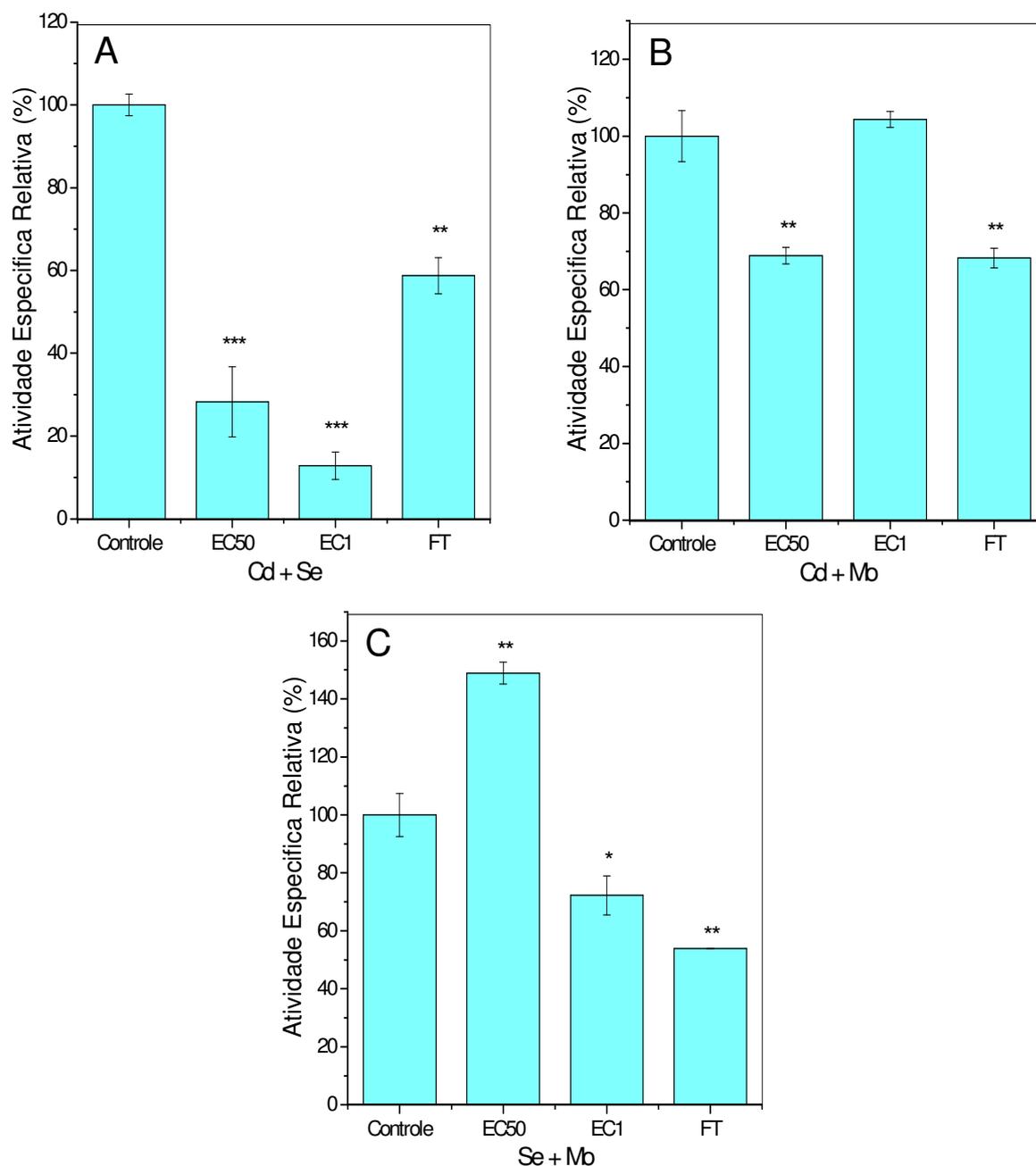


Figura 26. Atividade da FAT de *D. similis* exposta, aos níveis de toxicidade aguda EC50, EC1 e FT por 48 horas, aos poluentes: A. Cd + Se, B. Cd + Mo, C. Se + Mo.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de pNPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos poluentes indicados. A taxa de hidrólise do pNPP na ausência do poluente (Controle) foi considerada como 100%. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle; ** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle; *** diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle.

V. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- a) A fosfatase ácida mantém-se estável por 2 semanas se o extrato bruto ou o organismo íntegro forem armazenados a -70°C , enquanto que uma perda considerável de 40% na atividade específica da enzima ocorre se o organismo for armazenado a -20°C , pelo mesmo período.
- b) A FAT demonstrou atividade ótima em pH 5,0, atribuído à fosfatase ácida e em pH 9,5, correspondente ao da fosfatase alcalina. Esses valores foram condizentes com os relatados para outras espécies de microcrustáceos.
- c) O valor de K_m calculado para a fosfatase ácida foi relativamente alto e semelhante aos observados em microcrustáceos e algas.
- d) As fosfatases apresentaram comportamentos similares quanto à especificidade por substratos e tiveram como substratos mais efetivos, com taxa de hidrólise superior ao pNPP, a serina-fosfato, o pirofosfato e a frutose-1,6-bisfosfato.
- e) As fosfatases mostraram-se relativamente insensíveis a ação de potenciais inibidores, alterando a atividade somente na presença de altas concentrações. Contudo, a fosfatase ácida apresentou alteração mais significativa de sua atividade, quando exposta aos inibidores, em relação à fosfatase alcalina.
- f) Os resultados obtidos a partir dos estudos de especificidade por substratos e de inibidores sugerem a predominância de serina-treonina fosfatases e uma discreta presença de tirosina-fosfatases no extrato de *D. similis*.
- g) As enzimas foram fracamente afetadas por poluentes orgânicos em condições *in vitro*, exceto a permetrina que ativou consideravelmente (>50%) a FAT. Em contrapartida, a

fosfatase ácida apresentou maior alteração de sua atividade na presença dos metais Al, Cd, Se e Mo, em relação à fosfatase alcalina. Esses dados foram úteis para selecionar a fosfatase ácida e os poluentes Al, Cd, Se, Mo e permetrina para os estudos mais detalhados *in vitro* e/ou para os ensaios *in vivo*.

- h) Dentre os poluentes testados, os metais Al^{3+} , Se^{4+} e Mo^{6+} inibiram mais marcadamente a atividade da fosfatase ácida *in vitro*, enquanto que o Cd^{2+} e a permetrina promoveram ativação da enzima. O íon Mo^{6+} inibiu mais efetivamente a fosfatase ácida *in vitro* que Al^{3+} e Se^{4+}
- i) Nos ensaios de toxicidade aguda, a permetrina apresentou menor EC_{50} 48hs e conseqüentemente, maior toxicidade quando comparada aos íons metálicos Cd^{2+} , Se^{4+} , Al^{3+} e Mo^{6+} . Dentre os metais analisados, Cd^{2+} foi o mais tóxico.
- j) A FAT, através da análise de sua atividade *in vivo*, pode ser utilizada como biomarcadora de toxicidade em nível letal (EC_{50}), para os poluentes permetrina e Al, e em níveis subletais para Cd e Se, podendo predizer a intensidade do impacto ambiental.
- k) A exposição da FAT *in vivo* com a mistura binária dos metais Al, Cd, Mo e Se detectou alterações bioquímicas subletais em *D. similis* não evidenciadas pelo ensaio de toxicidade aguda.
- l) A FAT pode ser uma ferramenta útil para complementar os ensaios de toxicidade aguda com os poluentes estudados, tanto individualmente como na forma de mistura binária.
- m) A FAT atende aos requisitos de um bom biomarcador por estar relacionada ao processo fundamental de ciclagem de fosfatos para o microcrustáceo, apresentar fácil reprodutibilidade e devido a sua capacidade de atuar como um indicador geral de exposição aos metais.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Estudos de especificidade *in vivo* das fosfatases poderiam dar maiores informações sobre o possível substrato natural desta enzima e, portanto, de sua função biológica.
- b) Seria interessante dosar as fosfatases na temperatura de cultivo (20°C) e comparar com a atividade específica das enzimas a 37°C.
- c) Devido à inexistência de uma correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*, a influência dos poluentes que não alteraram significativamente a atividade da enzima *in vitro* requer mais atenção nas exposições *in vivo*.
- d) A análise por Western blotting das serina e treonina-fosfatases de *D. similis*, previamente exposta a poluentes, poderia detectar mais precisamente qual grupo de fosfatases são sensíveis aos contaminantes.
- e) A alteração da atividade enzimática pelo efeito combinatório de poluentes reforça a justificativa sobre a realização de futuros estudos de efeito de misturas de contaminantes ambientais em sistemas enzimáticos de organismos não-alvo, tanto *in vitro* como *in vivo*.

