

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Claudio Martín Jonsson

FOSFATASE ÁCIDA DA MICROALGA
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM : EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DE POLUENTES DE
ORIGEM AGRÍCOLA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a
obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica .

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

2005

FICHA CATALOGRAFICA

Data da Defesa: 30 / 06 / 2005

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)

UNICAMP – IB – Dep. de Bioquímica

Assinatura

Profa. Dra. Helia Harumi Sato

UNICAMP – FEA – Ciência de Alimentos

Assinatura

Dra. Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – LEB

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

UNICAMP – IB – Dep. de Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

UNICAMP – IB – Dep. de Bioquímica

Assinatura

Dra. Shirlei Scramin

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – LPN

Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop

UNICAMP – FCM – Dep. de Farmacologia

Assinatura

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Julio (*in memorian*) e Elda,
pela educação, incentivo constante e
investimento no desenvolvimento intelectual.

À minha esposa Gisela, pela paciência,
colaboração, incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hiroshi que me acolheu calorosamente no seu laboratório e acreditou no alcance dos meus objetivos. A ele, meus sinceros agradecimentos por transmitir seus conhecimentos, seu constante otimismo e ter se demonstrado tão afável em todas as situações.

Aos Professores membros da banca examinadora de Defesa de Tese (Dra. Hélia Harumi Sato, Dra. Vera Lúcia S.S. de Castro, Dr. José Camillo Novello e Dr. Sérgio Marangoni) pelas considerações valiosas junto à versão final do meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente: à Dra. Vera Lúcia S.S. de Castro, pelo incentivo, sugestões e críticas construtivas; ao Maurício (*in memoriam*), Cristina e Neusa pelo apoio técnico no cultivo das algas e condução de alguns ensaios.

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, Dra. Shirlei Scramin, pela presteza na análise deste trabalho, Dr. Lourival Costa Paraíba, pela suas dicas e seu constante incentivo.

Ao pessoal do Laboratório de Resíduos de Pesticidas da Embrapa Meio Ambiente, especialmente à Dra. Vera Ferracini, pela concessão dos padrões de agrotóxicos.

À pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Dra. Aline H. N. Maia, pelas suas valiosas sugestões na análise numérica.

Aos Professores Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Dr. José Camillo Novello e Dr. Paulo Granjeiro pelas suas sugestões e participação na Banca do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela sua disposição na análise deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia (IB-UNICAMP): à Professora Carmen V. Ferreira pela sua constante cordialidade, seus ensinamentos e tão úteis sugestões de ordem técnica; à Érika e Marilena pelas suas amizades e apoio laboratorial; ao Márcio pelas suas importantes dicas e cordialidade; e às demais pessoas (Roberta, Luciana, Ana, William, Camila, Dani, Cleverson, André e Alexandre) que de alguma forma contribuíram para atingir meus objetivos, propiciando sempre uma convivência agradável.

Ao pessoal do Laboratório de Biomembranas (IB-UNICAMP), especialmente ao Márcio, que me facilitou a utilização de alguns equipamentos.

Ao pessoal do LAQUIP (IB-UNICAMP) e do laboratório do Prof. Volpe (IQ-UNICAMP)

pelo empréstimo de alguns materiais.

Ao pessoal do Laboratório de Bioenergética (IB-UNICAMP) pela permissão do uso do microscópio.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica, Andréia e Marina, pela simpatia e por serem tão atenciosas nos momentos que precisei.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) , que me concedeu a oportunidade da realização deste proveitoso treinamento.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro, pelo qual me foi possível fazer o uso de alguns reagentes e equipamentos.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. Extração e caracterização da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	27
3.1.1. Organismos e condições de cultivo	27
3.1.2. Preparação dos extratos	27
3.1.3. Determinação da atividade da fosfatase ácida	28
3.1.4. Estabilidade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> durante o armazenamento a baixa temperatura	29
3.1.5. Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	29
3.1.6. Especificidade por substratos da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	29
3.1.7. Efeito de inibidores na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	29
3.1.8. Determinação das constantes cinéticas da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	29
3.2. Avaliação comparativa do efeito de poluentes na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	30
3.2.1. Agentes químicos	30
3.2.2. Avaliação preliminar comparativa do efeito de poluentes na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	30
3.3. Efeito do íon mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	31
3.3.1. Efeito da concentração e determinação das constantes de inibição (Ki)	31
3.3.2. Estudos <i>in vivo</i> do efeito do íon mercúrio e do LAS na atividade	

da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	31
3.4. Efeito de íons cobre na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	32
3.4.1. Efeito da concentração de íons cobre e do tempo de pré-incubação	32
3.4.2. Determinação das constantes cinéticas da fosfatase ácida na presença de íons cobre	32
3.4.3. Estudo <i>in vivo</i> do efeito de íons cobre na fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	32
3.5. Avaliação da ação conjunta do mercúrio, alumínio, cobre e LAS na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	33
3.6. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	83
7. PERSPECTIVAS	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9. ANEXOS	111

LISTA DE ABREVIATURAS

5'AMP	5'adenosina monofosfato
CE50	Concentração efetiva média
CI50	Concentração de inibição média
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ea	Energia de ativação
FMN	Flavina mononucleotídeo
Kd	Constante de dissociação
KdCu²⁺	Constante de dissociação do cobre
Ki	Constante de inibição enzimática
Km	Constante de Michaelis-Menten
LAS	Alquil benzeno linear sulfonado
LE	Lodo de esgoto
Mr	Massa molecular relativa
p-CMB	p-cloromercuriobenzoato
Pi	Fosfato inorgânico
p-NP	p-nitrofenol
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
S	Substrato
U	Unidade enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}^{-1}$)
V	Velocidade inicial da reação enzimática
Vmax	Velocidade máxima da reação enzimática

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- <i>Selenastrum capricornutum</i>	6
Figura 2 - Extração da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	35
Figura 3 - Efeito da amplitude de sonicação na extração da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	36
Figura 4 - Estabilidade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	38
Figura 5 - Curva de pH em função da atividade da atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	39
Figura 6 - Especificidade pelo substrato da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	40
Figura 7 - Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	41
Figura 8 - Atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola	43
Figuras 9 e 10 - Efeitos das concentrações do íon mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	46
Figura 11 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da K_i do mercúrio na inibição da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	47
Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da K_i de LAS na inibição da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	48
Figura 13 - Parâmetros bioquímicos em culturas de <i>S. capricornutum</i> expostas ao íon mercúrio	50
Figura 14 - Parâmetros bioquímicos em culturas de <i>S. capricornutum</i> expostas ao LAS	51
Figura 15 - Efeito da concentração de íons cobre sobre a atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	53
Figura 16 – Efeito de íons cobre na estabilidade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	54
Figura 17 - Efeito do íon cobre na atividade específica de fosfatase ácida e conteúdo de proteína de culturas de <i>S. capricornutum</i>	57
Figura 18 - Curvas dose-resposta de Hg^{2+} , Al^{3+} e da mistura $Hg^{2+}+Al^{3+}$ em função da atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	58
Figura 19 - Análise isobolográfica entre Hg^{2+} e Al^{3+}	59
Figura 20 - Curvas dose-resposta de Hg^{2+} , LAS e da mistura $Hg^{2+}+LAS$	

em função da atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	60
Figura 21 - Análise isobográfica entre Hg^{2+} e LAS	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CI50 e K_i de metais para enzimas de organismos aquáticos	16
Tabela 2 - Alteração da atividade de enzimas de algas pela ação de poluentes de origem agrícola	17
Tabela 3 - Efeito de poluentes de origem agrícola na fosfatase ácida de alguns organismos	20
Tabela 4 - Efeito de poluentes de origem agrícola sobre a fosfatase ácida de peixes	22
Tabela 5 - Rendimento de extração da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> através de diferentes métodos	34
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	42
Tabela 7 - Atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> na presença de diferentes concentrações de alguns poluentes	44
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> na presença e ausência de íons cobre	55
Tabela 9 - Efeito inibidor de Hg^{2+} e LAS sobre a fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> na presença ou ausência de íons cobre	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 - Preparação do meio de cultura de <i>S. capricornutum</i> (OECD, 1981)	111
Anexo 2 - Absorvância da suspensão de <i>S. capricornutum</i> em função do número de células	112
Anexo 3 - Curva de crescimento de <i>S. capricornutum</i>	112
Anexo 4 - Efeito do tempo de incubação na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	113
Anexo 5 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação de K_m e V_{max} da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	113

Anexo 6 - Gráfico de Arrhenius para determinação energia de ativação (Ea) da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	114
Anexo 7 - Efeito do dimetilsulfóxido na atividade da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i>	114
Anexo 8 - Efeito de agrotóxicos na atividade da fosfatase ácida de fígado de tubarão	115
Anexo 9 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da constante de dissociação de cobre ($KdCu^{2+}$)	115
Anexo 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação de parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> na ausência ou na presença de íons cobre	116
Anexo 11 - Gráfico de Arrhenius na determinação da energia de ativação (Ea) da fosfatase ácida de <i>S. capricornutum</i> na ausência ou na presença de íons cobre	116
Anexo 12 - Efeito da pre-incubação com cobre na inibição da fosfatase ácida pelo mercúrio e LAS	117

RESUMO

Selenastrum capricornutum é uma alga clorofícea unicelular mundialmente distribuída em corpos de água doce e solos. Devido a sua natureza cosmopolita, o seu uso em estudos de ecotoxicidade é recomendado por protocolos nacionais e internacionais. A fosfatase ácida de algas desempenha importantes funções metabólicas tais como decomposição de fosfato orgânico em fosfato inorgânico, processos autofágicos, reciclagem de material celular e formação do zigoto durante a reprodução.

Agentes químicos introduzidos em compartimentos ambientais em decorrência da atividade agrícola, tais como agrotóxicos e contaminantes de lodo usado como fertilizante, podem alterar a atividade da enzima nesses produtores primários.

No presente trabalho foram estudados a extração, estabilidade, especificidade por substratos, efeito de inibidores e cinética da fosfatase ácida do extrato bruto de *Selenastrum capricornutum*. Foi também avaliado o efeito *in vitro* de 30 poluentes de origem agrícola (24 orgânicos e 6 metais pesados), sendo que experimentos mais detalhados *in vitro* e estudos *in vivo*, foram realizados com os agentes que promoveram maior efeito inibidor ou ativador.

Os resultados demonstraram que a extração foi aumentada pelo congelamento/descongelamento entre os ciclos de sonicação. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0, um valor de $K_m = 0,27$ mM para o substrato p-NPP e mostrou-se estável após o armazenamento em freezer durante aproximadamente 6 meses. A enzima foi inibida pelo tartarato (35%), fluoreto (75%) e P_i (45%) e p-CMB (48%). Substratos orgânicos naturais como FMN, frutose 1,6 difosfato e α -glicero fosfato são clivados em um grau similar ao do substrato sintético p-NPP, sugerindo-se o possível envolvimento da enzima no metabolismo desses intermediários. Os resultados demonstraram que somente o surfactante alquil benzeno linear sulfonado (LAS) e os metais pesados Hg^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} produziram uma alteração marcante ($\geq 50\%$) da atividade enzimática. A ordem de inibição da atividade na maior concentração testada foi $LAS > Hg^{2+} = Al^{3+} > Se^{3+} = Pb^{2+} > Cd^{2+}$.

Os valores de concentração de inibição média (CI50) para Hg^{2+} e LAS foram, respectivamente, 0,085 e 0,289 mM. Um mecanismo de inibição não-competitiva foi atribuído para o primeiro ($K_i = 0,0365$ mM), enquanto que o LAS comportou-se como um inibidor

competitivo ($K_i = 0,010$ mM).

Os estudos *in vivo* com culturas de algas tratadas durante 24 horas mostraram que a atividade enzimática e teor de proteína diminuíram nos tratamentos com Hg^{2+} , enquanto que aumentaram em exposições ao LAS. Diferentemente dos experimentos a curto prazo, a inibição da atividade específica foi observada nos organismos expostos durante 7 dias, sendo atribuído um valor de concentração efetiva média (CE50) equivalente a $12,63 \mu M$ de Hg^{2+} e uma redução de 39% para LAS 2 mM.

Os resultados de experimentos *in vitro* com Cu^{2+} , como um ativador da fosfatase ácida, demonstraram uma EC50 e uma $KdCu^{2+}$ (constante de dissociação para Cu^{2+}) equivalente a 1,80 e 1,64 μM , respectivamente. Quando a enzima foi pré-incubada na presença de Cu^{2+} 0,2 mM, a K_m e a E_a (energia de ativação) diminuíram enquanto que a V_{max} praticamente não alterou. De acordo com dados de estabilidade em função do tempo e de experimentação em condições de pré-incubação, sugere-se que o efeito ativador do cobre seja devido ao aumento da estabilidade térmica da enzima. Nas exposições *in vivo* das culturas de *S. capricornutum* ao Cu^{2+} , nas concentrações de 1 e 10 mM, foram obtidas diminuições significativas da atividade da fosfatase ácida e da concentração de proteína, entretanto estes efeitos não foram observados na concentração 0,1 mM. O íon metálico não alterou a atividade específica da enzima nas condições de exposição testadas.

Os estudos sobre a ação conjunta inibitória indicaram que o Hg^{2+} possui menor valor de CI50 que o Al^{3+} ou LAS; e que as misturas $Hg^{2+}+Al^{3+}$ e $Hg^{2+}+LAS$ possuíam, respectivamente, efeito aditivo e levemente antagônico. O Cu^{2+} , que demonstrou ter efeito ativador quando pré-incubado com a enzima, comportou-se como um leve antagonista contra o efeito inibidor do Hg^{2+} .

Espera-se que os resultados do presente trabalho auxiliem no delineamento experimental e discussão de resultados em estudos com enzimas de algas ou outros organismos, no que se refere a sua extração, caracterização e efeitos de agentes químicos. Espera-se ainda que os resultados melhorem o entendimento dos eventos básicos sobre o impacto de poluentes de origem agrícola em níveis bioquímicos de produtores primários.

ABSTRACT

Selenastrum capricornutum is an unicellular green algae widely distributed in freshwater and soils among the world. Because this cosmopolitan characteristic its use is recommended by national and international protocols in ecotoxicity studies. Algae acid phosphatase plays important roles in the metabolism such as decomposing organic phosphates into free phosphates and organic compounds; autophagic digestive process recycling cellular materials, and zygote formation during reproduction.

Chemicals released into the environment from agriculture activities like pesticides and sewage sludge contaminants may impair algae phosphatase activity.

In this work it was studied the extraction, stability, substrates specificity, effect of inhibitors and kinetics of acid phosphatase in the *Selenastrum capricornutum* crude extract. It was also evaluated the *in vitro* effect of thirty agriculture pollutants (24 organic and 6 heavy metals) and performed more detailed *in vitro* studies and *in vivo* experiments with the more potent inhibitors or activators.

The results showed that the extraction increased by freezing/thawing between cycles of probe sonication. The enzyme showed an optimum pH of 5, a K_m value of 0.27 mM for p-NPP and stability by freezing storage during approximately 6 months. The enzyme was inhibited by tartrate (35%), fluoride (75%), Pi (45%) and p-CMB (48%). Natural organic substrates like FMN, fructose 1,6 diphosphate and α -glycero-phosphate were cleaved in a similar extent as the synthetic p-NPP, suggesting the possibility of the enzyme involvement in the cellular metabolism of such intermediates.

The results demonstrated that only the surfactant linear alkyl benzenesulphonate (LAS) and the heavy metals Hg^{2+} , Al^{3+} and Cu^{2+} altered markedly ($\geq 50\%$) the enzyme activity. The order of inhibition at the highest concentration tested was $LAS > Hg^{2+} = Al^{3+} > Se^{3+} = Pb^{2+} > Cd^{2+}$.

Calculated median inhibition concentration (IC50) values for Hg^{2+} and LAS were 0.085 and 0.289 mM, respectively. A non-competitive inhibition mechanism was attributed for the former ($K_i = 0.0365$ mM) while LAS behaved as a competitive inhibitor ($K_i = 0.010$ mM). *In vivo* studies with treated algae cultures for 24 hours showed that enzyme activity and protein content diminished in Hg^{2+} treatments whereas increased in LAS exposures. In contrast with short term treatments, the inhibition of specific activity was observed in exposed algae during 7 days with

estimated median effect concentration (EC50) value of 12.63 μM for Hg^{2+} and 39% reduction for LAS 2 mM.

The results of *in vitro* experiments with Cu^{2+} as an activator demonstrated a EC50 and a KdCu^{2+} (dissociation constant for Cu^{2+}) equivalent to 1.80 and 1.64 μM , respectively. When the enzyme was preincubated in the presence of Cu^{2+} 0.2mM, K_m and E_a (activation energy) decreased whereas V_{max} practically did not changed. According to the data of stability as a function of time and the preincubation conditions during some experiments, it was suggested that the activator effect of copper might be explained by the increase on the thermal stability of the enzyme. *In vivo* experiments showed significantly diminution of the enzyme activity together with protein content at 1 and 10 mM Cu^{2+} but not at 0.1 mM. This metal did not specifically affect the activity of the enzyme in exposed algae at the experimental conditions.

Join action inhibition studies indicated that Hg^{2+} has a lower IC50 value than Al^{3+} or LAS , and that the $\text{Hg}^{2+}+\text{Al}^{3+}$ and $\text{Hg}^{3+}+\text{LAS}$ mixtures have respectively, additive and slight antagonism effects. Copper, which demonstrated an activator effect when was preincubated with the enzyme, behaved as a slight antagonist for the inhibitor effect of Hg^{2+} .

It can be expected that the results of this work will help in the experimental design and discussion of results in algae enzyme studies regarding the extraction, characterization and effect of chemicals. We hope that the results presented in this work can improve the understanding of the basic events of the impact of agriculture pollutants at biochemical levels in primary producers organisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição aquática e acúmulo de contaminantes nos organismos aquáticos

Nas últimas décadas, uma importante contribuição para o progresso da humanidade e melhoria da qualidade de vida tem sido aportada pela implementação de novas tecnologias aliadas ao uso de compostos químicos. Entretanto, vários processos influenciados por essas atividades antropogênicas podem contribuir para o aumento de concentrações de poluentes no solo e água. Estes são: escoamento superficial em áreas urbanas e agrícolas (NIMMO, 1985; JERGENTZ et al., 2004); processos de descarga de mineração, indústria e desagüe municipais; deposição atmosférica (NIMMO, 1985; LELAND & KUWABARA, 1985); percolação através do solo previamente contaminado (SINGH et al., 2000; PANG & LETEY, 1999); descargas acidentais (ORTIZ et al., 2003; TAYLOR et al., 1996); lavagem de equipamento de aplicação e manuseio inadequado de embalagens para descarte (HURTIG et al., 2003; FELSOT et al., 2003).