VII. REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), 2004.
- Abreu, C.A; Lopes, A.S.; Santos, G.C.G. Micronutrientes. *In: Novais, R.F.; Alvarez, V.H.; Fontes, R.L.F.; Cantarutti, R.B.; Neves, J.C.L (Eds). Fertilidade do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 645-736, 2007.
- Adam, O.; Badot, P.M.; Degiorgi, F.; Crini, G. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 441–449, 2009.
- Adams, S.M. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. *American Fisheries Society, Bethesda, Maryland*, 2002.
- Allan, I.J.; Vrana, B.; Greenwood, R.; Mills, G.A.; Roig, B.; Gonzales, C. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69: 302–322, 2006.
- Arun, S.; Subramanian, P. Cytochrome P450 and other biotransformation activity in aquatic organisms: potential biomarkers to environmental pollution. *In: Tripathi, G., Kumar, A. (Eds.), Potentials of Living Resources*. Discovery Publishers, New Delhi, 459–488, 2003.
- ATSDR. Agência de Registro para Substâncias Tóxicas e Doenças. 2007. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>. Acesso em: 18 set 2009.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem Physiol. C* 140: 175-186, 2005.
- Barata, C.; Markich, S.J.; Baird, D.J.; Soares, A.M.V.M. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicol* 61: 143–154, 2002.
- Barata, C., Baird, D.J., Miñarro, A. and Soares, A.M.V.M. Do genotype responses always converge from lethal to non-lethal toxicant exposure levels? A hypothesis tested using laboratory *Daphnia magna* Straus clones. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2314-2322, 2000.
- Barghigiani, G.; Pellegrini, D.; D’Ulivo, A.; Ranieri, S. Mercury assessment and its relation to selenium levels in edible species of northern Tyrrhenian Sea. *Marine Poll. Bull*, 22: 406-409, 1991.

- Barret, J.C.; Vainio, H.; Peakall, D.; Goldstein, B.D. 12 Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, 105: 699-737, 1997.
- Barros, L.S.S.; Amaral, L.A.; Lorenzon, C.S. *Daphnia magna* – bio-indicator of pollution from poultry and pig abattoir effluents. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 8: 217-228, 2007.
- Bellotto, V.R.; Miekeley, N. Bioacumulação de metais-traço (Cd, Cu, Mn, Pb) no mexilhão *Perna perna* para exposições de curta duração: Influência da concentração de metais na água do mar. *In: VI Encontro de Ecotoxicologia*, São Carlos, 91, 2000.
- Bennum, A.; Blum, J.J. Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 128: 106-123, 1966.
- Bhavan, P.S.; Geraldine, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcomsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicol.* 50: 331-339, 2000.
- Bianchini, A. Avaliação dos efeitos de poluentes característicos de regiões estuarinas em processos fisiológicos de invertebrados aquáticos. 2000. Disponível em: <http://www.octopus.furg.br/pesquisa/Projetos/polinvert.htm>. Acesso 10 jan 2008.
- Bittl, T.; Vrba, J.; Nedoma, J.; Kopáček, J. Impact of ionic aluminium on extracellular phosphatases in acidified lakes. *Environ. Microbiol* 3: 578±587, 2001.
- Blom, J.F.; Jüttner, F. High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity. *Toxicon* 46: 465-470, 2005.
- Boavida, M.J.; Heath, R.T. Are the phosphatases released by *Daphnia magna* components of its food? *Limnol. Oceanogr.* 29: 641-645, 1984.
- Borgeraas, J.; Hesssen, D.O. Variations of antioxidants enzymes in *Daphnya* species and populations as related to ambient UV exposure. *Hydrobiol.* 477: 15-30. 2002.
- Borges, A.; Scotti, L.V.; Siqueira, D.R.; Zanini, R.; Amaral, F.; Jurinitz, D.F.; Wassermann, G.F. Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere* 69: 920-926, 2007.
- Bou-Olayan, A.; Al-Mattar, S.; Alyakoob, S.; Al-Hazeem, S.; Marine Pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 211-214, 1995.
- Brasher, A.M.; Ogle, R.S.. Comparative toxicity of selenite and selenate to the amphipod *Hyaella azteca*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 182–186, 1993.
- Brix, K.V.; Henderson, D.G.; Adams, W.J.; Reash, R.B.; Carlton, R.G.; McIntyre, D.O. Acute toxicity of sodium selenate to two daphnids and three amphipods. *Environ Toxicol* 16: 142-150, 2001.
- Brooks, J.L. Cladocera. *In: Edmondson, W.T. (ed.). Fresh water biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1247p. (2 ed.), 1959.

- Brusca, R.C.; Brusca, G.J. *Invertebrates*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 922p., 1990.
- Burjassot, R.S.A. Toxicidad y acumulación de cádmio en poblaciones de diferentes especies de *Artemia*. *Tese de Doutorado em Ciências Biológicas*, Universidade de Valencia, 2002.
- Carillo-Castaneda, G., Ortega, M.V. Effect of inorganic phosphate upon *Salmonella typhimurium* phosphatase activity: non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 146: 535-543, 1967.
- Casini, S.; Depledge, M.H. Influence of copper, zinc and iron on cadmium accumulation in the Talitrid Amphipod, *Platochestia platensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 500-506, 1997.
- Cavagis, A.D.M.; Ferreira, C.V.; Versteeg, H.H.; Assis, C.F.; Bos, C.L.; Bleuming, S.A.; Diks, S.H.; Aoyama, H.; Peppelenbosch M.P. Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukaemia cells through diminished survival signalling. *Experim. Hematol.*, 34: 188-196, 2006.
- Cavagis, A.D.M.; Granjeiro, P.A.; Ferreira, C.V.; Aoyama, H.. Effect of chaotropic agents on reversible unfolding of a soybean (*Glycine max*) seed acid phosphatase. *Phytochem.*, 65: 831-836, 2004.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Água - teste de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea): método de ensaio*. 25p., 1994.
- Chaimovich, H.; Nome, F. Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. *Arch Biochem. Biophys.*, 139: 9-16, 1970.
- Chang, B. Developing an aquatic toxicity biomarker using hemoglobin gene expression. 2003. <http://socrates.berkeley.edu/~es196/projects/2003final/Chang.pdf>. Acesso: 13 jan 2008.
- Chapman, P.M. Whole effluent toxicity testing: Usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environm, Toxicol. Chem.* 19: 3-13, 2000.
- Chawla, G.; Viswanathan, P.N.; Devi, S. Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture. *Environ. Exp. Bot.* 27: 311-323, 1987.
- Coen, W.M.; Janssen, C.R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. II Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere*, 35: 1053-1067, 1997.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005.
- Czuczwar, M.; Kis, J.; Potasinski, A.; Turski, W., A.; Przesmycki, K. Isobolographic analysis of interaction between vigabatrin and baclofen in the formalin test in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 53: 527-530, 2001.

- Damáσιο, J.; Guilhermino, L.; Soares, A.M.V.D.; Riva, M.C.; Barata, C. Biochemical mechanism of resistance in *Daphnia magna* exposed to the insecticide fenitrothion. *Chemosphere* 70: 74-82, 2007.
- Das, B.,K.; Mukherjee, S.,C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 134: 109–121, 2003.
- De Conto Cinier, C.; Petit-Ramel, R.; Faure, R.; Bortolato, M. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 793-799, 1998.
- Depledge, M.H. The rationale for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Nondestructive biomarkers in vertebrates. Fossie, M.C.; Leonzio, C. (eds) Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 271-285, 1993.
- Diamantino, T.C.; Guilhermino, L.; Almeida, E.; Soares, A.M.V.M. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol. Environm Safety* 45: 253-259, 2000.
- Dietz, R.; Riget, F.; Born, E.W. An assessment of selenium to mercury in Greenland marine animals. *The Science of the Total Environment*, 245: 15-24, 2000.
- Dixon, M., Webb, E.C. *Enzymes*. Longmans, London, PP. 3 ed. 332-399, 1979.
- Domingo, J. L.; Gomez, M.; Liobet, J. M.; Corbella, J. Citric, malic and succinic acids as possible alternatives to deferoxamine in aluminium toxicity. *Clin. Toxicol.* 26, 67-79, 1988.
- Dores, E.F.G.C.; Freire, E.M.D.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas, estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Quim. Nova*, 24: 27-36, 2001.
- Driscoll, C.T.; K.M. Postek. The chemistry of aluminum in surface waters. In: Sposito, G. (red.) *The Environmental Chemistry of Aluminum*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 343-418, 1996.
- Dubale, M.,S.; Shah, P. Biochemical alterations induced by cadmium in the liver of *Channa punctatus*. *Environ Res.* 26: 110-118, 1981.
- Durou, C.; Poirier, L.; Amiard, J.C.; Budzinski, H.; Gnassia-Barelli, M.; Lemenach, K.; Peluhet, L.; Mouneyrac, C.; Romeo, M.; Amiard-Triquet, C. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.* 148: 445– 458, 2007.
- Eaton, J.G. Chronic toxicity of a copper, cadmium, and zinc mixture to the fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Water Res* 7: 1723-1736, 1973.

- Ebert D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>. Acesso em 13 nov 2007.
- EL Demerdash, F.M.; Elagamy, E.I. Biological effects in *Tilapia nilotica* fish as indicators of pollution by cadmium and mercury. *Int. J. Environm. Health Res.* 9: 173-186, 1999.
- Exley, C.; Burgess, E.; Day, J. P.; Jeery, E. H.; Melethil, S.; Yokel, R. A. Aluminium toxicokinetics. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 569-584, 1996.
- Exttoxnet. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles, 1996. Disponível em: <http://exttoxnet.orst.edu/pips/permethr.htm>. Acesso em: 12 dez 2009.
- Felten, V.; Charmantier, G.; Mons, R.; Geffard, A.; Rousselle, A.; Coquery, M.; Garric, J.; Geffard, O. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86: 413-425, 2008.
- Ferreira, A.G.; Machado, A.L.S.; Zalmon, I.R. Metais pesados em moluscos bivalves no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. *In: Espindola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C; Oliveira-Neto, A.L. Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. Rima: São Carlos, SP, 2000, 575p..
- Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 487-494, 1998.
- Ferreira, C.V. Purificação e caracterização das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes. *Tese de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular*. Instituto de Biologia, UNICAMP, 1995.
- Finlayson, B.J.; Verrue, K.M. Toxicities of copper, zinc, and cadmium mixtures to juvenile Chinook salmon. *Trans Am Fish Soc* 111: 645-650, 1982.
- Freire, A.C. Papel de fosfatases na viabilidade de células da leucemia mielóide humana tratadas com diterpeno lactona. *Tese de Doutorado em Biologia Funcional e Molecular*. Instituto de Biologia. UNICAMP, 2002.
- Fulladosa, E.; Murat, J-C.; Villaescusa, I. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bactéria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 58: 551-557, 2005.
- Galgani, F.; Bocquené, G. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Res.* 25: 147-150, 1991.
- Galindo-Reyes, J.G.; Medina, J.A.; Villagrana-Lizarraga, C. Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. *Marine Pollution Bull.* 32: 872, 875, 1996.

- Galindo-Reyes, J.G.; Dalla Venezia, L.; Lazcano-Alvarez, G.; Rivas-Mendoza, H. Enzymatic and osmoregulative alterations in White shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere*. 40: 233-237, 2000.
- Galindo-Reyes, J.G.; Dalla Venezia, L.; Lazcano-Alvarez, G. Effect of some organophosphorus pesticides on oxygen consumption of shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 134-136, 2002.
- Gambin, F.; Bogé, G.; Jamet, D. Alkaline phosphatase in a littoral Mediterranean marine ecosystem: role of the main plankton size classes. *Marine Environ. Res.* 47: 441-456, 1999.
- Ganghi, S.R. Comparative effects of synthetic insecticides - Endosulfan, Phosalone and Permethrin on *Chlamydomonas reinhardtii* Algal Cells. *Acta Microbiol. Hung.*, 35: 1988.
- Gastaldi, L.; Ranzato, E.; Capri, F.; Hankard, P.; Pérès, G.; Canesi, L.; Viarengo, A.; Pons, G. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sub-lethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei*. *Comp. Biochem. Physiol Part C* 146: 398-405, 2007.
- Gensemer, R.W.; Playle, R.C. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments Critical. *Crit. Rev. Environm. Sci. Technol*, 29: 315-450, 1999.
- Gikas, P. Kinetic responses of activated sludge to individual and joint nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)): an isobolographic approach. *J. Hazard. Mater.* 143: 246-256, 2007.
- Gill, T.S.; Pande, J.; Tewari, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. *Pest. Biochem. Physiol.* 38: 231-244, 1990a.
- Gill, T.S.; Tewari, H.; Pande, J. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality : effects of mercury in tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 97: 287-292, 1990b.
- Gillespie, R.B.; Baumann, P., C. Effects of high tissue concentrations of selenium on reproduction by bluegills. *Trans. Amer. Fisheries Soc.*, 115: 208-213, 1986.
- Gjessing, E.T.; Riise, G.; Petersen, R.C.; Andruchon, E. Bioavailability of aluminium in the presence of humic substances at low and moderate pH. *Sci. Tot. Environ.* 81, 82, 683-690, 1989.
- Goes, R.C. *Toxicologia industrial*. Revinter Ltda. Rio de Janeiro, 1998, 250p.
- Gomes, M. A. F.; Spadotto, C. A.; Lanchotte, V. L. Ocorrência do herbicida tebuthiuron na água subterrânea da microbacia do córrego Espreado, Ribeirão Preto – SP. *Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Amb.* 11: 65, 2001.
- Gonçalves, M.A. Purificação parcial e caracterização de fosfatases ácidas de fígado de cação (*Rizoprionodon lalandei*). *Tese de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular*. Instituto de Biologia, UNICAMP, 2000.
- Goulet, R.R.; Krack, S.; Doyle, P.J.; Hare, L.; Vigneault, B.; Mcgeer, J.C. Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposures. *Aquat. Toxicol.* 81: 117-125, 2007.

- Granjeiro, J.M. Purificação e caracterização da fosfatase ácida de rim bovino. *Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular*. Instituto de Biologia, UNICAMP, 1994.
- Granjeiro, J.M.; Ferreira, C.V.; Jucá, M.B.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN – dependent kinetics. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41: 1201-1208, 1997.
- Granjeiro, P.A.; Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Physiol. Plant.* 107: 151-158, 1999.
- Guan R.; Wang W.X. Multiphase biokinetic modeling of cadmium accumulation in *Daphnia magna* from dietary and aqueous sources. *Environ Toxicol Chem* 25: 2840-2846, 2006.
- Gümgüm, B.; Ünlü, E.; Tez, Z.; Gülsün, Z. Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris River in Turkey. *Chemosphere*, 29: 111-116, 1994.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Silva, M.C.; Soares, A.M. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 46: 357-362, 2000a.
- Guilhermino, L.; Lacerda, M.N.; Nogueira, A.J.A.; Soares, A.M.V.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total Environ.* 247: 137-141, 2000b.
- Guilhermino, L.; Lopez, M.C.; Carvalho, A.P.; Soares, A.M.V.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 32; 727-738, 1996.
- Haap,T.; Köhler, H-R. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicol.* 94: 131–137, 2009.
- Hamilton, S. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment* 326: 1–31, 2004.
- Hamilton, S.J. Selenium effects on endangered fish in the Colorado River basin. In: Frankenberger Jr WT, Engberg RA. *Sci Total Environm*. New York: Marcel Dekker, 297-313, 1998.
- Hartree, E.F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427, 1972.
- Haux, C.; Forlin, L. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*,17: 376, 1988.
- Havas, M. A hematoxylin staining technique to locate sites of aluminum binding in aquatic plants and animals. *Wat. Air Soil Pollut.* 30: 735–741, 1986.