São consideradas fontes primárias de contaminação do solo, e conseqüentemente, da água, a deposição de metais e compostos orgânicos no solo pelo uso de fertilizantes e corretivos, lodo de esgoto e agrotóxicos. Fontes secundárias são associadas à adição indireta de poluentes ao solo e água, tais como a mineração ou deposição via atmosférica a partir de fontes distantes (CASTRO & JONSSON, 2001).

Ao atingir a hidrosfera, os poluentes são distribuídos pela ação da água, podendo ou não permanecer em solução por longos períodos de tempo. Dependendo das características físico-químicas do composto, parte dele poderá volatilizar, ou poderá se adsorvido ao material suspenso e ao sedimento. Ou ainda, poderá ingressar nos organismos aquáticos, nos quais poderá se acumular, sofrendo determinado grau de metabolização e excreção, exercendo eventualmente seu efeito tóxico (NIMMO, 1985). Cabe ressaltar que a ação tóxica direta sobre um determinado organismo, pode resultar em efeitos indiretos, como a falta de alimentos para espécies pertencentes a um nível trófico superior da cadeia alimentar, ou na eliminação de importantes espécies de predadores que mantêm o equilíbrio ecológico (MURTY, 1986a).

A bioacumulação é um termo geral que descreve o processo pelo qual um agente químico ingressa no organismo, sendo que este processo ocorre se a velocidade de ingresso excede a velocidade de eliminação. A difusão passiva ocorre se existe uma barreira permeável ao agente

químico, e através dela, um gradiente de concentração (STERLING, 1994; SPACIE & HAMELINK, 1985). Por outro lado, o transporte ativo ocorre contra um gradiente de concentração em que o agente químico se complexa com uma macromolécula carregadora da membrana (LEANER & MASON, 2002; STERLING, 1994), enquanto que no transporte facilitado a macromolécula carrega o poluente a favor de um gradiente de concentração (REID, 2001; SPACIE & HAMELINK, 1985).

A adsorção é um outro processo de bioacumulação pelo qual ocorre a interação do agente químico com o superfície do organismo por forças covalentes, eletrostáticas ou moleculares, sendo este fenômeno de grande importância na etapa inicial do processo de bioacumulação. A adsorção é especialmente importante em microrganismos devido à elevada relação superfície/volume (SPACIE & HAMELINK, 1985; FERNANDEZ et al., 1995).

1.1.1. Agentes poluentes de origem agrícola: agrotóxicos e contaminantes do lodo de esgoto (LE)

Com a utilização de modernas práticas agrícolas, que resultaram na maior produção de alimentos, intensificaram-se os problemas causados por pragas. Além dos ácaros, nematóides, fungos e plantas daninhas, são conhecidas cerca de 68.000 espécies de insetos de ação prejudicial (MURTY, 1986a). O combate a estes organismos se faz através do uso de produtos químicos denominados agrotóxicos, sendo que sua utilização abusiva tem ocasionado problemas ao Homem e ao meio ambiente, além de representar uma constante ameaça para as gerações futuras e o equilíbrio dos ecossistemas.

Lodo de esgoto (LE) é uma denominação genérica para o resíduo sólido gerado pelos sistemas de tratamento de águas residuais. Trata-se de um material heterogêneo, cuja composição depende do tipo de tratamento empregado para purificar o esgoto e das características das fontes geradoras (população e indústrias) (ROCHA, 1998).

O uso de LE como fonte alternativa de nutrientes para as plantas tem sido apresentado como uma opção para seu descarte devido ao seu alto teor de matéria orgânica. A principal fonte desses elementos metálicos é o setor industrial. Devemos levar em consideração que a preocupação com metais pesados (Hg, Cd, Cu, Se, Pb, As, Al, e outros) e os possíveis efeitos

prejudiciais a eles associados, foi acentuada a partir do uso do LE em solos agrícolas. Entretanto, a presença desses metais não é exclusividade destes resíduos, uma vez que fertilizantes, corretivos e defensivos podem também contê-los (MATTIAZZO et al., 2001).

1.1.2. Legislação e necessidades de pesquisa

No Brasil, a legislação que regula a emissão e a concentração máxima permissível de agroquímicos, assim como de outros compostos tóxicos em corpos de água superficiais para a preservação das comunidades aquáticas deixa muito a desejar. Observa-se que a Resolução Nº 357 de 17/03/05 do CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - (BRASIL, 2005) especifica concentrações máximas permissíveis para diferentes classes de água somente para aproximadamente vinte e cinco compostos de uso agrícola sendo que alguns destes produtos já tem sido retirados do mercado e aparentemente estão em desuso. Os parâmetros de níveis aceitáveis nessa legislação, tanto para agrotóxicos como para outros poluentes, tem sido propostos com base em outras legislações internacionais. Devemos também levar em consideração que nos compartimentos ambientais, um poluente encontra-se freqüentemente na presença de outros agentes químicos, que pode resultar numa ação conjunta sobre um determinado sistema biológico.

1.2. Efeito de poluentes sobre organismos aquáticos

Organismos apropriados devem ser usados de modo a se fazer uma extrapolação ecologicamente verdadeira de resultados de estudos de efeitos de poluentes no meio aquático. Portanto, uma série de critérios deve ser considerada na escolha do organismo-teste, tais como sensibilidade entre as espécies, disponibilidade, ser representante do ecossistema em estudo, facilidade de manutenção, e informação adequada sobre a espécie em estudo.

Uma variedade de protocolos, nos quais são recomendadas as espécies a serem utilizadas, tem sido desenvolvidas pela American Public Health Association (A.P.H.A.), U.S. Environmental Protection Agency (U.S.E.P.A.), American Society for Testing and Materials (A.S.T.M.) e Organization for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.). No Brasil, os procedimentos dos testes em organismos aquáticos estão descritos no “Manual de Testes para a Avaliação de Toxicidade de Agentes Químicos do IBAMA” (IBAMA, 1989) e em documentos da CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - que informam sobre as

metodologias com diferentes organismos (normas técnicas L5.018, L5.019, L5.020, L5.022, L5.227 e L5.228) e sobre a aplicação dos resultados para o controle de efluentes tóxicos (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; BASSOI et al., 1990). Nestes procedimentos são realizados estudos com três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Assim por exemplo, com os produtores primários, representados por espécies de algas como *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus sp* e *Scenedesmus sp*, com os consumidores primários como os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia s.p.*; e com os consumidores secundários representados por peixes como *Cheirodon notomelas*, *Hemigrammus marginatus*, *Poecilia reticulata* e peixes da família Characidae em geral. São também descritos testes com bactérias como *Photobacterium phosphoreum* e *Spirillum volutans* representando os decompositores.

Alem dos organismos citados, são relatados também na literatura estudos de efeitos de poluentes com outros organismos aquáticos como anfíbios (RICHARDS & KENDALL, 2002), insetos (JIN-CLARK et al., 2002), anelídeos (MELLER et al., 1998), moluscos (SURESH et al., 1993), protozoários (NICOLAU et al., 2004), plantas (TEISSEIRE et al., 1998) e fungos (EL HISSY et al., 1995).

1.2.1. Importância das algas

Do ponto de vista ecológico, as algas representam um grupo cosmopolita, ocorrendo na superfície de todos os tipos de solo, tendo porém sua maior distribuição nas águas onde constituem os principais produtores primários de compostos orgânicos de carbono. São portanto, parte fundamental da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (ROUND, 1973).

Aproximadamente 70% da superfície do planeta está coberta por águas superficiais e a importância das algas neste compartimento ambientais reside nos processos de conversão de energia solar em energia química que circula através da cadeia alimentar, com liberação de oxigênio como importante subproduto. Torna-se então relevante o estudo do efeito de fatores de “stress” de origem antropogênica sobre mecanismos fisiológicos e bioquímicos nesses organismos (ROST, 1984).

As algas são consideradas em três diferentes reinos: monera, protista e plantae. Os organismos do reino monera, algas azuis ou cianobactérias são unicelulares, procariontes (ausência do envoltório nuclear) e autótrofos (produzem seu próprio alimento). As algas do reino

protista são unicelulares (embora existam formas pluricelulares de organização simples), autótrofos ou heterótrofos (dependem de outros seres para se alimentarem), e suas células apresentam envoltório nuclear e organelas membranosas (organismos eucariontes). São organismos de grande simplicidade e constituem o primeiro grupo onde ocorrem mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, apresentando em geral, um único núcleo. No reino plantae são encontrados organismos pluricelulares e alguns unicelulares, eucariontes e autótrofos, que acumulam polissacarídeos como material de reserva. Pertencem a este reino as algas vermelhas (filo Rhodophyta), as algas pardas (Phaeophyta) e as algas verdes (Chlorophyta). Estas últimas são extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, onde são um dos mais importantes componentes do fitoplâncton. Habitando águas doces ou salgadas, solos úmidos ou troncos, podem estabelecer relações de mutualismo com os fungos formando os líquens. As algas verdes contêm os pigmentos clorofila a e b. A presença destes pigmentos sustenta a idéia de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas por serem estas possuidoras destes tipos de clorofila (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). As algas verdes diferem do resto das outras eucariontes por formar seus compostos de reserva no cloroplasto, ao invés de no citoplasma (LEE, 1989).

1.2.1.1. O gênero *Selenastrum*

Dentro do filo Chlorophyta, o gênero *Selenastrum* faz parte da classe Chlorophyceae na qual uma das características das células é possuir simetria externa radial, ou próxima de radial (LEE, 1989).

A espécie que mais tem sido citada na literatura dentro deste gênero é a *S. capricornutum* (Figura 1), sendo também mencionadas outras espécies como *S. bibraianum*, *S. gracile* (PIERRE, 2001) e *S. minutum* (RIVOAL et al., 2002; THEODOROU et al., 1991).

Como todas as algas do filo Chlorophyta de água doce, estes organismos possuem uma distribuição cosmopolita em solos e corpos d'água (LEE, 1989 ; KEDDY, 1995), motivo pelo qual tem sido amplamente utilizada em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais (KASAI & HATAKEYAMA, 1993; KONG et al., 1998; JONSSON et al., 1998) e recomendada no registro de agentes químicos e biopesticidas por órgãos nacionais (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; IBAMA, 1989; JONSSON & MAIA, 1999) e internacionais (OECD, 1981; U.S.E.P.A., 1994).

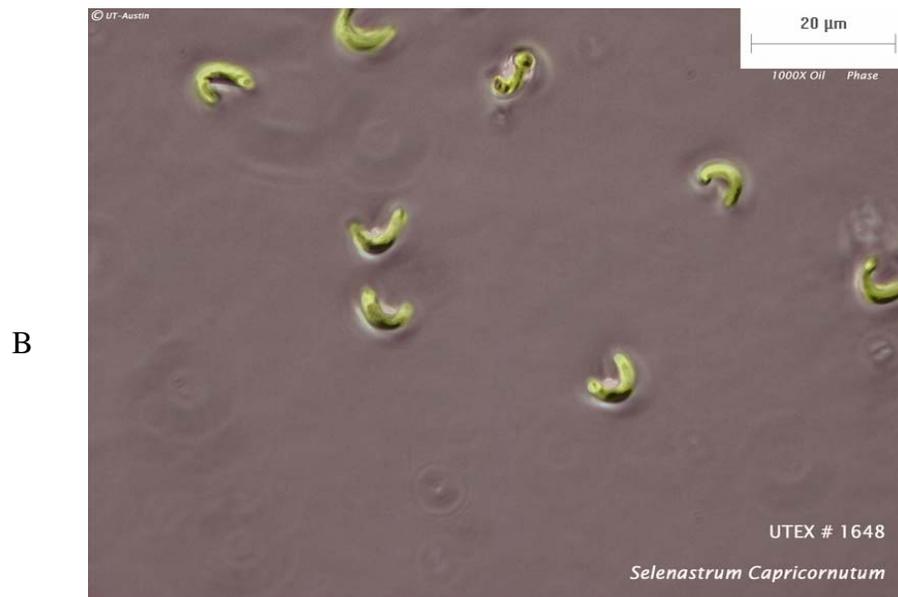
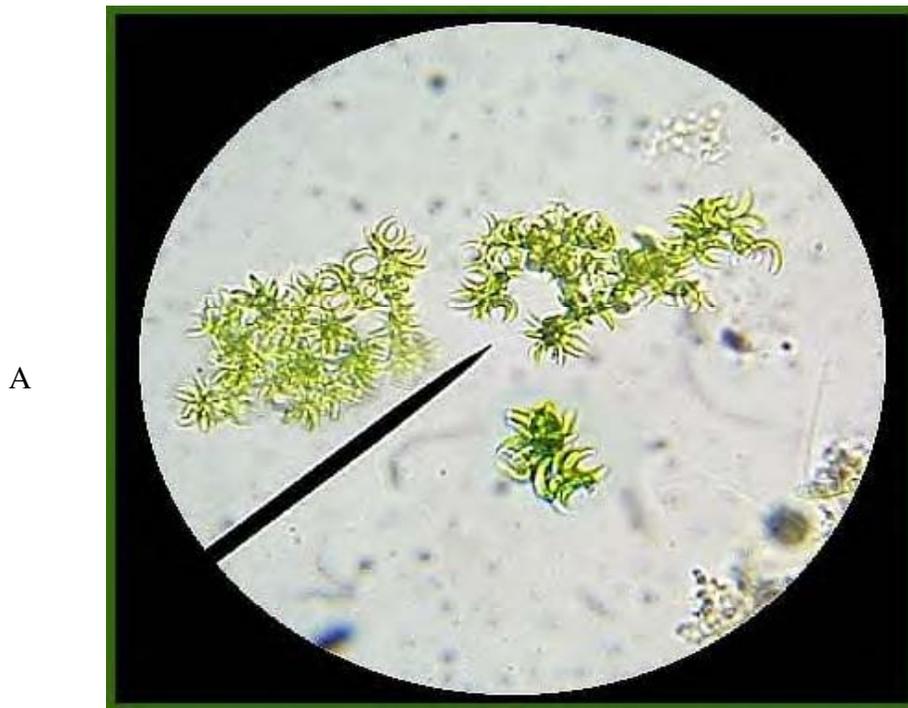


Figura 1 - *Selenastrum capricornutum*

A – Formação de colônias (microscopia de campo claro)

B – Células isoladas (microscopia de contraste de fase)

É importante destacar que nos últimos anos a espécie *S. capricornutum* está sendo também denominada por alguns autores como *Pseudokirchneriella subcapitata* (FIORENTINO et al., 2003; HEIJERICK et al., 2002) ou *Raphidocelis subcapitata* (MUYSSSEN & JANSSEN, 2001; EVANDRI et al., 2003).

1.2.2. Efeito de compostos tóxicos em algas e outros organismos aquáticos

1.2.2.1. Agrotóxicos

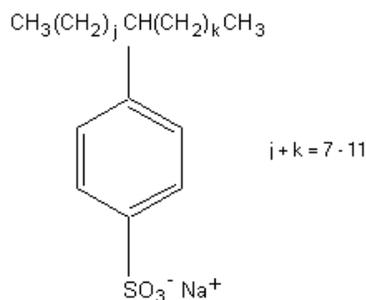
Os efeitos destes compostos para os organismos aquáticos são muito variados, seja pela quantidade de ingredientes ativos presentes no mercado, que são aproximadamente 280 no Brasil (SINDAG, 2004), seja pela enorme gama de espécies existentes nos corpos d'água. Assim sendo, a toxicidade das moléculas para uma determinada espécie pode variar até mais de 25.000 vezes (VERMA et al., 1982). Entretanto existem compostos classificados como extremamente tóxicos que merecem ser mencionados, tais como o endosulfan e os piretróides que possuem valores de CL50 (concentração do composto que promove morte de 50% dos organismos) em peixes na ordem de algumas $\mu\text{g.L}^{-1}$ (JONSSON & TOLEDO, 1993; WERNER et al., 2002). Estes valores de CL50 dependem muito do composto e do organismo estudados.

Os efeitos de compostos orgânicos com ação praguicida tais como inseticidas organoclorados (DeLORENZO et al., 2002), inseticidas organofosforados (SABATER & CARRASCO, 2001), inseticidas carbamatos (WALSH & ALEXANDER, 1980), fungicidas (DeLORENZO & SERRANO, 2003) e nematicidas (ANTON et al., 1993) tem sido bastante estudados em diferentes espécies de algas, tanto em meios de cultura preparados em laboratório (JONSSON et al., 1998) ou em amostras de água coletadas em campo (JONSSON et al., 1997). Os estudos envolvem avaliação do crescimento da cultura pelo aumento de número de células (JONSSON et al, 1998); avaliação da atividade fotossintética pela produção de O_2 ; alterações na cadeia de transporte de elétrons (VICENTINI et al., 2004); fixação de carbono (GOLDSBOROUGH & BROWN, 1988); alterações na atividade de enzimas (GEOFFROY et al. 2002); além da análise de conteúdo de proteína, alteração do volume celular e de pigmentos fotossintéticos (RIOBOO et al., 2002)

1.2.2.2. Contaminantes do LE: Alquil benzeno linear sulfonado (LAS); mercúrio; cobre

Alquil benzeno linear sulfonado (LAS)

O LAS constitui uma mistura de homólogos e de isômeros de posição fenila, cada um contendo um anel aromático sulfonado (na posição *para*) ligado a uma cadeia alquila linear C10-C14. Esta ligação se faz em qualquer posição, exceto na posição terminal. O produto usado em detergentes está geralmente presente na forma de sal sódico.



O LAS é o mais importante tensoativo aniônico no setor de detergentes domésticos e produtos de limpeza industriais e institucionais. No Brasil estima-se uma produção anual deste composto de aproximadamente 80.000 ton/ano (DETEN QUÍMICA S.A, 2004). Apesar de sua relativamente rápida biodegradação em estações de tratamento de esgoto, a sua presença tem sido evidenciada em concentrações relativamente altas em LE de países desenvolvidos, e seus efeitos e riscos para organismos não-alvo tem sido avaliados (ELSGAARD et al., 2001; HOLMSTRUP & KROGH, 2001; KLOEPPER-SAMS et al., 1996). A presença de metais como o Hg pode resultar na inibição da biodegradação do LAS (MISRA et al. 1991b). Não se dispendo de dados a respeito de níveis de LAS em lodos brasileiros de potencial uso agrícola, existe a necessidade do estabelecimento de normas para seu controle, pois segundo HOLMSTRUP et al. (2001), este surfactante aniônico pode estar presente em LE em concentrações de até 10 g.Kg^{-1} , tendo se registrado concentrações em solos tratados de até 50 mg.Kg^{-1} (WHO, 1996). A concentração máxima permissível para o LAS em corpos d'água do território nacional que visam a proteção das comunidades aquáticas é de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

Segundo MORENO-GARRIDO et al. (2001), o LAS pode alterar a permeabilidade de membranas, a atividade de enzimas e lisossomos, estrutura de tecidos e induzir alterações nas cadeias de transporte de elétrons.

A toxicidade para organismos aquáticos é também espécie-dependente, tendo sido registrados valores de CL50 para peixes, crustáceos e moluscos equivalentes a 0,1-125; 0,12-27 e 4,6-200 mg.L⁻¹, respectivamente (WHO, 1996). Segundo MISRA et al. (1991a), a CL50 de LAS avaliada para alevinos de carpa é da ordem de 20 µg.L⁻¹

SAEZ et al. (2001) e FERNANDEZ et al. (1995) estudaram a bioconcentração e a adsorção do LAS por algas, tendo-se constatado que algumas espécies acumulam até aproximadamente 2.000 vezes a concentração do meio, e que o aumento do pH do meio diminui a taxa de adsorção. Amostras extraídas de rios indicaram que as algas podem bioconcentrar até 368 mg.Kg⁻¹ de LAS (WHO, 1996).

Apesar de alguns trabalhos relatarem sobre a capacidade das algas em acumular estes detergentes e manifestar seus efeitos adversos, existe uma carência quanto aos efeitos subcelulares de LAS em importantes espécies de fitoplânctons.

Mercúrio

Apesar do uso do mercúrio estar sendo reduzido, concentrações significantes deste metal tem sido encontradas em lodos (TSAKOU et al., 2001; MAMAIS et al., 2000; CARPI et al., 1997; ALMEIDA et al., 1998). O mercúrio presente no lodo e incorporado em solos, é passível de ser transportado para os compartimentos aquáticos (BECCALONI et al., 2000; SLOAN et al., 2001). Os sais de mercúrio, e principalmente o mercúrio orgânico, ingressam facilmente nos organismos aquáticos. Algas e invertebrados aquáticos possuem grande capacidade de acumular o metal e transferi-lo para níveis superiores da cadeia alimentar, sendo que a biodisponibilidade é negativamente afetada pela presença de substâncias húmicas (SJOBLOM et al., 2000; TSUI & WANG, 2004; WHO, 1989). Os peixes também assimilam o metal e o retém nos seus tecidos principalmente na forma de metilmercúrio (IKINGURA & AKAGI, 1999). Existem grandes evidências de que a fonte de metilação seja devida a ação de microrganismos nos sistemas aquáticos. Portanto os níveis ambientais de metilmercúrio dependem do balanço entre a metilação e desmetilação que ocorre na água e sedimento pela ação de bactérias e do perifíton (GUIMARÃES et al., 2000; WHO, 1989).

Segundo a resolução do CONAMA, a concentração máxima permissível para o mercúrio em corpos d'água doces que visam a proteção das comunidades aquáticas é de 0,2 µg.L⁻¹ (BRASIL, 2005).

Os compostos de mercúrio, inorgânicos ou orgânicos, apresentam uma afinidade bastante acentuada por grupos sulfidrilas essenciais de sistema enzimáticos, sendo geralmente admitido que os efeitos fisiológicos e bioquímicos são resultantes de alterações nesses grupamentos (LARINI, 1987; VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990).

As algas são capazes de bioconcentrar mercúrio em uma concentração 8.500 vezes maior do que a presente no meio sob a forma de cloreto de mercúrio. A taxa de fotossíntese de *Chlorella pyrenoidosa* e a sobrevivência de *Chlorella vulgaris* foi reduzida em 50% nas concentrações de 300 e 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ cloreto de mercúrio.

Estudos demonstram que o mercúrio tem a capacidade de inibir várias enzimas em organismos fitoplânctônicos tais como fosfatases (OBST et al., 1988; FATHI, 2002), desidrogenases, transaminases (FATHI, 2002), n-glicosidases, amilases, proteases, alanina-aminopeptidases (OBST et al., 1988) e esterases (OBST et al., 1988; PETERSON & STAUBER, 1996).

Cobre

Apesar deste elemento ser permitido no LE de uso agrícola em níveis bem superiores que o mercúrio (RODELA & ALCARDE, 2001), ele pode estar presente em concentrações acima dos padrões de segurança dependendo da origem do material. Assim, por exemplo, este elemento foi o único que apresentou níveis elevados em um estudo realizado com material de estações de tratamento de Maringá – PR (ALMEIDA et al., 1998).

Cabe salientar que o cobre, sob as formas de sulfato, oxiclreto e óxido cuproso, é amplamente utilizado como fungicida em mais de 50 produtos hortifrutigrangeiros, café, algodão e fumo (ANVISA, 2004); constituindo esta prática uma das principais fontes de contaminação do solo e água. Para este último compartimento ambiental, a sua concentração máxima permissível para a proteção das comunidades aquáticas de água doce é de 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

O cobre é um elemento traço essencial para os sistemas biológicos em determinados níveis de concentração, porém pode ser potencialmente tóxico quando estes níveis são ultrapassados. É constituinte de várias cuproproteínas, entre estas as hemocianina (moluscos), a hepatocupreína (artrópodes e gastrópodes), a cerebrocupreína e eritrocupreína (mamíferos). Várias cuproenzimas são conhecidas, tais como ácido-L-ascórbico-oxidase, uricase, tirosinases, lacase, polifenol-

oxidase, betamercaptopiruvato-transulfurase, citocromo-oxidases, p-fenilenodiamino-oxidase e a galactose-oxidase (VILLELA et al., 1978).

Depois do mercúrio, o cobre se apresenta como o elemento mais tóxico para algas, crustáceos, moluscos e anfíbios (CASTRO & JONSSON, 2001).

Em algas, assim como em plantas, a toxicidade do cobre está associada à inibição do transporte de elétrons na fotossíntese e da síntese de pigmentos fotossintéticos, destruição da membrana de cloroplastos, decréscimo intracelular das concentrações de Na^+ e K^+ e diminuição da assimilação de NH_4^+ , NO_3^- , PO_3^{3-} , uréia e bicarbonato (FATHI & EL-SHAED, 2000; RAI & RAI, 1997; CID et al., 1997). Entretanto, a tolerância de algas e de outros organismos para o cobre, tem sido demonstrada, propondo-se mecanismos para este fenômeno tais como: ligação do metal a constituintes da parede celular, complexação com ácidos orgânicos com conseqüente remoção para os vacúolos e ligação à proteínas ricas em grupos $-\text{SH}$ ou fitoquelatinas (WHO, 1998, MOENNE, 2001).

Exposição de algas ao cobre tem provocado alterações bioquímicas incluindo a inibição da atividade de algumas enzimas como esterases (FRANKLIN et al., 2001a,b), fosfatases (FATHI & EL-SHAED, 2000; RAI & RAI, 1997), nitrato redutase, ATPase e urease (RAI & RAI, 1997).

1.2.3. Ação conjunta dos poluentes

Na natureza, os organismos são constantemente expostos não somente a um agente tóxico, se não freqüentemente, a mais de um desses agentes, podendo resultar num efeito da ação conjunta de poluentes sobre um sistema biológico. A identificação da contribuição de cada um desses agentes para a toxicidade total, e a interação entre dois ou entre um grupo de agentes tóxicos tem sido bastante discutida (MARKING, 1985; MURTY, 1986b; TALLARIDA, 2001). Assim sendo, a interação entre eles pode aumentar ou diminuir o efeito total, resultando em uma ação maior ou menor que simplesmente a somatória dos efeitos.

A aplicação de algumas metodologias permite estudar e classificar tal tipo de interação entre os poluentes. Nesta classificação, a aditividade refere-se a dois agentes químicos que atuam independentemente sobre o mesmo sistema biológico de tal maneira que o efeito resultante é aditivo, ou soma dos efeitos. O sinergismo é definido como uma interação entre os agentes tóxicos que produz um efeito maior que o esperado em relação às ações individuais, ou seja,

maior que o efeito aditivo. Contrariamente a isto, agentes antagonistas reduzem o efeito, ou seja, produzem um efeito menor que o aditivo (NELSON & KURSAR, 1999).

MISRA et al. (1989) observaram que o LAS aumentava significativamente o acúmulo de mercúrio em tecidos de peixes. Analogamente, CALAMARI & MARCHETTI (1973) observaram que a combinação de metais e detergentes aniônicos produziram efeito tóxico sinérgico para trutas. Existem na literatura diversos outros exemplos de sinergismo na toxicidade de poluentes para organismos aquáticos (FORGET et al., 1999; JIN-CLARK et al., 2002; DENTON et al., 2003). Por outro lado, a combinação dos fungicidas polpet e cobre possuem um efeito antagônico na redução do crescimento da macrófita aquática *Lemna minor* (TEISSEIRE et al., 1998). O antagonismo também foi evidenciado nas várias combinações binárias dos metais V, Ni, Mo e Cu quanto ao crescimento e teor de clorofila da alga *Scenedesmus quadricauda* (FARGASOVA, 2001).

1.3. Alterações bioquímicas como indicadores de efeitos de poluentes no compartimento aquático

O conceito básico que sustenta a utilização de bioindicadores de poluição ambiental se baseia no fato que os distúrbios por xenobióticos no meio ambiente levam inicialmente a uma perturbação de uma reação bioquímica em um determinado organismo. Se estas alterações bioquímicas forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível a identificação de problemas ambientais antes que o ecossistema aquático como um todo seja afetado (HENDERSON, 1995; JIMENEZ & STEGEMAN, 1990).

Por causa destas características, os biomarcadores a nível bioquímico são apontados como sistemas de “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental (PAYNE et al., 1987).

1.3.1. Alterações na atividade enzimática

Durante a exposição a vários tipos de contaminantes, os mesmos se concentram em células ou tecidos podendo promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, ocorrendo:

- aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio, com conseqüente diminuição desta atividade no meio intracelular (NETRAWALI & GANDHI, 1990; SURESH et al., 1993).

- aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima (GILL et al., 1992; BOUNIAS et al., 1996);

- aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína (GILL et al., 1991; GILL et al., 1992);

- diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína (ELSEBAE, 1996; EL DEMERDASH et al., 2001).

Os estudos envolvem a ação dos poluentes na atividade de enzimas de diversas vias metabólicas, tais como:

- da via glicolítica (SAMUEL & SASTRY, 1989 ; JONSSON et al. 2002);

- da via da pentose-fosfato (SAMUEL & SASTRY, 1989; SURENDRANATH et al., 1991);

- do ciclo de Krebs (ARNOLD et al., 1995; FATHI, 2002);

- da síntese de aminoácidos (JONSSON et al. 2002; FATHI, 2002) e degradação de proteínas (SIMON et al., 1999; KOTORMAN et al., 2000);

- da cadeia respiratória (AJAY-SINGH & AGARWAL, 1993; ARNOLD et al., 1995);

- da síntese de ácidos graxos (TAKAHASHI et al., 2001) e metabolismo dos lipídeos (RAO & SURENDRANATH, 1991; KOTORMAN et al., 2000);

- do metabolismo do nitrogênio (RAI & RAI, 1997; RAI et al., 1998);

- da fotossíntese (VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990; TREBST et al., 2002).

Especial importância tem sido dada nos últimos anos ao efeito sobre enzimas envolvidas no processo de biotransformação de xenobióticos, tanto da Fase I como da Fase II. Entre as primeiras, associadas às atividades do citocromo P450 e de monoxigenases de função mista (MFO), tem sido avaliadas a etoxiresorufina-o-deetilase (EROD) (FENET et al., 1998; RUUS et al., 2002) e benzopireno monoxigenases (RAMLJAK et al., 2000). Com relação às enzimas de conjugação na Fase II, a glutatona-S-transferase (GST) (TAYSSE et al., 1998; JONSSON et al. 2002) e a UDP-glucuronosiltransferase (UDPGT) (TAYSSE et al., 1998; TARJA et al., 2003)

têm sido também bastante estudadas em organismos expostos em condições de laboratório e nos coletados de áreas impactadas.

A inibição da atividade da acetilcolinesterase e delta-aminolevulino-dehidratase, bem estudadas em mamíferos devido aos efeitos, respectivamente, de organofosforados e do chumbo, tem sido investigadas em peixes e outros organismos (BURDEN et al., 1998; JIN-CLARK et al., 2002; DENTON et al., 2003).

A atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo intermediário de diversas vias como ATPases (PHILIP & ANURADHA, 1996; OMAR, 2002) e fosfatases (FATHI, 2002) tem sido avaliada; assim como de enzimas associadas ao estudo do “stress oxidativo” como a ascorbato peroxidase (GEOFFROY et al. 2002; MALLICK, 2004), superóxido dismutase (RANDHAWA et al., 2001; ZIKIC et al. 2001), catalase (STRMAC & BRAUNBECK, 2000; GEOFFROY et al. 2002), peroxidase (EL ENANY & ISSA, 2001), glutathione sintetase (TSUJI et al., 2003), glutathione redutase (PENA-LLOPIS et al., 2001; GEOFFROY et al. 2002) e glutathione peroxidase (RANDHAWA et al., 2001; ELIA et al., 2003).

1.3.1.1. Estudos *in vitro*

Estes estudos são realizados pela adição do poluente num sistema de reação contendo o substrato juntamente com a enzima, extraída de uma célula ou tecido supostamente não exposto à ação do contaminante.

Os estudos de avaliação da atividade enzimática *in vitro* representam uma ferramenta útil na triagem de vários agentes poluentes e tem sido usados 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., 1996; MAZZEI et al., 1996; GILL et al., 1990b). Neste sentido, tem se demonstrado que a medida da atividade enzimática pode ser usada como um bioindicador de toxicidade de poluentes pois consome menor tempo de análise, requer menor esforço humano (ELSEBAE, 1996; EL DEMERDASH et al., 2001) e alguns efeitos qualitativos tendem a ser semelhantes aos que ocorrem nos organismos vivos (GILL et al, 1990a; EL DEMERDASH & ELAGAMY, 1999).

Dados de testes *in vitro* podem proporcionar informações úteis para a elucidação do mecanismo de ação tóxica sobre uma determinada espécie de organismo, além de nos permitir fazer comparações sobre a susceptibilidade de uma enzima para diferentes poluentes (ELSEBAE,

1996; JIN-CLARK et al., 2002) ou ainda, sobre a susceptibilidade de diferentes enzimas para um dado poluente (GILL et al., 1992; TANG et al., 1998) Para isto, obtém-se parâmetros de ativação ou inibição enzimática (EL DEMERDASH & ELAGAMY, 1999, EL DEMERDASH et al., 2001), constante de inibição (K_i) (ZHOU et al., 2000; CHEN et al., 2000), constante de dissociação (K_d) (YOUNGS et al., 2000) ou avalia-se ainda alterações na V_{max} e K_m (RAHMAN et al., 2004).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns resultados da avaliação de parâmetros de inibição referentes a estudos *in vitro* com enzimas extraídas de diferentes organismos aquáticos.

1.3.1.2. Estudos *in vivo*

São realizados através da medida da atividade da enzima, a qual foi extraída de um organismo-teste submetido ao agente tóxico sob um dado período de tempo. Estes testes tem sido realizados pela exposição de organismos à concentrações conhecidas do poluente, em condições laboratoriais (JONSSON et al. 2002; FATHI, 2002) ou de campo (MAYCOCK et al., 2003), para a avaliação de risco. Portanto, os dados dose-resposta obtidos auxiliam o estabelecimento de níveis aceitáveis de concentração no compartimento aquático.

A utilização de estudos da alteração da atividade enzimática pela exposição *in vivo* na avaliação de áreas impactadas e seu monitoramento tem sido extensamente abordada pela literatura, tanto para poluentes orgânicos (BALINT et al., 1997; FENET et al., 1998), como para metais (EL DEMERDASH, F.M. & ELAGAMY, 1999 ; ADHAM et al., 1999).

A título de exemplificação, na Tabela 2 é demonstrada a susceptibilidade de várias enzimas após a exposição de algas a poluentes de origem agrícola.

Tabela 1: Valores de IC50 e Ki de metais para enzimas de organismos aquáticos.

ENZIMA	ORGANISMO	METAL	IC50 (mM)	KI (mM)	REFERÊNCIA
Fosfatase ácida	Alga	arseniato	-	0,023	BENNUN & BLUM, 1966
		molibdato	-	9,2 e 0,6	
Fosfatase alcalina	crustáceo	mercúrio	-	0,036	CHEN et al., 2000
		vanádio	-	0,2 – 2,3	ZHOU et al., 2000
	peixe	mercúrio	0,53	-	EL DEMERDASH & ELAGAMY, 1999
		cádmio	0,24	-	
Adenilciclase	molusco	chumbo	0,025	-	GIANNACCINI et al., 2004
Carboxilesterase	peixe	estanho	> 2	-	AL GHAISS et al., 2000
Acetilcolinesterase	peixe	mercúrio	0,12	-	EL DEMERDASH & ELAGAMY, 1999
		cádmio	6,2	-	
Glutathiona-S-transferase	peixe	mercúrio	0,5	-	EL DEMERDASH & ELAGAMY, 1999
		cádmio	7,1	-	
Anilina hidroxilase	peixe	mercúrio	-	0,23	GUNER & COLAK , 1996
		níquel	-	0,43	
		cádmio	-	0,65	
Porfobilinogênio sintase	peixe	chumbo	-	1,3	GONZALEZ et al., 1987
		zinco	-	1,3	
		magnésio	-	3,5	

Tabela 2: Alteração da atividade de enzimas de algas pela ação de poluentes de origem agrícola.