- Havas, M. Aluminium bioaccumulation and toxicity to *Daphnia magna* in soft water at low pH. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42: 1741–1748, 1985.
- Heath RT. Dissolved organic phosphorus compounds: do they satisfy planktonic phosphate demand in summer? *Can J Fish Aquat Sci* 43:343–350, 1986.
- Heckmann, L.H.; Callaghan, A.; Hooper, H.L.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicol Lett.* 172: 137-45, 2007.
- Heo, Y-S; Ryu, J.M., Park, S.M., Park, J.H., Lee, H-C, Hwang, K.Y., Kim, J. Structural basis for inhibition of protein tyrosine phosphatases by Keggin compounds phosphomolybdate and phosphotungstate. *Exp. Mol. Med.*, 34: 211-223, 2002.
- Hoang, T.C.; Klaine, S.J. Characterizing the toxicity of pulsed selenium exposure to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 71: 429–438, 2008.
- Hodson, P.,V.; Hilton, J.,W. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecol. Bull.*, 35: 335-340, 1983.
- Holter, H.; Lowy, B.A. A study of the properties and localization of acid phosphatase in the amoeba *Chaos chaos* L. *Comptes rendus des travaux laboratoire Carlsberg* 31:105-127, 1959.
- Howells, G.; Dalziel, T.R.K.; Readar, J.P.; Solbe, J.F. Water quality criteria for European freshwater fish: report on aluminum. *Chem. Ecol.* 4: 117-173, 1990.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J; Pickford, D.B. Acute and chronic effects of carrier in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76:69-92, 2006.
- Inácio, A.F. Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- IMOA. International Molybdenum Association, 2009. Disponível em: http://www.imoa.info/HSE/environmental_data/experimental/fish.html. Acesso em: 27 set 2009.
- IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Disponível em: <https://www.ipen.br/sitio/?idc=388>. 2006. Acesso em: 10 out 2009.
- Iwana, G.; Nakanishi, T. *The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press. v. 15. San Diego, Califórnia, 1996.
- Jansson, M. Induction of high phosphatase activity by aluminum in acid lakes. *Arch Hydrobiol*, 93: 32±44, 1981.
- Jansson, M.; Olsson, H.; Petterson, K. Phosphatases: characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170: 157-175, 1988.
- Jardim, G.M. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. *Tese de Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas*. ESALQ, 2004.

- Jean, N.; Bogé, G.; Jamet, J.; Richard, S.; Jamet, D. Seasonal changes in zooplanktonic alkaline phosphate activity in Toulon Bay (France): the role of Cypris larvae. *Marine Pollut. Bull.*, 46: 346-352, 2003.
- Jekel, M. R. Interactions of humic acids and aluminium salts in the flocculation process. *Wat. Res.* 20, 1535-1542, 1986.
- Jemec, A.; Drobne, D.; Tisler, T.; Trebse, P.; Ros, M.; Sepcic, K. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 144: 303-309, 2007.
- Jemec, A.; Tisler, T.; Drobne, D.; Sepcic, K.; Jamnik, P.; Ros, M. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 147: 61-68, 2008.
- Johal, M.S.; Sandhu, G.S.; Kaur, R. Effect of fenvalerate on acid and alkaline phosphatase activity in certain tissues of *Heteropneustes fossilis*. *Poll. Res.* 21: 309–313, 2002.
- Johnston, P.A. Acute toxicity of inorganic selenium to *Daphnia magna* (Straus) and the effect of sub-acute exposure upon growth and reproduction. *Aquatic Toxicol.*: 10: 335-352, 1987.
- Johnston, P.A. Morphological changes in *Daphnia magna* (Straus) exposed to inorganic selenium as sodium selenate. *Aquatic Toxicology*, 14: 95,107, 1989.
- Jonsson, C.M.; Aoyama, H. Effect of copper on the activation of the acid phosphatase from the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *BioMetals* 23: 93-98, 2010.
- Jonsson, C.M.; Aoyama, H. Extraction, partial characterization and susceptibility to Hg²⁺ of acid phosphatase from the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Scientia Agricola* 66: 634-642, 2009.
- Jonsson, C.M., Paraiba, L.C, Aoyama, H. Metals and linear alkylbenzene sulphonate as inhibitors of the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase activity. *Ecotoxicology* 18: 610-619, 2009.
- Jonsson, C.M., Aoyama, H. *In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. *Chemosphere* 69: 849-855, 2007.
- 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., Maia, A.H.N. Toxicidade dos herbicidas clomazone e quinclorac para o invertebrado aquático *Daphnia similis* na presença e ausência de sedimento. *Pestic. Ecotoxicol. Meio Amb.* 9: 145-153, 1999.

- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. Trace elements in soil and plants. 4a ed., Boca Raton, CRC Press, 2000. 331p.
- Kamo, M.; Nagai, T. An application of the biotic ligand model to predict the toxic effects of metal mixtures. *Env. Toxicol. Chem.* 27: 1479-1487, 2008.
- Karadede, H.; Ünlü, E. Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere*, 41: 1371-1376, 2000.
- Khan, M.A.K; Wang, F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understandin of the mercuri-selenium antagonism. *Env. Toxicol. Chem.* 28: 1567-1577, 2009.
- Khargarot, 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.* 70: 112-117, 2003.
- Khargarot, B.S.; P.K. Ray. Investigation of correlation between physiochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol.* 18: 109-120, 1989.
- Kidd, H.; James, D. R., Eds. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- Kölbl, G. Concepts for the identification and determination of selenium compounds in the aquatic environment. *Marine Chem.*, 48: 185-197, 1995.
- Krauskopf, K.B. Geochemistry of micronutrients. In: Mortvedt, J.J.;Giordano, P.M.; Lindsay, W.L. (eds). *Micronutrients in agriculture*. Madison, *Soil Sci. Amer.*, p.7-40, 1972.
- Kumar, K.; Ansari, B.A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Ecotoxicol. Environm. Safety*, 12: 199-205, 1986.
- Kwang, -S. B.; Larry L. B. Alkaline Phosphatase and Other Hydrolyases Produced by *Cenococcum graniforme*, an Ectomycorrhizal Fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2511-2516, 1989.
- Lampert, W. *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish J. Ecol.* 54: 607-620, 2006.
- Larini, L. *Toxicologia dos Praguicidas*. São Paulo. Editora Manole Ltda, 1 ed., 1999, 230 p.
- Lasman, M. Observation on acid phosphatase in *Mayorella palestinesis*. *J. Cell. Physiol.* 69: 151-154, 1967.
- Lemly, A.D. A teratogenic deformity index for evaluating impacts of selenium on fish populations. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 37: 259-266, 1997.
- Leonzio, C.; Fossi, M.C. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. In: Fossi, M.C.; Leonzio, C. (eds) *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, London, 297-312, 1993.