ENZIMA	POLUENTE	ESPÉCIE	EFEITO NA ATIVIDADE	REFERÊNCIA
Ascorbato peroxidase	Oxifluorfen Diuron Cu ²⁺	<i>S. obliquus</i> <i>S. obliquus</i> <i>G. tenuistipitata</i>	aumento inalterado aumento	GEOFFROY et al. 2002 COLLEN et al., 2003
ATPase	Zn ²⁺ Al ²⁺ , Zn ²⁺ Cu ²⁺	<i>S. quadricauda</i> <i>S. capricornutum</i> <i>C. vulgaris</i>	diminuição diminuição diminuição	OMAR, 2002 KONG & CHEN, 1995 RAI & RAI, 1997
Beta-D-galactosidase	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	diminuição	PETERSON & STAUBER, 1996
Ca ²⁺ ATPase	Al ³⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	RAI et al., 1998
Catalase	Oxifluorfen Diuron Cd ²⁺ , Ni ²⁺	<i>S. obliquus</i> <i>S. obliquus</i> <i>S. armatus</i>	aumento inalterado aumento	GEOFFROY et al. 2002 EL ENANY & ISSA, 2001
Elongase de síntese de ac. graxos	Thenychlor	<i>Scenedesmus sp</i>	diminuição	TAKAHASHI et al, 2001
Esterase	Cu ²⁺ LAS	<i>S. capricornutum</i> <i>N. gaditana</i>	diminuição diminuição	FRANKLIN et al, 2001a,b HAMPEL et al., 2001
Ferridoxina nitrato redutase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	inalterado	DEVRIESE et al, 2001
Fitoquelatina sintase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	TSUJI et al., 2003
Fosfatase alcalina	Dimetoato Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>C. vulgaris</i> <i>S. bijuga</i>	aumento diminuição	SHIZHONG et al., 1997 FATHI, 2002
Fosfatase ácida	Hexaclorobenzeno Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. capricornutum</i> <i>S. bijuga</i>	diminuição diminuição	KONG et al., 1998 FATHI, 2002
Gama-glutamil-cisteina sintetase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	TSUJI et al., 2003
Glicose-6-fosfato-desidrogenase	Hexaclorobenzeno Al ³⁺	<i>S. capricornutum</i> <i>S. capricornutum</i>	diminuição diminuição	KONG et al., 1998 KONG & CHEN, 1995
Glutamato desidrogenase	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	aumento	FATHI, 2002
Glutamina sintetase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	diminuição	DEVRIESE et al, 2001
Glutaciona peroxidase	Ni ²⁺	<i>S. acutus</i>	aumento	RANDHAWA et al., 2001
Glutaciona redutase	Oxifluorfen Diuron Cd ²⁺	<i>S. obliquus</i> <i>S. obliquus</i> <i>N. oculata</i>	aumento inalterado diminuição	GEOFFROY et al. 2002 YOUNG & WOUNG, 2003
Glutaciona sintetase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	TSUJI et al., 2003
Glutaciona-S-transferase	Oxifluorfen Diuron	<i>S. obliquus</i> <i>S. obliquus</i>	aumento inalterado	GEOFFROY et al. 2002
Malato desidrogenase	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	FATHI, 2002
Mg ⁺⁺ ATPase	Al ³⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	RAI et al., 1998
NAD ⁺ isocitrato desidrogenase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	DOMINGUEZ et al., 2003
NADH glutamato sintetase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	inalterado	DEVRIESE et al, 2001
NADP ⁺ isocitrato desidrogenase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	DOMINGUEZ et al., 2003
NADPH óxido redutase	Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺	<i>E. gracilis</i>	diminuição	VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990
Nitrato redutase	Al ³⁺ Zn ²⁺	<i>C. vulgaris</i> <i>S. capricornutum</i>	diminuição diminuição	RAI et al., 1998 KONG & CHEN, 1995
O-acetil-L-serina(tiol)liase	Cd ²⁺ Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i> <i>C. reinhardtii</i>	aumento inalterado	DOMINGUEZ et al., 2003 DEVRIESE et al., 2001
Peroxidase	Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺	<i>S. armatus</i>	aumento	EL ENANY & ISSA, 2001
Protoclorofilida redutase	Hg ²⁺ , Cd ²⁺	<i>E. gracilis</i>	diminuição	VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990
Protoporfirinogênio IX oxidase	Tiosemicarbazidas	<i>S. acutus</i>	diminuição	HIRAKI et al., 2001
Serina acetil transferase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	DOMINGUEZ et al., 2003
Superóxido dismutase	Cu ²⁺ Ni ²⁺	<i>G. tenuistipitata</i> <i>S. acutus</i>	aumento diminuição	COLLEN et al., 2003 RANDHAWA et al., 2001
Transaminase glutâmico oxaloacética	Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	FATHI, 2002
Transaminase glutâmico pirúvica	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	FATHI, 2002
Urease	Cu ²⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	RAI & RAI, 1997

1.3.2. Efeito de mistura de poluentes sobre as enzimas

A ação conjunta de agentes tóxicos sobre sistemas enzimáticos de mamíferos e outros organismos tem sido avaliada largamente em estudos *in vivo* (ASOKAN et al., 1985); AGUERO-ALVARADO et al., 1991); e *in vitro* (MARINOVICH et al. 1996; LEONOVA & SLYNKO, 1996; SIVORI et al., 1999).

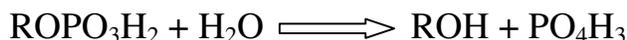
A literatura especializada disponibiliza uma série de dados a respeito dos efeitos *in vivo* da ação conjunta de poluentes de origem agrícola sobre atividade enzimática em organismos aquáticos, por exemplo, catalase de macrófitas (TEISSEIRE et al., 1998) e algas GEOFFROY et al., 2002); acetilcolinesterase de peixes (DENTON et al., 2003), dípteros (JIN-CLARK et al., 2002), anfípodos (STEEVENS & BENSON, 2000) e copépodos (FORGET et al., 1999); carboxilase de peixes (DENTON et al., 2003); ascorbato peroxidase, glutationa redutase, glutationa-S-transferase (GEOFFROY et al., 2002) e fosfatases (RUETER et al., 1987; RAI et al., 1998) de algas.

As interações de Al^{3+} e F^{-} sobre a nitrato redutase e ATPase (RAI et al., 1998); de Al^{3+} e F^{-} sobre a fosfatase alcalina (RAI et al., 1998) e dos herbicidas oxifluorfen e diuron sobre a catalase (GEOFFROY et al., 2002), respectivamente, são exemplos de sinergismo, aditividade e antagonismo em enzimas de algas cultivadas na presença desses agentes químicos.

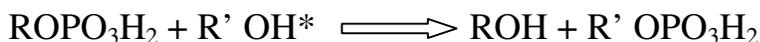
1.4. Fosfatases ácidas

As fosfatases ácidas ou ortofosfato mono éster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que se caracterizam pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfato e reações de transfosforilação (SAEED et al, 1990), como esquematizado a seguir:

Hidrólise:



Transfosforilação:



* acceptor com função álcool

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos (ROCHE, 1931), sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato em pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase alcalina de glóbulos brancos que catalisa essa reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0. Inicialmente a diferença entre as fosfatases ácidas e alcalinas era baseada somente no pH ótimo para a atividade enzimática. NEUMAN (1968) observou que o mecanismo de reação era diferente para as duas enzimas, onde a fosfatase ácida requeria para a sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. CHAIMOVICH & NOME (1970) relataram a atividade das fosfatases ácidas com ausência de cátions mono e bivalentes no meio de reação, enquanto as fosfatases alcalinas requerem metais, principalmente Mg^{2+} , para sua atividade.

1.4.1. Efeitos de poluentes sobre as fosfatases ácidas

Os lisossomos e membranas celulares são os primeiros alvos de efeitos de poluentes uma vez que os lisossomos estão associados com a desintegração de material estranho, e a membrana celular é a primeira barreira encontrada pelo xenobiótico. Muitos agentes tóxicos induzem alterações nas membranas lisossomais levando a sua desestabilização. Esta causa o extravasamento de enzimas hidrolíticas do compartimento lisossomal para o citosol. Portanto, a associação entre hidrolases lisossomais e a membrana lisossomal resulta em que a maior parte da atividade enzimática está normalmente em estado de latência, e que se por alguma razão a membrana lisossomal se desestabiliza, as enzimas extravasam para o citoplasma com conseqüente autólise celular.

A fosfatase ácida é considerada uma hidrolase lisossomal biomarcadora, sendo que em situações de “stress” celular, ocorre extravasamento da enzima para fluidos intracelulares e extracelulares ocasionando a alteração de seus níveis, que pode ser tratada como indicadora de tal “stress” (SURESH et al., 1993).

Na Tabela 3 estão apresentados alguns dados da literatura referentes à alteração da atividade desta enzima em alguns organismos, incluindo aquáticos. Entre estes, os peixes tem sido alvo de estudo em muitos trabalhos que tratam sobre os efeitos de poluentes na fosfatase ácida (Tabela 4), talvez pelo fato de serem os organismos mais representativos e de maior importância econômica nos ecossistemas aquáticos.

Tabela 3: Efeito de poluentes de origem agrícola na fosfatase ácida de organismos.

ORGANISMO	POLUENTE	SISTEMA DE EXPOSIÇÃO	ORIGEM	EFEITO NA ATIVIDADE	REFERÊNCIA
MAMÍFERO					
Homem	paraquat	<i>in vitro</i>	soro	inalterado	EL DEMERDASH et al., 2001
	glifosato	<i>in vitro</i>	soro	inalterado	
	cádmio	<i>in vitro</i>	soro	diminuição	
Rato albino	carbofuran	<i>in vitro e in vivo</i>	fígado e rim	aumento	KIRAN et al., 1988
	carbaril	<i>in vitro e in vivo</i>	fígado e rim	aumento	
AVE					
Galinha	piperofós	<i>in vivo</i>	fígado	aumento	SAFI, 1996
	pirazofós	<i>in vivo</i>	fígado	aumento	
<i>L. cahinnans</i>	cádmio, mecúrio, cobre	<i>in vivo</i>	fígado	aumento	BENKOEL et al., 2000
CRUSTACEO					
Camarão	aldrin , lindano	<i>in vitro</i>	vários tecidos	diminuição	REDDY & RAO, 1990
	metilparation	<i>in vivo</i>	hepatopâncreas	aumento	
	diclorvos	<i>in vivo</i>	vários tecidos	aumento	GERALDINE et al., 1999
	cipermetrina, endosulfan	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	ELSEBAE, 1996
	metomyl, clorpirifós	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	
Artemia	cipermetrina, endosulfan	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	
	metomyl, clorpirifós	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	
Caranguejo	monocrotofós	<i>in vivo</i>	vários tecidos	aumento	DE AND & SUR, 1990
MOLUSCO					
Bivalve	metais em estuário	<i>in vivo</i>	digestivo e rim	diminuição	TEH et al., 1999
	zinco, chumbo	<i>in vivo</i>	hemocitos	diminuição	GIAMBERINI & PIHAN, 1997
Gastrópodo	aldicarb, aldoxycarb	<i>in vivo</i>	organismo todo	diminuição	RADWAN et al., 1992
	metomyl, oxamyl	<i>in vivo</i>	organismo todo	diminuição	
	cobre	<i>in vivo</i>	hemolinfa	aumento	SURESH et al., 1993
INSETO					
Abelha	cobre	<i>in vitro</i>	intestino	aumento	BOUNIAS et al., 1996
NEMATÓIDE					
<i>T. globulosa</i>	tiabendazol	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	JASRA et al., 1990

(continua...)

Tabela 3: Efeito de poluentes de origem agrícola na fosfatase ácida de organismos.

(continuação...)

ORGANISMO	POLUENTE	SISTEMA DE EXPOSIÇÃO	ORIGEM	EFEITO NA ATIVIDADE	REFERÊNCIA
PLANTA					
Batata	carbaryl	<i>in vitro</i>	tubérculo	inalterado	GIANFREDA et al., 1993
	atrazina	<i>in vitro</i>	tubérculo	diminuição	
	LAS	<i>in vitro</i>	tubérculo	diminuição	TANAKA et al., 1975
Planta aquática	cobre	<i>in vitro</i>	organismo todo	inalterado	NAKAZATO et al., 1997
Milho	chumbo	-	folha	aumento	VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990
FUNGO					
<i>R. delemar</i>	cobre	<i>in vivo</i>	organismo todo	aumento	TSEKOVA & GALABOVA, 2003
<i>A. proliferiodes</i>	clortalonil	<i>in vitro</i>	organismo todo	aumento	EL HISSY et al., 1995
<i>D. sterilis</i>	clortalonil	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	
PROTOZOÁRIO					
<i>T. pyriformis</i>	cobre	<i>in vivo</i>	organismo todo	aum./dimin.	NICOLAU et al., 2004

Tabela 4: Efeito de poluentes de origem agrícola sobre a fosfatase ácida de peixes.

POLUENTE	SISTEMA DE EXPOSIÇÃO	TECIDO	ESPÉCIE	EFEITO NA ATIVIDADE	REFERÊNCIA
Mistura de pesticidas, metais, PCBs*, PAHs**	<i>in vitro</i>	hepatócitos isolados	<i>O. mykiss</i>	aumento	STRMAC & BRAUNBECK, 2000
Mistura de pesticidas, PCBs, PAHs	<i>in vitro</i>	hepatócitos isolados	<i>O. mykiss</i>	diminuição	STRMAC & BRAUNBECK, 2002
Carbofuran	<i>in vivo</i>	fígado	<i>C. punctatus</i>	aumento	RAM & SINGH, 1988
Aldicarb	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	intestino intestino	<i>P. conchoni</i> <i>P. conchoni</i>	inalterado inalterado	GILL et al., 1990a
Endosulfan	<i>in vivo</i> <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	fígado , músculo ovário ovário	<i>C. gachua</i> <i>P. conchoni</i> <i>P. conchoni</i>	diminuição aumento inalterado	SHARMA, 1990 GILL et al., 1990a
Quinalfós	<i>in vivo</i>	cérebro	<i>L. rohita</i>	aumento	DAS & MUKHERJEE, 2000
Cipermetrina	<i>in vivo</i>	fígado músculo	<i>L. rohita</i> <i>L. rohita</i>	diminuição inalterado	PHILIP & ANURADHA, 1996
Dimetoato	<i>in vivo</i>	fígado músculo	<i>L. thermalis</i> <i>L. thermalis</i>	aumenta aumenta	SHEELA & MUNIANDY, 1992
Malation	<i>in vivo</i>	fígado	<i>B. rerio</i>	diminuição	KUMAR & ANSARI, 1986
Toxafeno	<i>in vivo</i>	hepatócitos isolados	<i>P. ferrugineus</i>	aumento	FAHRAEUS & SPURRELL, 2000
Disulfoton + endosulfan	<i>in vivo</i>	fígado	<i>O. mykiss</i>	diminuição	ARNOLD et al., 1995
LAS	<i>in vivo</i>	brânquias, fígado intestino, rim	<i>C. carpius</i> <i>M. vittatus</i>	diminuição diminuição	MISRA et al., 1991a MOHAN & VERMA, 1981
Cobre	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i> <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	intestino intestino fígado fígado	<i>P. conchoni</i> <i>P. conchoni</i> <i>P. conchoni</i> <i>P. conchoni</i>	aumento inalterado inalterado diminuição	GILL et al., 1992
Cádmio	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	ovário ovário soro	<i>B. conchoni</i> <i>B. conchoni</i> <i>L. macrochirus</i>	aumento inalterado aumento	GILL et al., 1991 VERSTEEG & GIESY, 1986
Mercurio	<i>in vivo</i>	fígado, brânquias	<i>N. notopterus</i>	diminuição	VERMA et al., 1985

*Bifenilas policloradas

**Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

1.4.2. Fosfatases ácidas de algas

Os trabalhos sobre o aumento de síntese de fosfatases ácidas em algas pela ausência de fosfato inorgânico (Pi) no meio de cultura, assim como o estudo das propriedades destas fosfatases induzidas e das constitutivas, datam da década de 1960 em pesquisas realizadas com *Euglena gracilis* e *Chlorella pyrenoidosa* (BENNUN & BLUM, 1966; KNUTSEN, 1968).

A extração da fosfatase ácida de algas do gênero *Selenastrum* foi relatada por KONG & CHEN (1995) e KONG et al. (1998) utilizando tampão Tris-borato 0,1-0,3 M pH 7,5 e centrifugação a 10.000xg. Entretanto os autores não descreveram acerca do método de ruptura celular utilizado. Para este procedimento, técnicas que utilizam ultra-som foram descritas na extração de fosfatases das algas clorofíceas *Chlamydomonas* (LOPPES & MATAGNE, 1973; MATAGNE et al., 1976) e *Chlorella vulgaris* (RAI et al., 1998; SHIZHONG et al., 1997). PATNI & AARONSON (1974) usaram pérolas de vidro e centrifugação para extrair a enzima de *Ochromonas danica*. Esta enzima também pode ser extraída em uma preparação de pó cetônico quando um precipitado algáceo é tratado com acetona à temperatura de -20 a -30 °C (BENNUN & BLUM, 1966; KNUTSEN, 1968; LIEN & KNUTSEN, 1973).

A alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido adotada em vários trabalhos como organismo modelo para o estudo de fosfatases. Assim sendo, essa alga produz duas formas principais de fosfatases ácidas constitutivas que diferem quanto a sua sensibilidade à inativação térmica (LOPPES & MATAGNE, 1973), as quais estão invariavelmente presentes em células cultivadas na ausência ou presença de Pi com atividade máxima em pH de aproximadamente 5,0 (MATAGNE et al., 1976; BACHIR & LOPPES, 1997). Quando o extrato dessa mesma espécie, crescida na presença de Pi, é submetido à eletroforese de isoeletrofocalização, ocorre o aparecimento de três bandas referentes à fosfatases ácidas com diferentes valores de pontos isoeletrônicos (NAGY et al., 1981).