- Lespilette, M.; Bogé, G.; Richard, S.; Jamet, J.L. Origin and characteristics of the zooplankton phosphatase activity in a coastal ecosystem of the Mediterranean sea (Toulon Bay). *Marine Environ. Res.* 63: 445-456, 2007.
- Liang, Y.; Cheung, R.Y.H; Wong, M.H. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Wat. Res.*, 33: 2690-2700, 1999.
- Lien, T.; Knutsen, G. Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: Properties and regulation of repressible phosphatases. *Physiol. Plant* 28: 291-298, 1973.
- Lima, M.A.B. Aspectos fisiológicos do efeito do cádmio em *Cunninghamella elegans*: mecanismos de tolerância, capacidade de sorção e acumulação de polifosfato. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.
- Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666, 1934.
- Lionetto, M.G.; Giordano, M.E.; Vilella, S.; Schettino T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat Toxicol.* 48: 561-57, 2000.
- Locke, A. Zooplankton responses to acidification: a review of laboratory bioassays. *Wat. Air Soil Pollut.* 60: 135-148, 1991.
- López, L.; Pozo, C.; Calvo, R.C.; López, J.G. Influence of pesticides and herbicides presence on phosphatase activity and selected bacterial microbiota of a natural lake system. *Ecotoxicology*, 15: 487-493, 2006.
- Lowry, O.H.; Lopez, J.A. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 162: 421-424, 1945.
- Lund, S.A.; Fulton, M.H., Key, P.B. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. *Aquatic toxicology*, 48: 127-134, 2000.
- Mackie, G.L. Tolerances of five benthic invertebrates to hydrogen ions and metals (Cd, Pb, Al). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 215-223, 1989.
- Mackintosh, C.; Mackintosh, R.W. Inhibition of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 17: 444-447, 1994.
- Maier, K.J.; Foe, C.G.; Knight, A.W. Comparative toxicity of selenate, selenite, seleno-DL-methionine, and seleno-DL-cystine to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12 755-763, 1993.
- Marking, L.L. Toxicity of chemical mixtures. In: Rand, G.,M.; Petrocelli, S.,R. (eds.). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 164-176, 1985.

- Masutti, M.B.; Panitz, C.M.N; Pereira, N.C. Biodisponibilidade e bioconcentração de metais-traço no manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC). *In: Espindola, E.L.G. Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. Rima, São Carlos, SP, 207-219, 2000.
- Matagne, R.F.; Loppes, R.; Deltour, R. Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi*: Biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *J. Bacteriol.* 126: 937-950, 1976.
- Mattos, L. M.; Silva, E. F.; *Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Amb.* 9: 103, 1999.
- Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; Mckee, M.J.; Folmar, L.C.; Franey, R.L.; Mccume, D.C.; Rattner, B.A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Biomarkers: Physiological and histological markers of anthropogenic stress. Huggett, R.J.; Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.; Bergman, H.L. (eds). Lewis, Boca Raton, FL, 5-86, 1992.
- Mazzei, F.; Botre, F.; Botre, C. Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. *Anal. Chim. Acta*, 336: 67-75, 1996.
- McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. *Biological markers of environmental*. Boca Raton: Lewis Publishers. 3-16, 1990.
- McNeal, J. M.; Balistrieri, L. S. Geochemistry and Occurrence of Selenium: An Overview, in "Selenium in Agriculture and the Environment", SSSA Special Publication 23, Chapter 1, *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, WI, USA, 1989.
- Mello, G.L. Toxicidade de dois agroquímicos utilizados no cultivo de arroz irrigado em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. *Tese de Mestrado em Aqüicultura*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- Melo, G. M. P.; Melo, V. P.; Melo, W. J. . Uso de lodo de esgoto na agricultura e impacto ambiental por metais pesados. In: Melo, W.J; Melo, G.P.; Melo, V.P. *Uso de lodo de esgoto na agricultura*. CONAMA: Brasília, 2004, v. único.
- Menten, J.O. Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas – Andef. Evolução do consumo de agrotóxicos no Brasil, 2008.
- Murty, A. S. Pesticides in the environment. In: MURTY, A. S. *Toxicity of pesticides to fish*. v.1, CRC Press, Boca Raton. p.1-36, 1986.
- Nakagi, V.S. Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*. *Tese de Mestrado em Microbiologia*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp. 2007.
- Nakazato, H.; Okamoto, T.; Ishikawa, K.; Okuyama, H. Purification and characterization of phosphatase inducibly synthesized in *Spirodela oligorrhiza* grown under phosphate-deficient conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 437-446, 1997.

- Nalewajko, C.; Paul, B. Effects of manipulations of aluminum concentrations and pH on phosphorus uptake and photosynthesis of planktonic communities in two Precambrian Shield lakes. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1946–1953, 1985.
- Neuman, H. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 243: 4671-4676, 1968.
- Nriagu, J. O. *Global Cycling of Selenium*, Chapter 13 In: “Occurrence and Distribution of Selenium”, *Inhat. M.* (Ed), CRC Press, Boca Raton, 1989.
- OECD. *Guidelines for Testing of Chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test*, 202. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.
- Ohlendorf, H. M. *Selenium in Waterfowl: The Kesterson Experience*. Proceedings, Selenium in the Environment: Essential Nutrient, Potential Toxicant. University of California, Davis, 11-19, 1995.
- Ohlendorf, H. M. “Selenium in Agriculture and the Environment”, Jacobs, L. M. Soil Science Society of America, Inc. and *American Society of Agronomy*, Inc., 133-171, 1989.
- Oliveira, A.C. Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae). *Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental*. Universidade de São Paulo, 2007.
- Ormerod, S. J.; Boole, P.; McCahon, C. P.; Weatherley, N. S.; Pascoe, D.; Edwards, R. W. Short-term experimental acidification of a Welsh stream: comparing the biological effects of hydrogen ions and aluminium. *Fresh. Biol.* 17, 341–356, 1987.
- Palaniappan, P.L.R.M.; Karthikeyan, S. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *J. Environ. Sci.* 21: 229–236, 2009.
- Palmisano, F.; Cardellicchio, N.; Zambonin, P.G. Speciation of mercury in dolphin liver. A two-stage for the demethylation accumulation process and role of selenium. *Marine Environ. Res.*, 40: 109-121, 1995.
- Parent, L.; Campbell, P.G.C. Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 587–598, 1994.
- Parthasarathi, K.; Karuppasamy, R. Fenvalerate impact on tissue acid and alkaline phosphatase activity of the fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Poll. Res.* 17: 281–285, 1998.
- Patni, N.J.; Aaronson, S. Partial characterization of the intra- and extracellular acid phosphatase of an alga, *Ochromonas danica*. *J. Gen. Microbiol.* 83: 9-20, 1974.
- Payne, J.F.; Fancey, L.; Rahimtula, A.; Porter, E. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 86: 233, 1987.

- Penttinen, S.; Kukkonen, J.; Oikari, A. The kinetics of cadmium in *Daphnia magna* as affected by humic substances and water hardness. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30: 72-76, 1995.
- Petersen, E.J.; Akkanen, J.; Kukkonen, J.V.; Weber, W.J. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia Magna*. *Environ Sci Technol.* 43(8):2969-75, 2009.
- Pimpão, C.T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico. *Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos*. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- Presser, T.S.; Sylvester, M.A.; Low, W.H. Bioaccumulation of selenium from natural geologic sources in Western states and its potential consequences. *Environ. Manage*, 18; 423-436, 1994.
- 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*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, v.2., 2 ed., 2465-2510, 1979.
- Rahman, M.F.; Mahboob, M.; Gover, P. *In vitro* acetylcholinesterase inhibition by novel OP compounds in various tissues of the fish *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 38-44, 2004.
- Rand, G.M.; Wells, P.G.; Mccarty, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Taylor & Francis: Washington, USA, 2 ed, 3-67, 1995.
- Reddy , M. S.; Jayaprada, P.; Rao, R. Toxic impact of aldrin on acid and alkaline phosphatase activity of Penaeid prawn , *Metapenaeus monoceros*: in vitro study. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 46: 479-484, 1991.
- Reddy, M.S.; Rao, R. Methylparathion induced alterations in the acetylcholinesterase and phosphatases in a penaeid prawn *Metapenaeus monoceros*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 45: 350-357, 1990.
- Repetto, G.; Peso, A.D.; Repetto, M. Alternative ecotoxicological methods for the evaluation, control and monitoring of environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Restoration* 31: 47-51, 2000.
- Ribeiro, M.L.; Lourencetti, C.; Pereira, S.Y.; Marchi, M.R.R. Contaminação de Águas Subterrâneas por Pesticidas: Avaliação Preliminar. *Quim. Nova*, 30: 688-694, 2007.
- Rocha, O.; Güntzel, A. Filo Arthropoda. Classe Branchiopoda. In: Ismael, D.; Valenti, W.C.; Matsumura-Tundisi, T.; Rocha, O. (Ed.) 1999. *Invertebrados de Água Doce*. São Paulo, FAPESP. 176p. (vol. 4 da coleção "Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX", organizada por Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M). Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v4cap17.pdf>. Acesso em 10 set 2009.

- Rodrigues, L.C. *Estudo das Glutation S-Transferases Hepáticas Solúveis do Peixe Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Pacu)*. Tese Doutorado, Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes / UERJ, Rio de Janeiro, RJ, 2003.
- Rodriguez, P.; Martinez-Madrid, M.; Cid, A. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol.* 15: 559-72, 2006.
- Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *J. Chromatogr.* 885: 217-236, 2000.
- Saeed, A.; Tremori, E.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ramponi, G. Bovine brain low Mr acid phosphatase: purification and properties. *Physiol. Chem. Phys. & Med.* 22: 81-94, 1990.
- Saha, S.; Kaviraj, A. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Chemosphere* 74: 1254-1259, 2009.
- Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G.R. Piretróides - Uma visão geral. *Alim. Nutr.*, 18: 339-349, 2007.
- Sauvant, M.P.; Pepin, D.; Guillot, J. Effects of humic substances and phenolic compounds on the in vitro toxicity of aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 47-55, 1999.
- Schimmel, S. C. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthio carb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.* 31: 399-407, 1983.
- Schultz, T.W.; Freeman, S.R.; Dumont, J.N. Uptake, depuration, and distribution of selenium in *Daphnia* and its effects on survival and ultrastructure. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 9: 23-40, 1979.
- Séby, F.; Potin-Gautier, M.; Giffaut, E.; Borge, G.; Donard, O.F.X. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25 °C. *Chem. Geol.*, 171: 173-194, 2001.
- Şentürk, M.; Ceyhun, S.B.; Erdoğan, O.; Küfrevioğlu, O.I. *In vitro* and *in vivo* effects of some pesticides on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95: 95-99, 2009.
- Seixas, T.G. Selênio total em tecidos de quatro diferentes organismos marinhos da Baía de Guanabara, RJ, Brasil. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Química, PUC, Rio de Janeiro, 2004.

- Shaw, J.R.; Colbourne, J.K.; Davey, J.C.; Glaholt, S.P.; Hampton, T. H.; Chen, C.Y.; Folt, C.L.; Hamilton, J.W. Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics*. 8:477, 2007.
- Silva, A.M. Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos. *Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais*. IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2005.
- Silva, I.F.T.M.S. Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo. *Tese de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular*. UNICAMP, 2000.
- Skladal, P.; Fiala, M.; Krejci, J. Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 65: 139-148, 1996.
- Skorupa, J.P. Selenium poisoning of fish and wildlife in nature: lessons from twelve real-world examples. In: Frankenberger Jr WT, Engberg RA, editors. *Environmental chemistry of selenium*. New York: Marcel Dekker, 315-354, 1998.
- Sorvari, J.; Sillanpää, M. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere* 33 (6): 1119-1127, 1996.
- Sparling, D. W.; Lowe, T. P.; Campbell, P. G. C. Ecotoxicology of aluminum to fish and wildlife. In: *Research Issues in Aluminum Toxicity*, pp. 47–68. (Yokel, R. A. and Golub, M. S., Eds.) Washington, D.C., Taylor & Francis, 1997.
- Sparling, D. W.; Lowe, T. P. Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 145, 1–127, 1996.
- Sprague, J.B.; Ramsay, B.A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J Fish Res Board Can* 22: 425-432, 1965.
- Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Di Guilio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects. In: Huggett,R.J.; Kimerle, R.A .; Mehrle, J. and Bergman, H.L. Eds. *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.*, Lewis Publishers, Colorado, 235p., 1992.
- Stohs, S.J.; Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal-Ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18:321-336, 1995.
- Stumm, W.; Morgan, J., J. *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters* 2 ed. John Wiley & Sons, NY. 1981, 780 p.

- Svendsen, C.; Spurgeon, D.J.; Hankard, P.K.; Weeks, J.M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 20–29, 2004.
- Szczerbik, P.; Mikolajczyk, T., Sokolowska-Mikolajczyk, M.; Socha, M.; Chyb, J.; Epler, P. Influence of long-term exposure to dietary cadmium on growth, maturation and reproduction of goldfish (subspecies: *Prussian carp Carassius auratus gibelio B.*) *Aquat. Toxicol.* In Press, 2006.
- Tabela Periódica On Line, 2008. Disponível em: <http://www.tabela.oxigenio.com/>. Acesso em: 17 set 2009.
- Tadeo, J.; Sanchez-Brunette, C.; Pérez, R.; Fernández, M. Analysis of herbicides residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromat A* 882: 175- 191, 2000.
- Teles, L.T.; Zara, L.F.; Furlanetto, U.L.R.; Junior, N.J.S. Elementos traço em peixes de interesse comercial do Rio Caiapó (Goiás, Brasil) em área sob impacto ambiental. *Estudos*, Goiânia, 35 (11/12): 1055-1067, 2008.
- Thorp, V.J.; Lake, P.S. Toxicity bioassays of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp, *Paratya tasmaniensis* riek. *Aust. J. mar. Freswat. Res.* 25: 97-104, 1974.
- Tsuda, T.; Aoki, S.; Inoue, T.; Kojima, M. Accumulation and excretion of diazinon, fenthion and fenitrothion by killfish: comparison of individual and mixed pesticides. *Water Res.* 29: 455-458, 1995.
- Tsutiya, Milton Tomoyuki. Metais pesados: O principal fator limitante para o uso agrícola de bio-sólidos das estações de tratamento de esgotos. 2006. In: 20º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro. Disponível em: <www.ceset.unicamp.br/~mariaacm/ST108/I-140-Metais%20Pesados.doc>. Acesso em: 10 out 2009.
- Vega, M.P.; Pizarro, R.A. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 54: 121-125, 2000.
- Verboost P.M.; Flik G.; Lock, R.A.C.; Bonga, S.E.W. Cadmium inhibits plasma-membrane calcium-transport. *J. Membr. Biol.* 102:97-104, 1988.
- Verjee, Z.H.M. Isolation of three acid phosphatases from wheat germ. *Eur.J. Biochem.* 9: 439-444, 1969.
- Viran, R.; Erkoç, F.Ü.; Polat, H.; Koçak, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 82-85, 2003.

- Wang, C.L.; Michels, P.C.; Dawson, S.C.; Kitisakkul, S.; Barros, J.A.; Keasling, J.D.; Clark, D.S.; Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4075-4078; 1997.
- Weltje, L. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere* 36 (12); 2643-2660, 1998.
- WFLEABASE: Daphnia water flea, genome database, 2007. Disponível em: <http://wfleabase.org/>. Acesso em: 20 out 2009.
- WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 194. Aluminum. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva ISBN 92 4 157194 2, 1997.
- Wilson, C.; Tisdell, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol. Econ.* 39: 449-462, 2001.
- Wynne, D.; Gophen, M. Phosphatase activity in freshwater zooplankton. *Oikos* 37: 369-376, 1981.
- Wu, Y.; Lin, C.; Yuan, L. Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. *Ecol. Indicators* 7: 768-775, 2007.
- Yoshimura, H.; Endoh, Y.S. Acute toxicity to freshwater organisms of antiparasitic drugs for veterinary use. *Environ. Toxicol.*, 20: 60-65, 2005.
- Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações. Rima, 2ed., 2008. 486p.
- Zalizniak, L. The effects of selected agricultural chemicals on freshwater microalgae and cladocerans in laboratory studies, with particular emphasis on hormesis. *Tese de Doutorado em Biotecnologia e Biologia Ambiental*. RMIT Universidade, Melbourne, Austrália, 2006.
- Zarr, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 3 ed., 1996.
- Zhao, X.-F.; Liu, G.-X.; Hu, Z.-Y. Physico-chemical properties of alkaline phosphatases released by a planktonic crustacean, *Daphnia magna*. *Crustaceana*, 79: 677-689, 2006.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Preparo de água reconstituída para cultivo de *D. similis*.