As fosfatases ácidas de algas também tem sido caracterizadas quanto a sua especificidade para diferentes substratos (YAMAMOTO, 1972; PATNI & AARONSON, 1974), efeito de metais na atividade (YAMAMOTO, 1972; PATNI & AARONSON, 1974), valor de Km para um dado substrato (LIEN & KNUTSEN, 1973; PATNI & AARONSON, 1974) e energia de ativação (BENNUN & BLUM, 1966; LIEN & KNUTSEN, 1973). Entretanto existe uma carência de informações na literatura quanto às propriedades destas enzimas, e sua utilização como bioindicadoras de efeitos de poluentes.

Em algas, as fosfatases ácidas estão localizadas em vários compartimentos celulares. Segundo COOPER et al. (1974), a enzima esta presente em vacúolos, dispersa no citoplasma e em pontos de degradação focal. A enzima também foi encontrada no complexo de Golgi (COOPER et al. 1974; TSEKOS & SCHNEPF, 1991), mitocôndria (TORNQVIST, 1989), membrana de tilacóides (TORNQVIST, 1989) sistema de endomembrana (DOMOZYCH, 1989), membrana externa (SOMMER & BLUM, 1965; TORNQVIST, 1989) e corpos-PAS (SCHMITTER & JURKIEWICZ, 1981). Segundo TORNQVIST (1989), a localização da atividade fosfatásica ácida é alterada do citoplasma para a parede celular quando algas clorofíceas são expostas a íons metálicos como o Al^{3+} .

Várias funções têm sido atribuídas a estas enzimas, tais como a participação em processos autofágicos digestivos e hidrólise de material fosfolipídico (COOPER et al. 1974); rompimento de plasmalema e absorção do flagelo durante a fertilização (BRATEN, 1975); reciclagem de Pi para sua reassimilação (DOMOZYCH, 1989; KRUSKOPF & DU PLESSIS, S., 2004); diferenciação dos esporos (TSEKOS & SCHNEPF, 1991); transporte de substâncias através de membranas (TORNQVIST, 1989) e disponibilidade de Pi a partir do meio extracelular (SOMMER & BLUM, 1965). Esta última função também é desempenhada pela fosfatase alcalina, cuja atividade é aumentada pela exposição das algas em um meio de cultura deficiente em Pi (VRBA et al., 1993; BACHIR, 1996; BACHIR & LOPPES, 1997).

1.4.2.1. Efeito de poluentes sobre as fosfatases ácidas de algas

PATNI & AARONSON (1974), estudando os efeitos *in vitro* em sistema pré-incubado, observaram que a fosfatase ácida intracelular extraída de *Ochromonas danica* é mais susceptível à inibição pelo Hg^{2+} , enquanto que a extracelular é mais sensível à inibição pelo Cu^{2+} . KONG et al. (1998) observaram uma correlação positiva entre o numero de átomos de halogênio em halogeno-benzenos e o decréscimo da atividade específica da fosfatase ácida em culturas de *Selenastrum capricornutum* contendo estes compostos.

Metais pesados considerados altamente tóxicos para algas, tais como o Hg^{2+} e Cu^{2+} demonstraram a capacidade de diminuir a atividade da fosfatase ácida destes organismos quando expostos à pequenas concentrações (ensaios *in vivo*). Assim, por exemplo, aproximadamente 90% desse parâmetro foi reduzido por 10 μM de Hg^{2+} em *Scenedesmus bijuga* (FATHI, 2002). O Cu^{2+} , por sua vez, diminui a atividade específica em *C. vulgaris* em aproximadamente 50%

quando a alga foi exposta a 31 μM (RAI et al, 1996). Porém, isto foi observado em culturas crescidas em pH 4,0, sendo que somente cerca de 20% da atividade foi afetada em pH 6,8.

Elementos metálicos com maiores concentrações permissíveis na água e maiores valores de concentração efetiva média (CE50) para algas também demonstraram alterar a atividade quando testados na concentração da ordem de 100 μM ou bem inferior a esta. Assim, o efeito na atividade específica pelo Zn^{2+} em estudos com *Scenedesmus obliquus* (OMAR, 2002) e *Selenastrum capricornutum* (KONG & CHEN, 1995) demonstraram que a diminuição de aproximadamente 50% desse parâmetro ocorre nas concentrações de 120 μM (10 dias de exposição) e 4 μM (4 dias de exposição), respectivamente. Porém, observa-se um aumento da atividade específica superior a 200% em *Scenedesmus quadricauda* exposta a 70 μM desse metal (OMAR, 2002).

Uma redução significativa, de aproximadamente 20% da atividade da enzima foi observada por RAI et al. (1998) em culturas de *Chlorella vulgaris* expostas a 150 μM de Al^{3+} durante 15 dias. A mesma porcentagem de redução obteve-se com uma concentração 1000 vezes menor desse metal em *S. capricornutum* exposta por 4 dias (KONG & CHEN, 1995). O Ni^{2+} , por sua vez, diminuiu a atividade específica em cerca de 20 % em *C. vulgaris* exposta a 34 μM (RAI et al., 1996), enquanto que o Pb^{2+} reduziu a atividade na ordem de 60% em *S. bijuga* exposta a 10 μM (FATHI, 2002).

O efeito interativo entre Al^{3+} e F^- sobre a fosfatases de *C. vulgaris*, cultivada na presença de ambos metais, demonstrou ser sinérgico para a forma ácida, enquanto que foi aditivo para a forma alcalina (RAI et al., 1998).

A alteração de fatores físico-químicos no meio de cultura, como a aplicação de radiação U.V.-B (RAI & RAI, 1997) e diminuição do pH (RAI et al., 1996), aumentaram o efeito inibitório do Cu^{2+} sobre a atividade específica da fosfatase ácida.

A maioria dos trabalhos sobre efeito de agentes tóxicos em fosfatases ácidas de algas relatam estudos *in vivo* com metais pesados, existindo uma carência de trabalhos *in vitro* (para metais e compostos orgânicos), e de estudos *in vivo* para poluentes orgânicos.

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos estudar uma metodologia para extrair a fosfatase ácida da alga *Selenastrum capricornutum*, caracterizar a enzima *in vitro* do ponto de vista cinético e realizar estudos *in vitro* e *in vivo* do efeito de agentes poluentes na atividade desta enzima.

Esta tese contém resultados referentes à extração da fosfatase ácida da alga *Selenastrum capricornutum* através de uma combinação das técnicas congelamento e descongelamento e ultrassom. Com o extrato contendo a fosfatase ácida foram realizados estudos de efeitos de agentes poluentes; com os compostos que apresentaram maior efeito foram determinados os parâmetros cinéticos tais como K_m , V_{max} , K_i , e energia de ativação. Realizou-se também um estudo sobre o efeito decorrente da ação conjunta de alguns destes agentes químicos sobre a enzima.

Finalmente, com resultados *in vivo* do efeito de compostos na atividade da enzima, procurou-se uma correlação com dados sobre ecotoxicidade de poluentes de origem agrícola.

3. METODOLOGIA

3.1. Extração e caracterização da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

3.1.1. Organismos e condições de cultivo

Selenastrum capricornutum foi obtida de culturas axênicas fornecidas pela CETESB e repicadas em meio líquido preparado tal como recomendado pela OECD (OECD, 1981) (Anexo 1). As culturas foram crescidas em erlenmeyers de 250 mL selados com tampões de algodão e 200 mL de meio esterilizado. Os recipientes foram incubados em ambiente com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) sob luz branca fluorescente contínua (3.000 – 4.000 lux) e agitadas manualmente duas vezes por dia. A cada 40 a 60 dias, novas culturas foram preparadas pela inoculação de aproximadamente 5×10^4 células.mL⁻¹ em novo meio de cultura.

As suspensões de algas, com um estimado número de células por mililitro, foram preparadas através da medida da absorvância de outras culturas que serviram como inóculo. Assim sendo, com base numa curva padrão previamente elaborada em função de número de células por volume (determinado através da microscopia óptica em câmara de Neubauer) e a absorvância a 750 nm (Anexo 2), um volume apropriado de inóculo foi calculado para a preparação da suspensão com concentração desejada.

3.1.2. Preparação dos extratos

Todos os procedimentos de centrifugação foram realizados a 4°C. As algas, estando em fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos em uma centrífuga refrigerada Beckman J2-21 (rotor SER# 7644, JA-20) e lavadas duas vezes com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0.

O precipitado algáceo ou suspensão algácea, preparados em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (1:4 peso/volume), foram submetidos aos seguintes procedimentos de extração da fosfatase ácida.

- a) Congelamento e descongelamento: a suspensão algácea foi congelada em freezer a -20°C , ou com N₂ líquido, e descongelada à temperatura ambiente.
- b) Congelamento (N₂ líquido) e maceração: o precipitado algáceo foi congelado com N₂ líquido em um almofariz de porcelana e macerado com pistilo, com auxílio de alíquotas de

tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, sendo o volume ajustado de modo a se obter uma suspensão 1:4 (peso/volume).

c) Sonicação em banho: a suspensão algácea foi sonicada durante 20 minutos em béquers de 10 mL, em um banho de ultra-som Thornton T7, na potência 12. A temperatura do banho foi controlada pela adição de gelo no mesmo.

d) Sonicação em sonicador: a suspensão algácea foi sonicada durante 50 segundos seguido do intervalo de 20 segundos (1 ciclo) em um sonicador Vibra Cell (Sonics Materials Inc.) na amplitude 70%. O processo foi repetido duas vezes e realizado em tubos acondicionados num recipiente com banho de gelo. Neste procedimento, também foi comparado o efeito de diferentes amplitudes de sonicação na extração da enzima.

As suspensões resultantes dos processos de ruptura celular acima mencionados foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos. O líquido sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para os ensaios de avaliação da atividade da fosfatase ácida.

3.1.3. Determinação da atividade da fosfatase ácida

A atividade foi rotineiramente avaliada em extratos obtidos por congelamento / descongelamento / sonicação (sonicador) e determinada, no mínimo, em duplicata através da incubação da enzima com p-NPP como substrato. Os ensaios foram conduzidos em um volume final de 1 mL contendo 0,1 M de tampão acetato de sódio (pH 5,0) e 10 mM do substrato, na temperatura de 37 °C.

A reação foi iniciada pela adição, ao sistema de reação, de um volume apropriado do extrato bruto contendo a enzima, ou do substrato, sendo que após 40 minutos a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de NaOH 1 M. O p-nitrofenol (p-NP) produzido foi medido a 405 nm em um espectrofotômetro UNICAM 8625 UV/VIS. A concentração de p-NP foi determinada usando-se o coeficiente de extinção molar equivalente a $18.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o que permitiu calcular a atividade em Unidades ($\mu\text{mol} \cdot \text{minuto}^{-1}$) por mL. A atividade específica foi expressa em Unidades por mg de proteína, sendo a concentração desta última determinada pelo método de LOWRY et al. (1951) e com albumina soro bovino como padrão.

A atividade enzimática para os vários ésteres de fosfato usados como substrato foi determinada pela liberação de fosfato inorgânico (Pi) (LOWRY & LOPEZ, 1945). A reação foi paralisada pela adição de molibdato de amônio 3% (em 0,2 M de tampão acetato de sódio, pH

5,0). A cor foi desenvolvida após 30 minutos da adição de ascorbato 2% e a absorvância lida em 700 nm.

3.1.4. Estabilidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* durante o armazenamento a baixa temperatura

A atividade enzimática do extrato foi medida em ambas condições de estocagem, freezer (-20 °C) e geladeira (5 °C) durante 6 meses.

3.1.5. Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

A atividade enzimática do extrato foi avaliada em uma faixa de pH de 3,1-10,0, utilizando-se os tampões citrato, acetato, Bis-Tris, imidazol e carbonato-bicarbonato, na concentração de 0,1 M.

3.1.6. Especificidade por substratos da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

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.

3.1.7. Efeito de inibidores na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

A atividade foi avaliada na ausência e na presença de duas concentrações (100 e 200 mM) de tartarato, fluoreto, fosfato inorgânico, e nas concentrações de 0,1 e 1,0 mM de p-cloromercúrio benzoato (p-CMB).

3.1.8. Determinação das constantes cinéticas da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

A avaliação da atividade enzimática na faixa de concentração de 0,05 – 10,0 mM de p-NPP como substrato permitiu calcular a constante de Michaelis-Mentem (K_m) e velocidade máxima (V_{max}), sendo estes parâmetros computados através do gráfico de Lineweaver-Burk.

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 p-NPP foi determinada em cinco temperaturas diferentes. A E_a ($\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$) foi calculada através da inclinação da reta obtida por regressão linear simples, sendo o valor da constante real dos gases R igual a $1,987 \text{ cal}\cdot\text{grau}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PRISTA et al., 1979).

3.2. Avaliação comparativa do efeito de poluentes na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

3.2.1. Agentes químicos

Soluções estoque dos compostos orgânicos, exceto glifosato e alquil benzeno linear sulfonado (LAS), foram preparadas em acetona (Merck). As soluções destes dois compostos, assim como dos metais pesados sob a forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram preparadas em água Milli-Q. Todos os agentes químicos testados como poluentes foram de grau P.A. ou cromatográfico.

3.2.2. Avaliação preliminar comparativa do efeito de poluentes na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

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 ou na concentração máxima do poluente na forma solúvel no sistema de reação, ou ainda, numa concentração apropriada que não promovia interferência na coloração.

Alíquotas de soluções estoque dos poluentes em acetona foram submetidas a uma leve corrente de N_2 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 era afetada por esta concentração de DMSO (Anexo 7). A efetividade do procedimento foi testada previamente verificando-se o efeito de alguns agrotóxicos na atividade de uma fosfatase ácida purificada de fígado de tubarão, como controle, sendo que esta enzima era fortemente inibida por alguns compostos, enquanto que outros não manifestaram efeito apreciável (Anexo 8).

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

3.3. Efeito de íons mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

3.3.1. Efeito da concentração e determinação das constantes de inibição (K_i)

A concentração de inibição média (CI50) e seu intervalo de confiança 95% foi calculada pelo ajuste dos dados das curvas de regressão obtidos pela determinação da atividade enzimática em função de diferentes concentrações do poluente inibidor. O ajuste dos dados foi realizado com base em resultados de experimentos realizados com dois extratos diferentes.

Para a determinação da K_i, a atividade foi avaliada numa faixa de concentração de p-NPP de 0,03-10,0 mM, na ausência ou na presença de três concentrações dos poluentes.

A K_i foi calculada com base nos parâmetros cinéticos obtidos do gráfico de Lineweaver-Burk, e nas equações 1 e 2, respectivamente, para a inibição competitiva e não-competitiva :

$$\text{inclinação} = (1 + [I] / K_i) K_m / V_{\text{max}} \quad (\text{equação 1})$$

$$\text{interseção} = 1 / V_{\text{max}} (1 + [I] / K_i) \quad (\text{equação 2})$$

onde [I] é a concentração do inibidor, e a inclinação e interseção são parâmetros da regressão linear simples.

3.3.2. Estudos *in vivo* do efeito de íons mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Suspensões de *S. capricornutum* com concentração de aproximadamente 5×10^6 células.mL⁻¹ foram expostas a cada poluente, os quais foram preparados em três ou cinco concentrações em meio OECD (Anexo 1). Os recipientes foram ensaiados juntamente com um controle (sem poluente) e foram incubados a 20 ± 2 °C (2.000 – 3.000 lux) durante 24 horas ou 7 dias. As suspensões de algas foram centrifugadas a 4.000 r.p.m. e o precipitado lavado, conforme citado anteriormente, seguido da ressuspensão em 3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A extração foi realizada por congelamento/descongelamento/sonicação, seguida de centrifugação a 10.000 r.p.m., e foram determinadas as atividades e atividades específicas pela produção de p-NP (60 minutos de incubação), conforme descrito anteriormente. A CE50 (concentração efetiva média) para os parâmetros bioquímicos estudados foi calculada pelo ajuste dos dados das curvas

de regressão obtidos pela determinação da atividade enzimática e concentração de proteína em função de diferentes concentrações do poluente.

3.4. Efeito de íons cobre na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

3.4.1. Efeito da concentração de íons cobre e do tempo de pré-incubação

A atividade foi determinada pré-incubando-se a enzima na ausência (controle) ou na presença de várias concentrações de Cu^{2+} . A concentração efetiva média (CE50) e seu intervalo de confiança 95% foram calculados conforme descrito anteriormente para a determinação da CI50.

A atividade remanescente, para diferentes períodos de pré-incubação, foi avaliada após a pré-incubação da enzima com o metal ou na ausência do mesmo.

3.4.2. Determinação de constantes cinéticas da fosfatase ácida na presença de íons cobre

A constante de dissociação para o Cu^{2+} ($K_d\text{Cu}^{2+}$) foi avaliada pelo gráfico de Lineaweaver-Burk, de acordo com o descrito por DIXON & WEBB (1979) e YOUNGS et al. (2000).

A K_m , V_{max} e E_a foram calculadas, conforme descrito anteriormente, em amostras contendo a enzima pré-incubada, na ausência, e na presença de 0,2 mM de Cu^{2+} .

3.4.3. Estudo *in vivo* do efeito de íons cobre na fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Suspensões de *S. capricornutum* com concentração de aproximadamente 5×10^6 células.mL⁻¹ foram expostas ao Cu^{2+} , o qual foi preparado em três concentrações em meio OECD. Os recipientes foram ensaiados juntamente com um controle (sem poluente) e foram incubados a 20 ± 2 °C (2.000 – 3.000 lux) durante 24 horas. As suspensões algáceas foram filtradas através de membranas Millipore com porosidade de 0,22 μm , sendo a biomassa lavada e ressuspensa em 3mL de tampão acetato de sódio pH 5,0. A preparação dos extratos, a avaliação da atividade e da atividade específica foram realizadas conforme descrito nos estudos *in vivo* com os outros poluentes.

3.5. Avaliação da ação conjunta do mercúrio, alumínio, cobre e LAS na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Nos estudos com as misturas $Hg^{2+}+LAS$ e $Hg^{2+}+Al^{3+}$, foram construídos isobogramas pelo gráfico da concentração dos poluentes que, isoladamente, ou em combinação (1:1), promoveram 50% de inibição (CI50) (MARKING, 1985). As concentrações de inibição fracionária (FICs) foram calculadas de acordo com LIRA et al. (2001) e definidas como:

$$FIC = (CI50)_{AB}/(CI50)_A + (CI50)_{Ba}/(CI50)_B$$

onde $(CI50)_A$ é o valor da CI50 do agente químico A, e $(CI50)_{AB}$ é a CI50 do mesmo agente na presença do agente B. Se o valor de FIC é $\leq 0,5$, um efeito sinérgico é diagnosticado; para $0,5 \leq FIC \leq 1$ o efeito é simplesmente aditivo, e para $FIC \geq 1,0$ os efeitos combinatórios são considerados antagônicos.