Foram preparadas as seguintes soluções-estoque, dissolvendo-se os reagentes em um volume correspondente de água destilada.

Reagentes	Concentração. (g L ⁻¹)
1. CaCl ₂ .H ₂ O	14,6
2. KCl.	50
NH ₄ NO ₃	0,37
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,4
NaHCO ₃	8,4
A. Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,991
H ₃ BO ₃	5,719
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,721
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,304
KBr	0,0369
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,109
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0483
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0548
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
Na ₂ SeO ₃	0,00438
C. Na ₂ SiO ₃	0,122
NaNO ₃	0,0274
KH ₂ PO ₄	0,0143
K ₂ HPO ₄	0,0184
D. Tiamina	0,075
Biotina	0,00075

No quadro abaixo são especificados os volumes correspondentes de cada solução estoque para obtenção de 10L de água reconstituída.

Volume a preparar de água reconstituída (L)	Sol.1 (mL)	Sol.2 (mL)	Sol.A (mL)	Sol.C (mL)	Sol.D (mL)	H ₂ O destilada (mL)
10	100	100	5	100	10	9685

Anexo 2. Preparo do meio de cultura de *S. capricornutum* (OECD, 1981) para se utilizar como alimento para *D. similis*.

Foram preparadas as seguintes soluções-estoque, dissolvendo-se os reagentes em um volume correspondente de água destilada.

Reagentes	Concentração. (g L ⁻¹)
1. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
2. NaNO ₃	50
3. NH ₄ NO ₃	33
4. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5,2
5. CaCl ₂ .2H ₂ O	3,5
6. Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	5,4
7. Citrato férrico	0,6
8. Ácido cítrico monohidratado	0,6
9. Solução de elementos traço:	
H ₃ BO ₃	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
(NH ₄) ₇ MoO ₂₄ .4H ₂ O	0,018

Um volume final de meio de cultura foi preparado adicionando-se os volumes correspondentes de solução estoque a um volume definido de água destilada de 10 L, conforme quadro a seguir.

Volume final do meio de cultura	Volumes de soluções-estoque (mL)									Água Destilada (mL)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Soluções estoque										
10 Litros	100	100	100	100	100	100	100	100	10	9190

Acrescentou-se ao meio 100 mL de algas da repicagem e levou-se à estufa de germinação. O meio de cultura foi aerado com ajuda de uma bombinha de aquário através de uma pedra porosa. A solução foi mantida sob luminosidade por 10 dias e após esta data, foi colocada na geladeira até decantar. Após decantação, o líquido sobrenadante foi removido com uma mangueirinha na forma de um sifão. O líquido que ficou no fundo foi retirado do galão e centrifugado por 15 minutos a 7000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado dos tubos e a alga que restou foi lavada com uma porção de água destilada.

Anexo 3. Características gerais de alguns compostos orgânicos analisados

a) Acefato

Nome químico: O,S-dimetil acetilfosforamidotoato

Natureza química: Inseticida e acaricida sistêmico do grupo organofosforado

Informações toxicológicas: produto considerado muito perigoso (Classe II) pelo IBAMA

b) Alacloro

Nome químico: 2-cloro-2',6'-dietil-N-metoximetilacetanilida

Natureza química: herbicida do grupo cloroacetanilida

Informações toxicológicas: classificação toxicológica Classe III (pouco tóxico)

c) Aldicarbe

Nome químico: 2-metil-2-(metiltio)propionaldeído O-metilcarbamoiloxima

Natureza química: inseticida, nematicida e acaricida

Informações toxicológicas: classe toxicológica Classe I (extremamente tóxico)

d) Atrazina

Nome químico: 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

Natureza química: Herbicida do grupo químico da triazina

Informações toxicológicas: o produto é classificado pelo IBAMA como muito perigoso para o meio ambiente.

e) Benomil

Nome químico: 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

Natureza química: fungicida do grupo químico benzimidazol

Informações toxicológicas: médio a muito tóxico aos organismos aquáticos

f) Clorexidina

Nome químico: 1,6-di-(n-p-Clorofenil)-biguanido)-hexano-dihidrocloroeto

Natureza química: agente desinfetante organoclorado

Informações toxicológicas: não disponível

g) Clorpirifós

Nome químico: o,o- dietil o-3,5,6,-triclora-2-piridil fosfotioato

Natureza química: inseticida organofosforado

Informações toxicológicas: altamente tóxico aos peixes e invertebrados aquáticos

h) Deltametrina

Nome químico: (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil ester do ácido (1R,3R)-3 (2,2-dibromovinil)-2,2 dimetilciclopropano carboxílico

Natureza química: inseticida piretróide

Informações toxicológicas: altamente tóxico aos insetos aquáticos e peixes

i) Diflubenzuron

Nome químico: 1-(4-clorofenil)-3- (2,6-difluorobenzoil) uréia

Natureza química: inseticida

Informações toxicológicas: pouco tóxico aos organismos aquáticos

j) Dimetoato

Nome químico: 0,0-dimetil-S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato

Natureza química: Inseticida e acaricida organofosforado sistêmico.

Informações toxicológicas: tóxico aos invertebrados aquáticos

k) Diuron

Nome químico: 3 - (3,4 Diclorofenil) 1,1 Dimetiluréia

Natureza química: Herbicida do grupo químico da uréia.

Informações toxicológicas: moderadamente tóxico aos peixes e altamente tóxico aos organismos aquáticos

l) Endosulfan

Nome químico: 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzadioxatíepin 3-óxido

Natureza química: inseticida e acaricida do grupo químico ciclodienoclorado

Informações toxicológicas: altamente perigoso (Classe I) para o meio ambiente

m) Fenamifós

Nome químico: etil 4-metiltio-m-tolil isopropilfosforamidato

Natureza química: nematicida organofosforado

Informações toxicológicas: toxicidade moderada a alta aos organismos aquáticos

n) Procloraz

Nome químico: N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]imidazol-1-carboxamida

Natureza química: fungicida imidazolilcarboxamida

Informações toxicológicas: altamente tóxico (Classe I) ao meio ambiente

o) Simazina

Nome químico: 6-cloro-N₂,N₄-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Natureza química: herbicida do grupo da triazina

Informações toxicológicas: pouco tóxico às espécies aquáticas

p) Tiametoxam

Nome químico: 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazina-4-ilideno(nitro)amina.

Natureza química: inseticida sistêmico neonicotinóide

Informações toxicológicas: pouco tóxico ao meio ambiente (Classe III)

q) Triclorfon

Nome químico: dimetil 2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfonato

Natureza química: inseticida organofosforado

Informações toxicológicas: altamente tóxico aos invertebrados aquáticos

r) Trifluralina

Nome químico: a,a,a,-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-ptoluidina

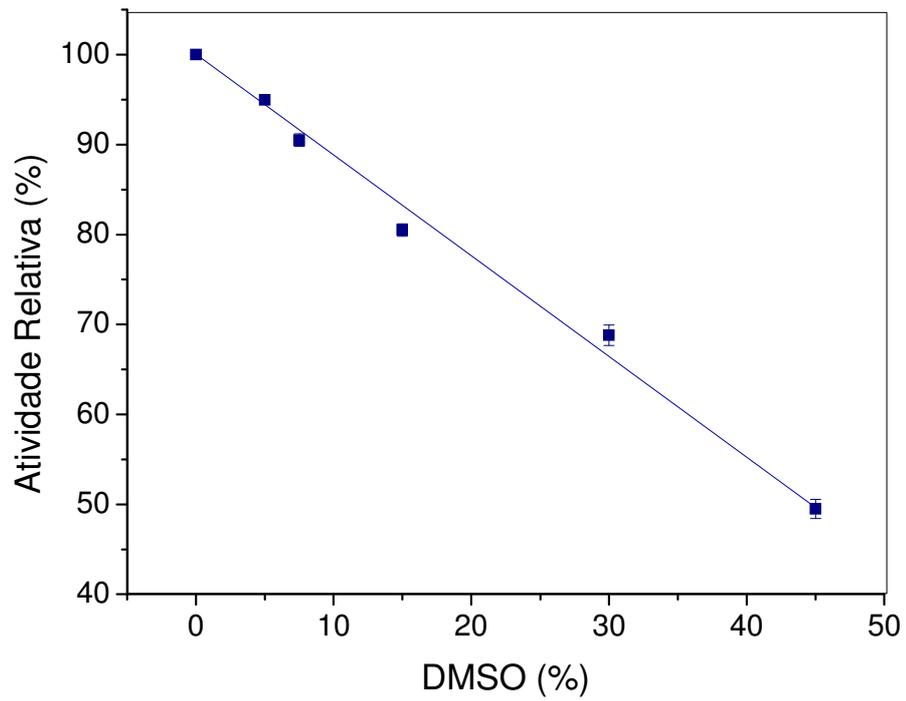
Natureza química: herbicida do grupo dinitroanilina

Informações toxicológicas: altamente tóxico aos peixes e outros organismos aquáticos

IX. APÊNDICES

Apêndice 1. Solubilidade dos compostos orgânicos analisados, concentração das soluções estoque e a concentração utilizada nos experimentos para cada poluente

Poluente	Solubilidade (g/L)	Concentração Solução Estoque (mM)	Concentração Testada (mM)
Acefato	0,02	3,66	2,0
Alacloro	0,17	4,63	0,5
Aldicarbe	4,93	6,6	2,0
Aldrina	27×10^{-6}	0,05	0,05
Atrazina	0,028	4,63	0,5
Azinfós-etil	0,0045	4,14	0,05
Benomil	0,002	3,44	0,04
BHC	0,0073	3,438	0,25
Clorexidina	-	1,6	0,01
Clorotalonil	0,0006	4,7	0,05
Clorpirifós	0,002	2,85	1,0
Deltametrina	$< 0,0001$	2,5	0,01
Dieldrina	-	2,625	0,25
Diflubenzurona	0,00008	4	0,05
Dimetoato	25	4,3615	2,0
Dimetomorfe	$> 0,05$	3,22	0,1
Ditianona	0,00038	4,83	0,02
Diurona	0,0364	5,4	0,2
Endosulfan	0,00032	2,4572	0,1
Endrina	220×10^{-6}	0,05	0,05
Fenamifós	0,7	4,12	1,0
Metamidofós	90	70,86	2,0
Permetrina	0,0002	0,05	0,05
Procloraz	-	3,79	0,05
Simazina	0,005	0,02	0,05
Tetradifona	0,078	4	0,05
Tiametoxan	4,1	2,04	1,0
Triclorfon	0,12	3,8844	1,0
Trifuralina	335,5	2,98	0,003

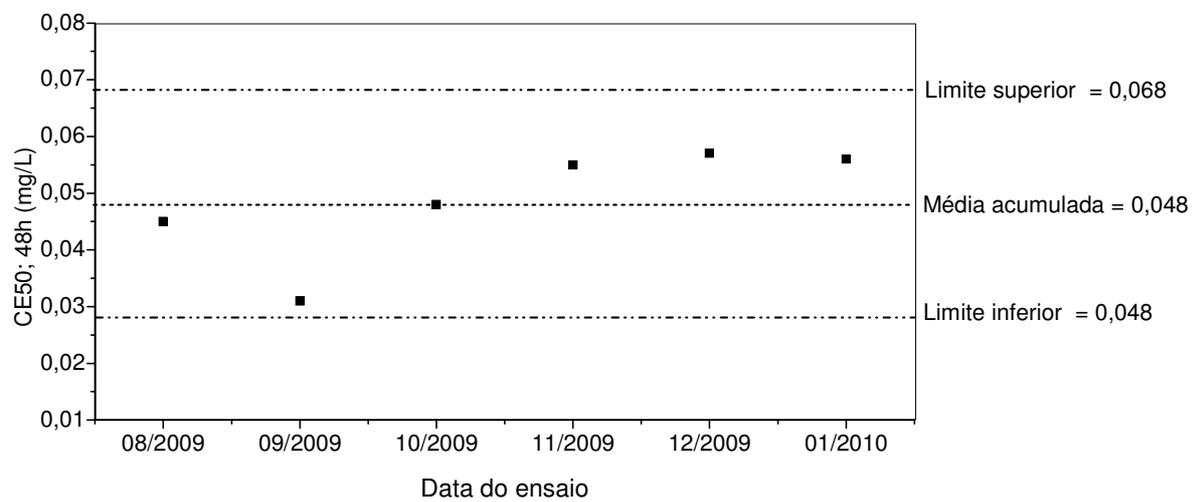


Apêndice 2. Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) na atividade da fosfatase ácida de *D. similis*.

Apêndice 3. Ensaio de toxicidade aguda 48hs com dicromato de potássio *

Meses	EC50 (mg/L)	Níveis de Significância (95%)	pH	OD (mg/L)	Dureza (mg/L)	Condutividade (μS/cm)
08/2009	0,045	0,018 - 0,067	7,4 - 7,6	8 - 6	50 - 50	156 - 158
09/2009	0,031	0,015 - 0,048	7,4 - 7,48	8 - 4	50 - 50	156 - 157
10/2009	0,048	0,021 - 0,075	7,4 - 7,5	8 - 4	50 - 50	157 - 157
11/2009	0,055	0,032 - 0,067	7,55 - 7,56	8 - 6	50 - 50	160 - 165
12/2009	0,057	0,042 - 0,069	7,43 - 7,6	8 - 6	50 - 50	165 - 167
01/2010	0,056	0,040 - 0,065	7,5 - 7,55	6 - 4	50 - 50	168 - 173
Média	0,0486	-	-	-	-	-

*O EC50 e seus respectivos valores de 95% de significância foram calculados no programa EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM (versão 1.5), acompanhados dos dados de pH, condutividade, OD e dureza da água de diluição antes e após cada experimento.



Apêndice 4. Carta controle da sensibilidade das culturas de *D. similis* à substância de referência dicromato de potássio.

Apêndice 5. Parâmetros físico-químicos da água de diluição, antes e após o experimento, com os poluentes Al^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Mo^{6+} e permetrina

Poluente	Leituras*	pH	OD (mg/mL)	Dureza (mg/mL)	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)
Controle**	-	7,4 – 7,5	8 - 6	50	160 - 165
Al^{3+}	1	7,2 – 7,1	8 – 6	50	156 - 158
	2	7,2 – 4,62	8 – 6	50	156 - 162
Cd^{2+}	1	7,53 – 7,26	8 – 6	50	166 - 161
	2	7,53 – 7,25	8 – 6	50	166 - 162
Se^{4+}	1	7,45 – 7,02	6 – 4	50	158 - 160
	2	7,45 – 6,98	6 – 4	50	158 - 160
Mo^{6+}	1	7,44 – 7,58	8 – 6	50	157 - 161
	2	7,4 – 7,43	8 – 6	50	157 - 163
Permetrina	1	7,51 – 7,27	8 – 6	50	196 - 208
	2	7,51 – 7,06	8 – 6	50	196 - 140

* As leituras 1 referem-se à água de diluição da menor concentração do poluente testado que não causa efeito deletério nos organismos e as leituras 2 correspondem à água de diluição da maior concentração do poluente testado, conforme ABNT (2005).

** Os valores apresentados para o Grupo Controle referem-se à média obtida durante a execução dos experimentos