Nos estudos em que foi avaliada a influência do Cu^{2+} na inibição pelo Hg^{2+} ou LAS, o efeito destes dois últimos foi analisado na ausência ou na presença de 0,02 e 0,2 mM de Cu^{2+} .

A CI50 e seu intervalo de confiança 95% para estes ensaios foram calculados como descrito anteriormente.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelos módulos “Simple Regression” e “One Way ANOVA” contidos no software Statgraphics® Plus Version 2. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Nos estudos da avaliação da ação conjunta de poluentes, a CI50 teórica da mistura e seu intervalo de confiança foram calculados de acordo com TALLARIDA et al. (1989) e comparada com valores de CI50 de dados experimentais, de modo a se avaliar a significância estatística do efeito interativo. Os valores de CI50 foram considerados significativamente diferentes um do outro quando seus intervalos de confiança não apresentaram sobreposição (CZUCZWAR et al., 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Extração da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

A alga verde *S. capricornutum* foi submetida a diversos métodos para extração da fosfatase ácida. Os dados da Tabela 5 demonstram que o congelamento com N₂ líquido com posterior maceração proporcionou maior rendimento na extração da enzima, comparativamente aos outros procedimentos testados.

Os resultados também demonstram que em média, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes na atividade enzimática nas amostras submetidas ao ultra-som (sonicador) com relação às amostras não tratadas ou submetidas ao banho de ultra-som, que renderam baixa porcentagem de extração (~ 20%).

Tabela 5 - *Rendimento de extração da fosfatase ácida de S. capricornutum através de diferentes métodos*. A absorvância no método que proporcionou maior extração foi tomada como 100% de rendimento, sendo que os outros valores foram considerados porcentagens deste valor.

Método	Rendimento (% ± d.p.)
Congelamento (N ₂ líquido)/Maceração	100,00 ± 4,54
Congelamento (-20 °C)/Descongelamento/Sonicação (sonicador)	81,95 ± 18,85
Congelamento (-20 °C)/Descongelamento/Sonicação (banho de ultra-som)	22,70 ± 1,33
Congelamento (N ₂ líquido)/Descongelamento	18,58 ± 2,21
Congelamento (-20 °C)/Descongelamento	16,55 ± 1,39

A Figura 2 mostra que a inserção do procedimento congelamento/ descongelamento entre os ciclos de sonicação aumenta notavelmente o rendimento da extração, e que este aumento é superior ao observado quando só se dobra o número de ciclos de sonicação.

A Figura 3 mostra que ocorreu um aumento gradual da eficiência da extração da enzima em função do valor de amplitude utilizada no sonicador, constatando-se que o uso deste aparelho na amplitude equivalente a 70% proporciona a maior atividade enzimática nos extratos. Por outro lado, o aumento da amplitude para o valor equivalente a 90%, leva a uma diminuição de 54 % do rendimento da extração.

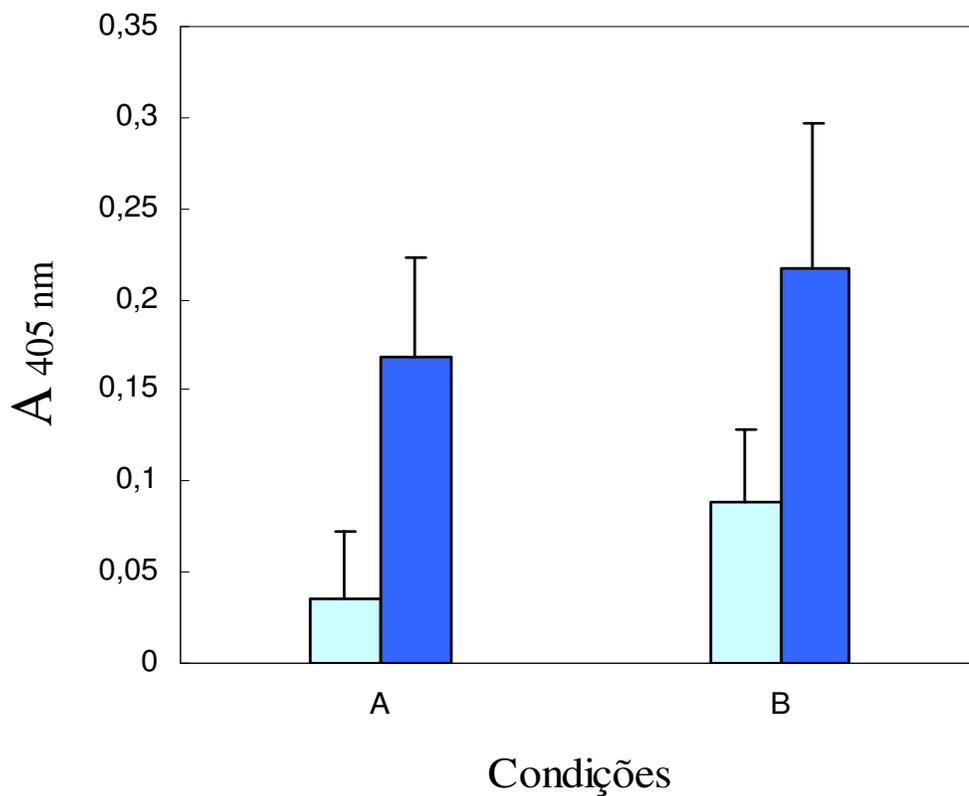


Figura 2 - *Extração da fosfatase acida de S. capricornutum*

A alga *S. capricornutum* foi submetida ao ultra-som (sonicador) por 3 ciclos (A) ou 6 ciclos (B), sem (■) ou com posterior congelamento/descongelamento (■). A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, utilizando-se p-NPP como substrato.

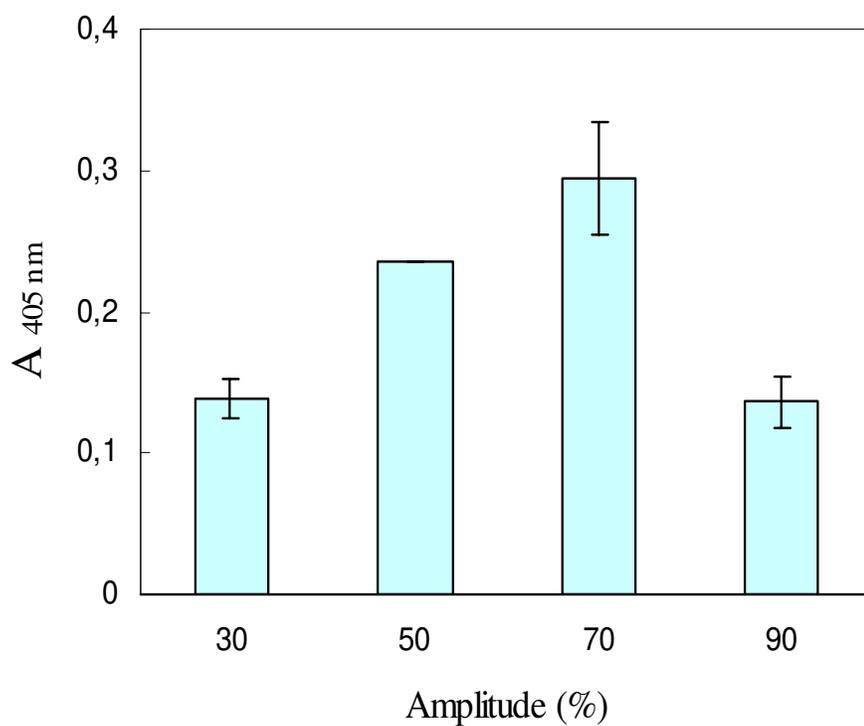


Figura 3 - *Efeito da amplitude de sonicação na extração da fosfatase acida de S. capricornutum.*

A alga *S. capricornutum* foi submetida ao ultra-som (sonicador) nas amplitudes 30, 50, 70 e 90%. A atividade da fosfatase ácida foi determinada nos extratos utilizando-se p-NPP como substrato, como descrito em Métodos.

4.2. Caracterização da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

4.2.1. Estabilidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* durante o armazenamento a baixa temperatura

Uma perda da atividade enzimática de aproximadamente 85% foi observada após o acondicionamento da enzima a 5 °C durante 6 meses (Figura 4). A atividade enzimática foi mantida durante o armazenamento do extrato em freezer (-20 °C), para o mesmo período de experimentação.

4.2.2. Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

A enzima demonstrou atividade na faixa de pH de 3,0 a 7,5, com um pH ótimo em 5,0 (Figura 5). A partir do pH 6,0, a atividade caiu abruptamente. Uma diferença de atividade de cerca de 35% foi observada entre o pH 5,0 e 3,1, enquanto que uma diferença de aproximadamente 80% foi constatada entre o pH 5,0 e 7,3.

4.2.3. Especificidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Os resultados da Figura 6 indicam que os substratos p-NPP, β -naftil-fosfato, flavina mononucleotídeo (FMN), frutose-1,6-difosfato e α -glicero-fosfato foram eficientemente hidrolisados pela enzima. Outros substratos como tirosina-P, ribose-5-P e 5'AMP apresentaram apreciável taxa de hidrólise, porém inferior aos anteriores, com porcentagens superiores a 64%. Por outro lado, serina-P, treonina-P e α -D-glicose-1-P mostraram baixa taxa de hidrólise, inferiores a 20 %, quando comparado com o p-NPP.

4.2.4. Efeito de inibidores de fosfatases

O fluoreto demonstrou ser o inibidor mais efetivo, enquanto que o tartarato promoveu baixo grau de inibição (Figura 7).

Os inibidores tartarato, fluoreto, e Pi, na concentração de 200 mM, inibiram a fosfatase ácida de *S. capricornutum* cerca de 35, 75 e 45% sendo que p-CMB, na concentração 1 mM, inibiu cerca de 48%.

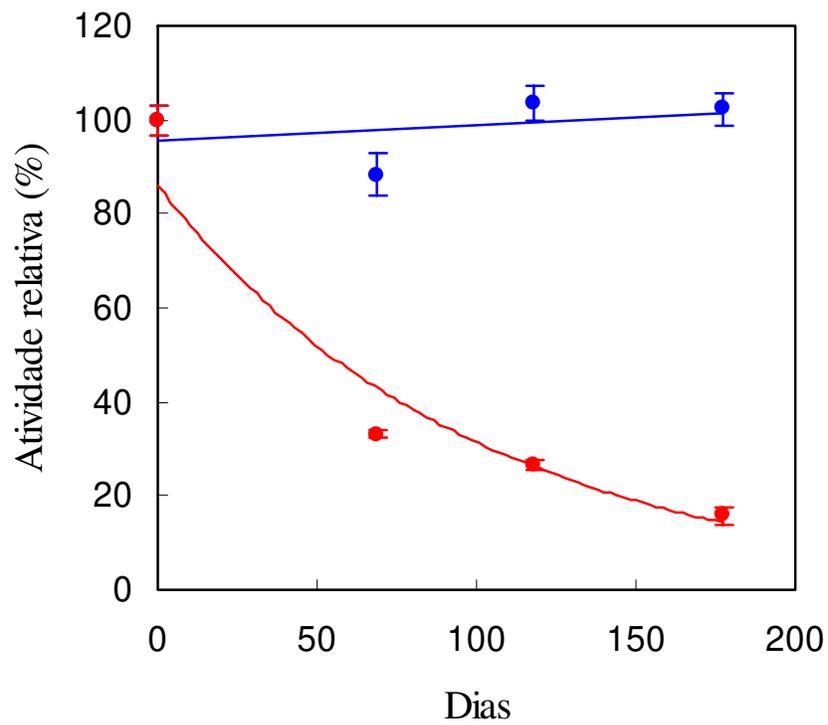


Figura 4 - *Estabilidade da fosfatase ácida de S. capricornutum*

Alíquotas dos extratos foram analisadas periodicamente, durante o armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (-●-) e a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (-●-), através das medidas das atividades enzimáticas remanescentes, utilizando-se p-NPP como substrato. A atividade medida no início do estudo foi considerada como 100%.

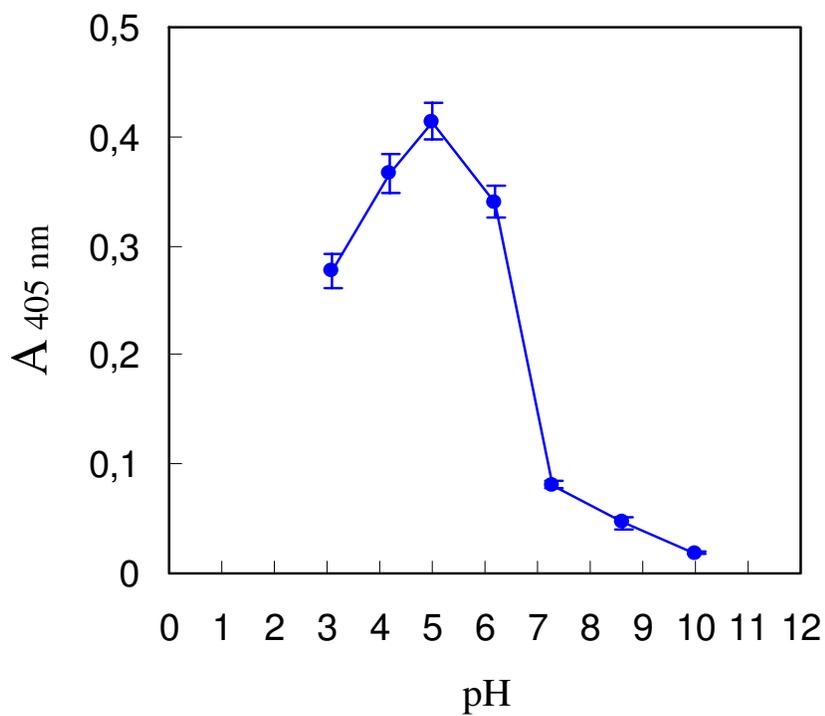


Figura 5 - *Curva de pH em função da atividade da fosfatase ácida de S. capricornutum.*
A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos utilizando-se p-NPP como substrato, nos seguintes tampões na concentração final de 0,1 M: citrato (pH 3,1), acetato (pH 5,0), Bis-Tris (pH 6,2), imidazol (pH 7,3), Tris-HCl (pH 8,6) e carbonato-bicarbonato (pH 10,0).

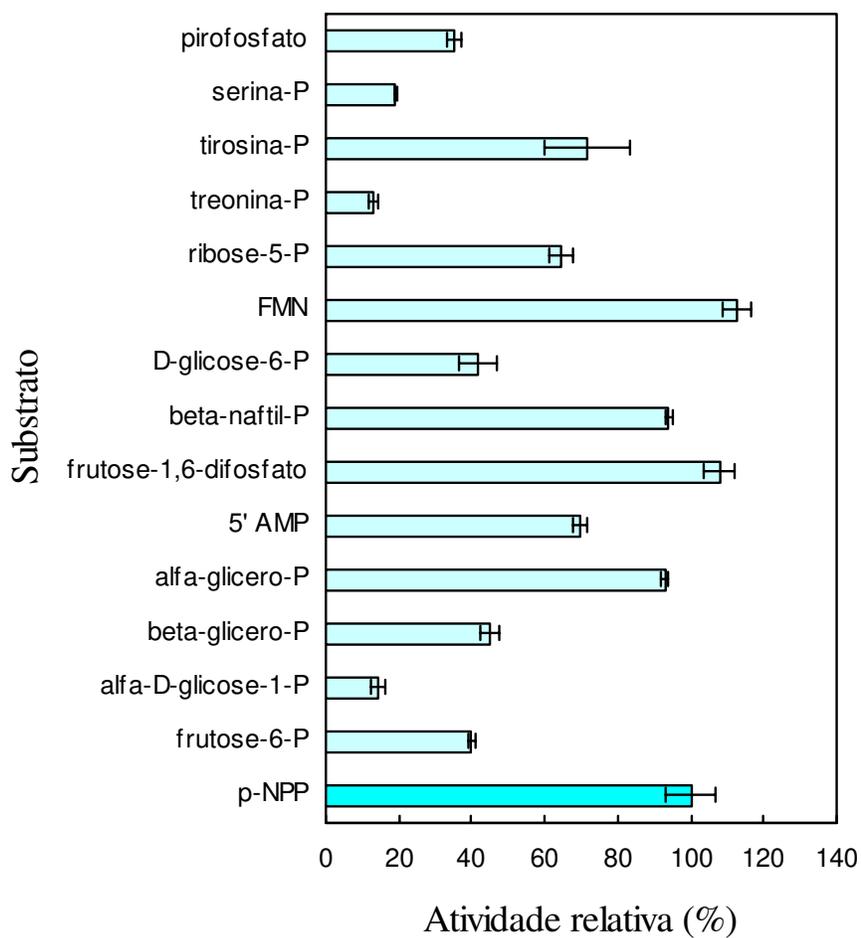


Figura 6 - *Especificidade pelo substrato da fosfatase ácida de S. capricornutum.*

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, utilizando-se cada um dos substratos indicados, medindo-se a liberação de Pi. A hidrólise do p-NPP (10 mM) foi considerada como 100%, e os outros valores como porcentagens deste valor.

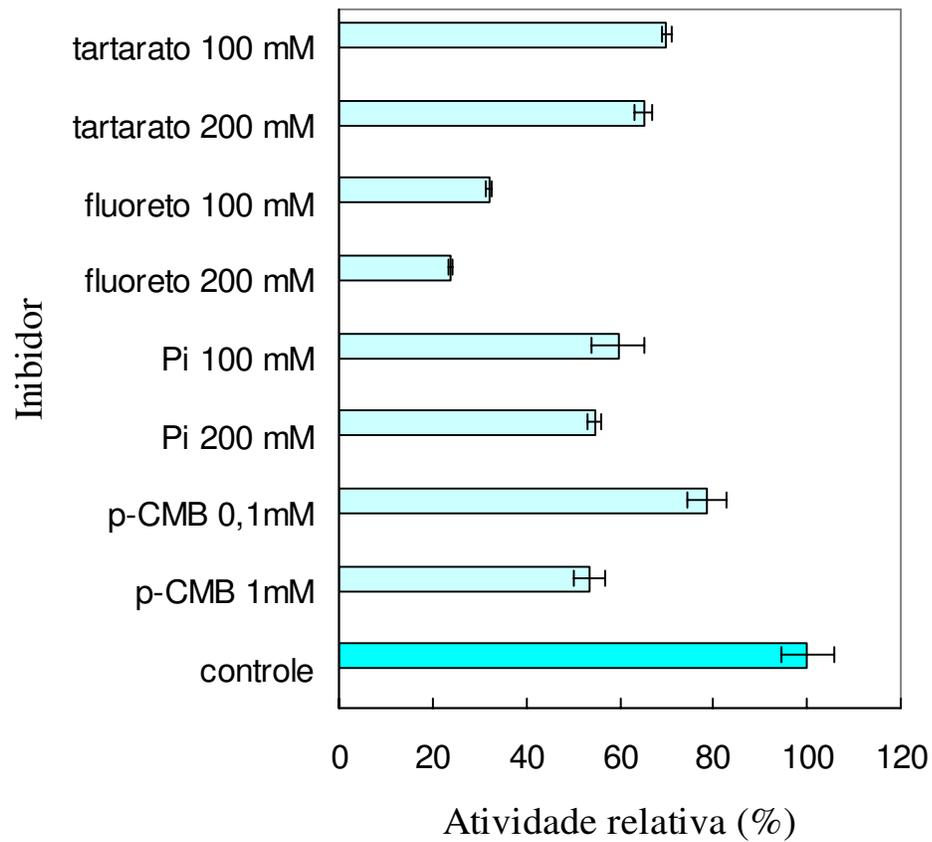


Figura 7 - Efeito de inibidores de fosfatase sobre a atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.

A atividade foi medida através da adição de 10 mM de p-NPP como substrato, nas condições descritas em Métodos, na ausência e em presença de cada um dos inibidores indicados. A taxa de hidrólise na ausência do inibidor foi considerada como 100%, e os outros valores com porcentagens deste valor.

4.2.5. Determinação das constantes cinéticas da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Quando a atividade da enzima foi medida em várias concentrações de p-NPP, o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk gerou uma reta (Anexo 5) que permitiu calcular os valores de Km e Vmax (\pm desvio padrão), equivalentes a $0,27 \pm 0,02$ mM e $37,20 \pm 2,25$ mU.mg proteína⁻¹, respectivamente (Tabela 6).

A energia de ativação foi determinada a partir da inclinação da reta obtida no gráfico de Arrhenius (Anexo 6), através da variação de temperatura de 27,5 – 47,0 °C. Foi obtido um acréscimo da atividade, com um fator médio de 1,6 para cada 10 °C de aumento da temperatura. A Ea (\pm desvio padrão) calculada foi equivalente a 9.066 ± 589 cal.mol⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6 - *Parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de S. capricornutum.*

Os valores de Km e Vmax foram obtidos do gráfico de Lineweaver-Burk (Anexo 5) e o de energia de ativação, através do gráfico de Arrhenius (Anexo 6), como descrito em Métodos, utilizando-se p-NPP como substrato.

PARÂMETRO	VALOR
Km (mM)	$0,27 \pm 0,02$
Vmax (mU.mg ⁻¹)	$37,20 \pm 2,25$
Ea (cal.mol ⁻¹)	9.066

4.3. Avaliação preliminar comparativa do efeito dos diversos poluentes na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Na Figura 8 pode-se observar os efeitos de 24 compostos orgânicos e de 6 metais na hidrólise do p-NPP pela fosfatase ácida de *S. capricornutum*. Entre todos os compostos testados, somente 4 poluentes exibiram efeito marcante ($\geq 50\%$) na atividade da enzima. Esta foi mais afetada pelo Cu²⁺ e LAS que promoveram 125% de ativação e 86% de inibição, respectivamente. Um grau similar de inibição, de aproximadamente 50%, foi demonstrado pelo Hg²⁺ e Al³⁺.

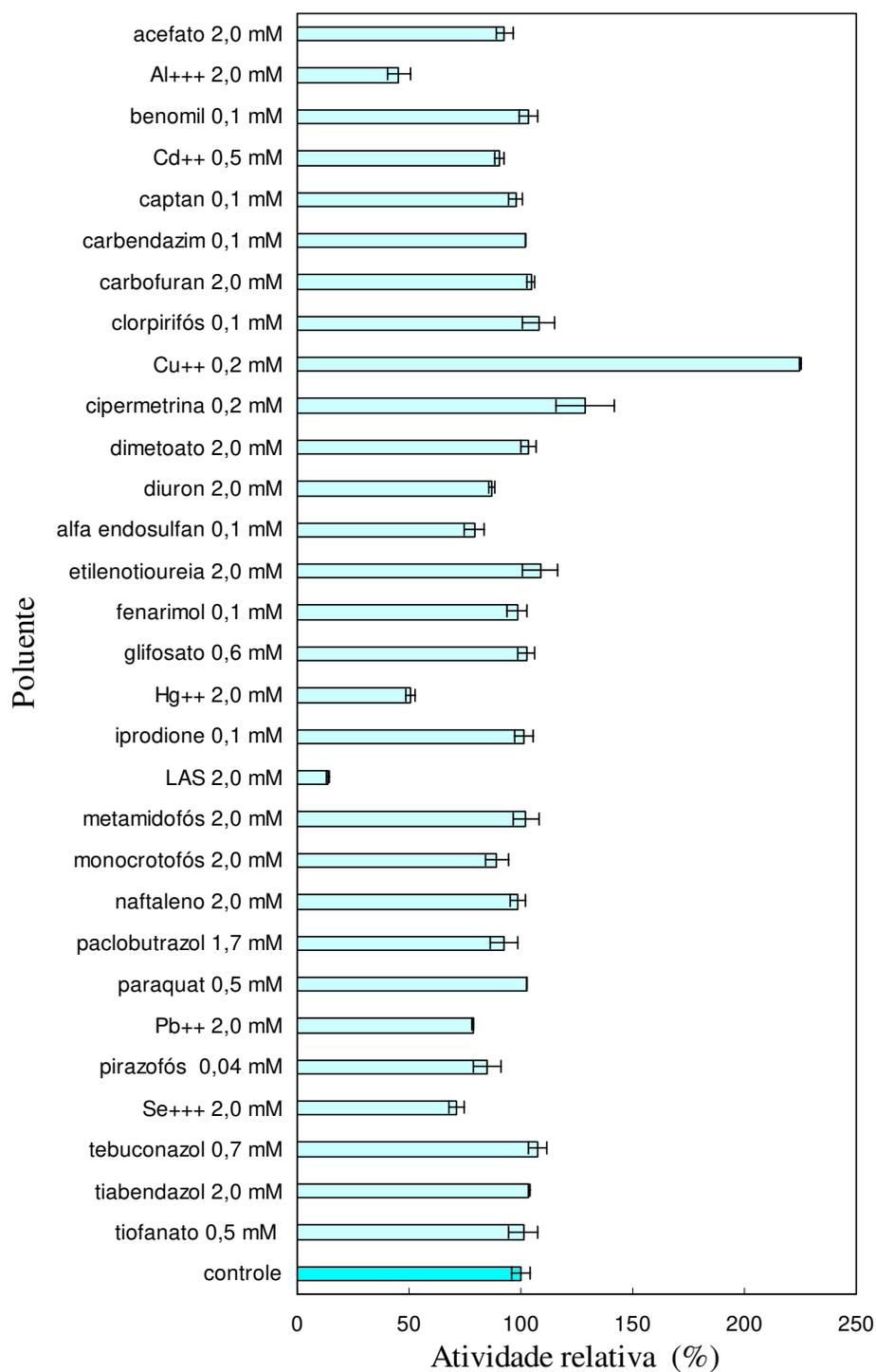


Figura 8 - Atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* afetada por poluentes orgânicos e inorgânicos de origem agrícola.

A enzima foi pré-incubada por 20 min à 37 °C na presença de cada um dos compostos indicados, e a atividade foi determinada utilizando-se p-NPP como substrato, nas condições descritas em Métodos.

Visto que os contaminantes do LE, de um modo geral, foram os agentes químicos que promoveram maior efeito inibitório sobre a atividade da fosfatase ácida, este efeito foi estudado em três concentrações de cada agente químico (Tabela 7). Pode se observar que o Cd^{2+} , Hg^{2+} , Se^{3+} e LAS inibiram a atividade enzimática significativamente ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas. O Al^{3+} promoveu mais de 50% de inibição significativa, porém somente na maior concentração testada. O Pb^{2+} inibiu aproximadamente 25% da atividade na concentração de 2 mM, entretanto este efeito não demonstrou ser estatisticamente significativo.

Tabela 7 - Atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* na presença de diferentes concentrações de alguns poluentes.

A atividade na ausência de poluente foi considerada como controle (100%).

* decréscimo significativo ($p < 0,05$) da atividade em relação ao controle.

Poluente	Concentração (mM)	Atividade relativa (% \pm d.p.)
Al^{3+}	0,02	106,50 \pm 2,56
	0,2	94,89 \pm 2,90
	2	45,48 \pm 5,03*
Cd^{2+}	0,02	88,85 \pm 3,46*
	0,2	92,42 \pm 1,20*
	0,5	88,94 \pm 2,34*
Hg^{2+}	0,02	80,27 \pm 4,83*
	0,2	62,29 \pm 5,80*
	2,0	43,66 \pm 9,15*
Pb^{2+}	0,02	97,06 \pm 4,35
	0,2	98,35 \pm 1,97
	2	74,48 \pm 6,23
Se^{3+}	0,02	89,56 \pm 1,02*
	0,2	78,66 \pm 3,20*
	2	76,92 \pm 7,92*
LAS	0,02	89,41 \pm 4,75*
	0,2	49,24 \pm 1,19*
	2	13,95 \pm 0,71*

Os resultados demonstram, portanto, que o maior efeito inibitório é atribuído ao Al^{3+} , Hg^{2+} e LAS, e que a ordem de inibição na maior concentração testada é $\text{LAS} > \text{Hg}^{2+} = \text{Al}^{3+} > \text{Se}^{3+} = \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. Com relação aos primeiros dois poluentes, uma apreciável inibição também foi observada na concentração de 0,2 mM, da ordem de 40 e 50% respectivamente, para o Hg^{2+} e LAS.

4.4. Efeito de íons mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida e nas culturas de *S. capricornutum*

4.4.1. Estudos *in vitro* do efeito de íons mercúrio e do LAS na fosfatase ácida

4.4.1.1. Determinação da CI50 dos poluentes mercúrio e LAS

Os resultados apresentados na Tabela 7 indicaram que a inibição pelo LAS e Hg^{2+} , que demonstraram ter maior poder inibitório, era dependente da concentração, e que valores superiores e inferiores a 50% de efeito foram observados. Com base nestas observações, a inibição foi avaliada para várias concentrações de Hg^{2+} ou LAS, para se calcular o valor da CI50. Neste caso, os dados foram computados com base em experimentos em que dois extratos de diferentes culturas de algas foram expostos a diferentes concentrações de Hg^{2+} ou LAS. Os dados obtidos foram ajustados por regressão linear que gerou uma curva tipo log-x ($y = a + b \ln(x)$) para Hg^{2+} e uma curva tipo recíproco-y ($y = 1/(a + b)$) para LAS (Figuras 9 e 10). Os valores de CI50 e seus intervalos de confiança 95% foram 0,0852 (0,0639-0,117) e 0,289 (0,243-0,326) mM, respectivamente, para Hg^{2+} e LAS.

4.4.1.2. Determinação da Ki dos poluentes mercúrio e LAS

Nestes estudos, a concentração de Hg^{2+} ou LAS foi mantida em três concentrações diferentes, enquanto que a concentração do substrato [S] foi variada, permitindo a medida da atividade com o aumento da concentração de substrato (Figuras 11 e 12). O gráfico de Lineweaver-Burk para Hg^{2+} (Figura 11) é consistente com uma inibição do tipo não competitiva, sendo o valor de K_i calculado para o Hg^{2+} equivalente a $0,0365 \pm 0,0158$ mM. Para o LAS (Figura 12), a inibição foi do tipo competitiva, com um valor de K_i equivalente a $0,0100 \pm 0,0047$ mM.

Fig. 9

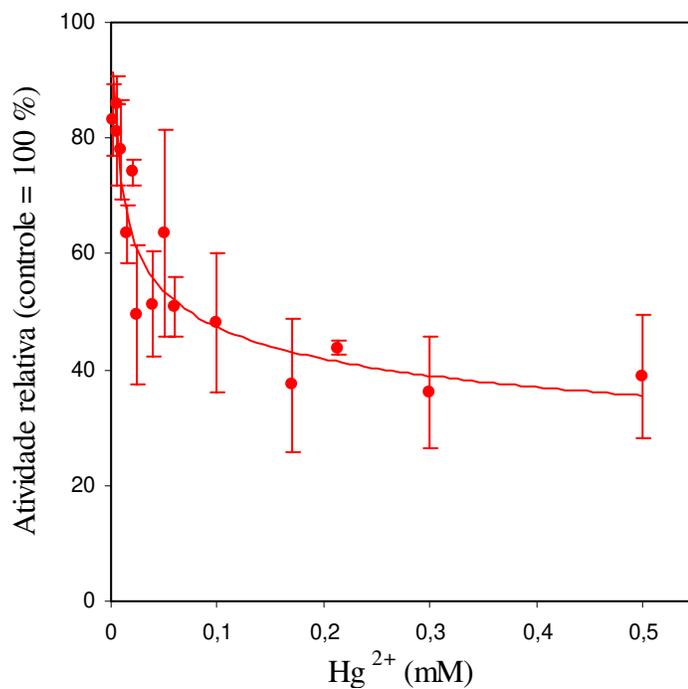
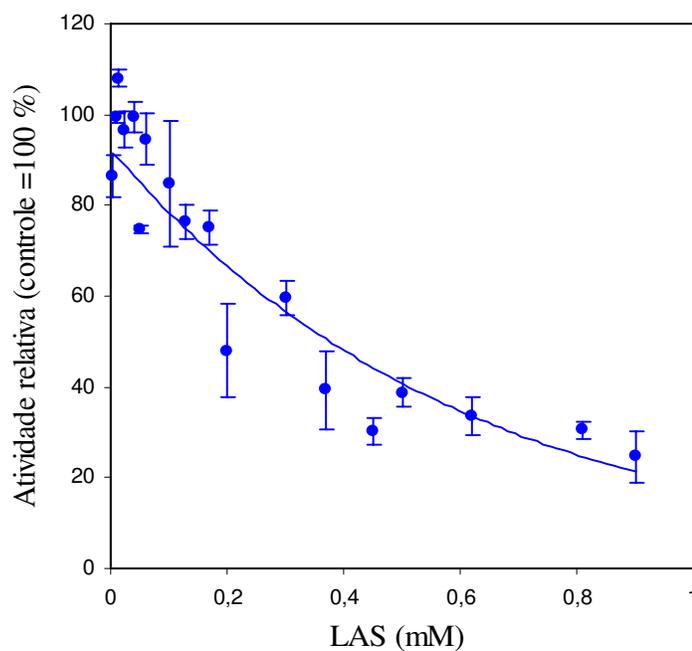


Fig. 10



Figuras 9 e 10 - Efeitos das concentrações do íon mercúrio e do LAS na atividade de fosfatase ácida de *S. capricornutum*. A atividade enzimática foi determinada por incubação da enzima (40 min, 37 °C), em presença de diferentes concentrações dos poluentes, utilizando-se p-NPP como substrato. Os resultados para cada agente químico são referentes a dois experimentos com dois extratos diferentes.

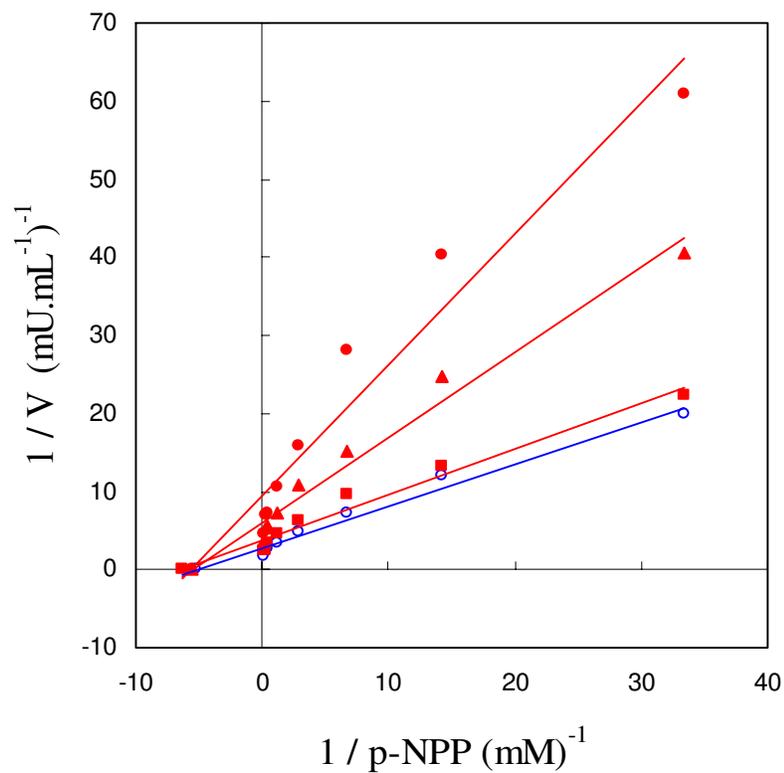


Figura 11 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da K_i do mercúrio na inibição da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se a concentração de p-NPP na ausência (\circ), e em presença de 0,01 (\blacksquare), 0,03 (\blacktriangle) e 0,13 (\bullet) mM de Hg^{2+} .

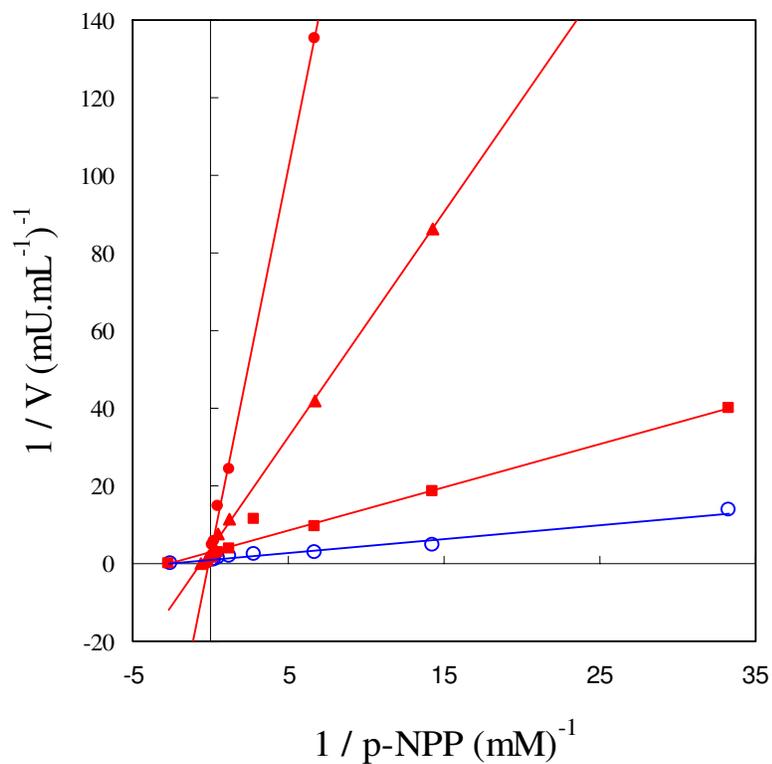


Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da K_i de LAS na inibição da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se a concentração de p-NPP na ausência (\circ), e em presença de 0,1 (\blacksquare), 0,2 (\blacktriangle) e 0,3 (\bullet) mM de LAS.

4.4.2. Estudos *in vivo*

4.4.2.1. Efeitos da exposição de culturas de *S. capricornutum* ao íon mercúrio

No estudo de exposição a curto prazo, as culturas de *S. capricornutum* mantidas em meio OECD foram suplementadas com HgCl_2 numa faixa de concentração final de 10-242 μM de Hg^{2+} . Para este período, observou-se um decréscimo significativo da atividade enzimática que foi dependente da concentração e que permitiu calcular uma CE50-24h igual a 54,43 (34,09-75,00) μM (Figura 13). De um modo concomitante, a diminuição do conteúdo de proteína na concentração de 23 μM e concentrações superiores a esta foi observado, calculando-se uma CE50-24h equivalente a 23,87 (2,12-43,61) μM para este efeito. O aumento da atividade específica foi observado nas concentrações de 23-242 μM , porém foi estatisticamente significativo somente na maior concentração testada.

A diminuição da atividade da fosfatase acida foi também observada em culturas expostas durante 7 dias a três concentrações do metal (Figura 13). A diminuição de 40 e 70% da atividade foi observada na menor e maior concentração testada, respectivamente. Os dados permitiram calcular uma CE50-7d equivalente a 7,96 (5,00-9,72) μM para esta inibição. Um leve decréscimo da concentração de proteína em relação aos controles foi observado em todas as concentrações de Hg^{2+} , entretanto foi significativo somente nas concentrações de 5 e 15 μM . Devido a esta pequena diminuição da concentração de proteína, uma marcante diminuição da atividade específica foi observada nas concentrações de 10 e 15 μM . A CE50-7d calculada para esta inibição foi equivalente a 12,63 (9,78-17,61) μM .

4.4.2.2. Efeitos da exposição de culturas de *S. capricornutum* ao LAS

Após as 24 horas de exposição das células de *S. capricornutum* ao LAS foi observado aumento da atividade da fosfatase ácida dependente da concentração (Figura 14). Este efeito foi significativo a 10 mM e foi também observado para o conteúdo de proteína do extrato. A CE50-24h calculada para o aumento da atividade e conteúdo de proteína foi de 5,25 (3,10-7,60) e 5,62 (3,54-10,20) mM, respectivamente. Não foi notada nenhuma variação da atividade específica em relação aos controles em todas as concentrações de LAS testadas.

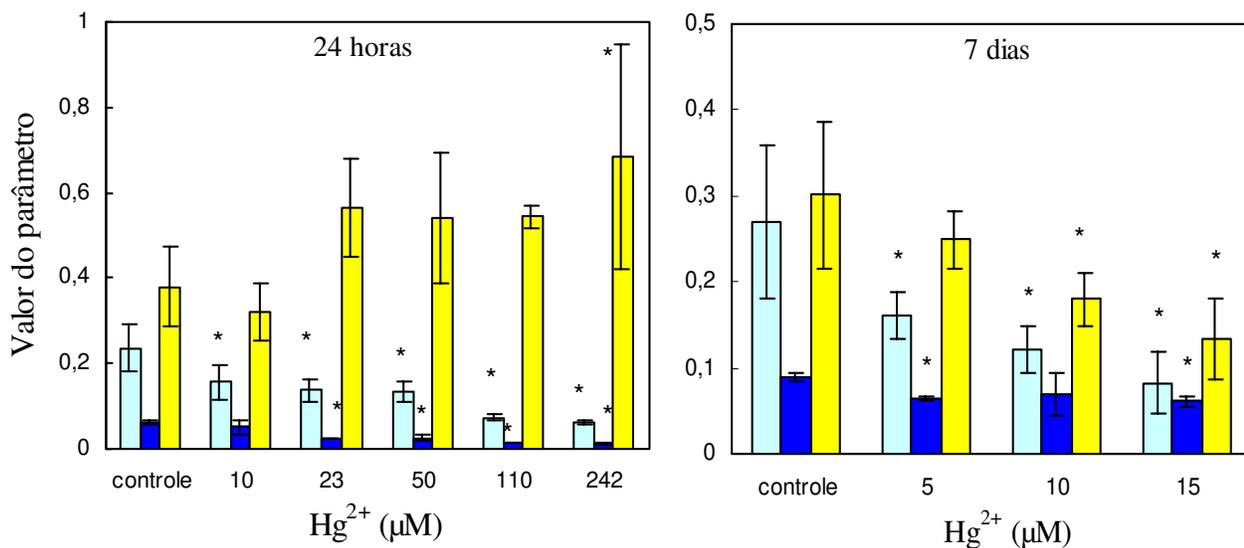


Figura 13 - *Parâmetros bioquímicos em culturas de S. capricornutum expostas ao íon mercúrio.* Atividade de fosfatase ácida (■) (U.mL⁻¹ x100), concentração de proteína (■) (mg proteína . mL⁻¹) e atividade específica (■) (U. mg proteína⁻¹ x10) foram determinadas em extratos de culturas crescidas em meio OECD após 24 horas e 7 dias. Os resultados são referentes à média e desvio padrão de no mínimo dois experimentos com análises em duplicata.

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

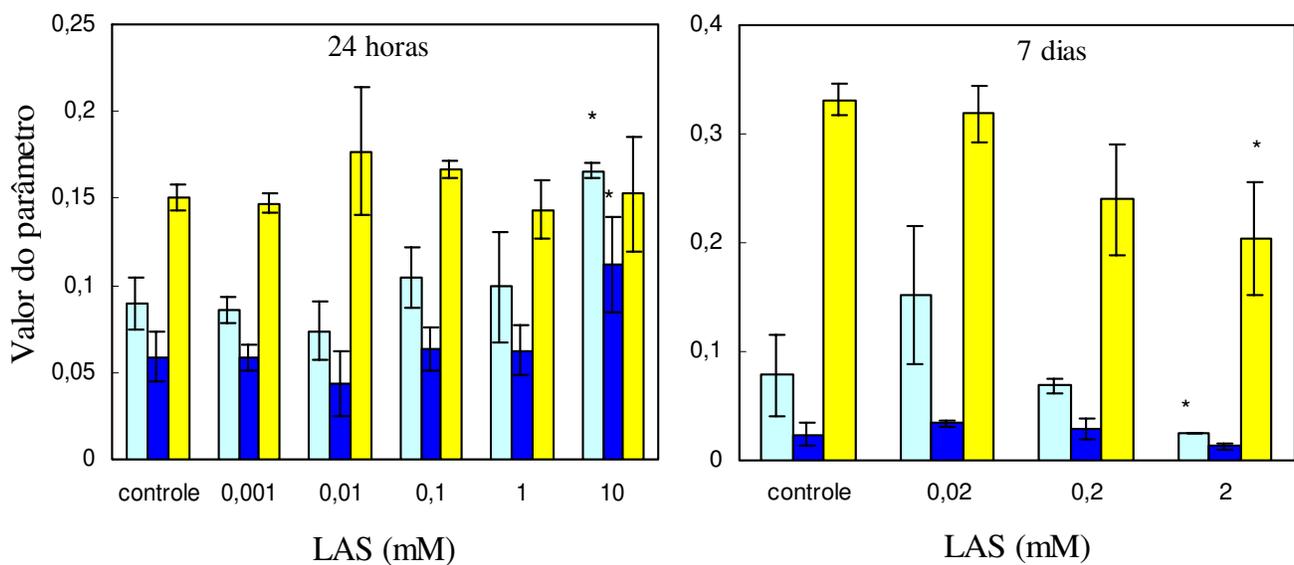


Figura 14 - *Parâmetros bioquímicos em culturas de S. capricornutum expostas ao LAS.* Atividade de fosfatase ácida (■) (U.mL⁻¹ x100), concentração de proteína (■) (mg proteína . mL⁻¹) e atividade específica (■) (U. mg proteína⁻¹ x10) foram determinadas em extratos de culturas crescidas em meio OECD após 24 horas e 7 dias . Os resultados são referentes à média e desvio padrão de no mínimo dois experimentos com análises em duplicata.

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

Um aumento da atividade da fosfatase ácida foi observado na concentração de 0,02 mM após 7 dias de exposição, porém não significativa (Figura 14). Por outro lado, uma diminuição significativa foi observada em 2 mM de LAS. Não foram evidenciadas alterações no conteúdo de proteína com relação ao controle nas concentrações de LAS testadas. Portanto, uma diminuição na atividade específica ocorreu na maior concentração.

4.5. Efeito do íon cobre na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

4.5.1. Estudos *in vitro* do efeito do íon cobre na fosfatase ácida de *S. capricornutum*

4.5.1.1. Efeito da concentração do cobre e afinidade da fosfatase ácida pelo íon metálico

A atividade enzimática em função da concentração de íons cobre para amostras pré-incubadas e não pré-incubadas com a fosfatase ácida é mostrada na Figura 15. Um aumento na atividade enzimática foi observado por pré-incubação da enzima com Cu^{2+} até uma concentração de 0,05 mM, a partir da qual a velocidade permaneceu constante. A curva resultante permitiu calcular uma CE50 e seu intervalo de confiança 95% referente a esse efeito equivalente a 1,80 (1,64-1,90) μM de Cu^{2+} .

Por outro lado, na ausência de uma pré-incubação com a enzima, Cu^{2+} não mostrou efeito significativo na reação de hidrólise de p-NPP (Figura 15, gráfico interno). Deste modo não foi possível calcular o valor de CE50 para estes tratamentos.

O gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk (Anexo 9), permitiu calcular o valor de $1,64 \pm 0,14 \mu\text{M}$ para a constante de dissociação enzima- Cu^{2+} (KdCu^{2+}) (Tabela 8).

Todos os experimentos com o íons cobre descritos a seguir foram realizados por pré-incubação com a enzima.

4.5.1.2. Efeito do íon cobre na estabilidade térmica da enzima

Estudos de estabilidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* à 37 °C mostraram que a presença de 0,2 mM Cu^{2+} protegia a enzima da desnaturação térmica, com preservação de sua atividade pelo menos até 60 min (Figura 16). Por outro lado, na ausência do metal, observava-se uma perda de 62% da atividade neste período de tempo.

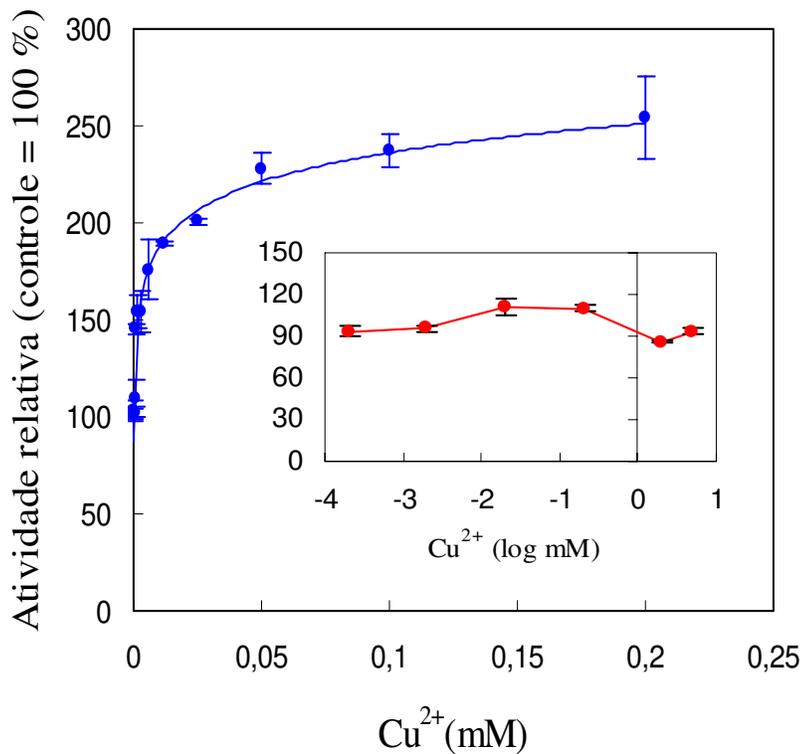


Figura 15 - *Efeito da concentração de íons cobre na atividade da fosfatase ácida de S. capricornutum.*

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

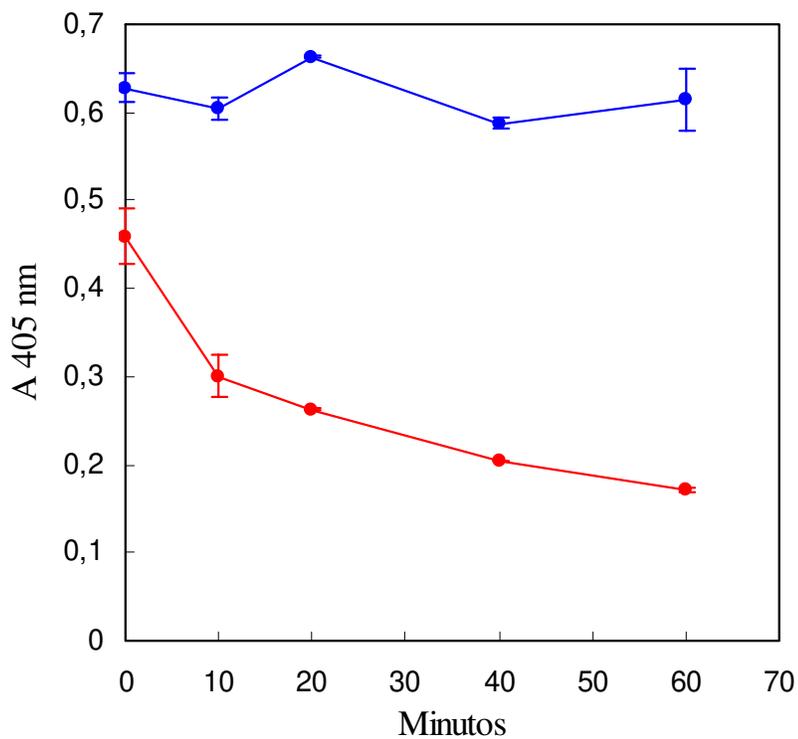


Figura 16 – *Efeito de íons cobre na estabilidade da fosfatase ácida de S. capricornutum.* A enzima foi pré-incubada à 37 °C na ausência (-●-) ou em presença de 0,2 (-●-) mM de Cu²⁺, nos tempos indicados. Após cada tempo de pré-incubação determinou-se a atividade enzimática remanescente, utilizando-se p-NPP como substrato.

4.5.1.3. Efeito do íon cobre nos parâmetros cinéticos Km e Vmax

Os parâmetros cinéticos Km e Vmax, para o substrato p-NPP, foram determinados a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (Anexo 10), na ausência e em presença de cobre. Foram obtidos os valores de Km de $1,21 \pm 0,42$ mM e $0,37 \pm 0,054$ mM, na ausência e em presença de 0,2 mM de Cu^{2+} , respectivamente (Tabela 8). Os valores de Vmax, na ausência e em presença do metal, não diferiram apreciavelmente: $0,55 \pm 0,16$ mU.mL⁻¹ e $0,75 \pm 0,065$ mU.mL⁻¹, respectivamente.

4.5.1.4. Efeito do íon cobre na energia de ativação da fosfatase ácida

A energia de ativação (Ea) foi determinada através do gráfico de Arrhenius (Anexo 11), variando-se a temperatura de incubação de 27 a 47 °C. Os valores de Ea, na ausência e na presença de 0,2 mM de Cu^{2+} , foram respectivamente 6.392 ± 361 cal.mol⁻¹ e 3.239 ± 935 cal.mol⁻¹ (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de *S. capricornutum* na presença e ausência de íons cobre.

O valor de CE50 foi determinado da Figura 15; o valor de KdCu^{2+} foi determinado a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (Anexo 9); os valores de Km e Vmax foram determinados a partir do Gráfico de Lineweaver-Burk (Anexo 10) e o valor da energia de ativação (Ea), a partir do gráfico de Arrhenius (Anexo 11).

Parâmetro		Cu^{2+} (mM)	
		0,0	0,2
CE50 ($\mu\text{M Cu}^{2+}$)	1,80	-	-
KdCu^{2+} ($\mu\text{M Cu}^{2+}$)	1,64	-	-
Km (mM p-NPP)	-	1,21	0,37
Vmax (mU.mL ⁻¹)	-	0,55	0,75
Ea (cal.mol ⁻¹)	-	6.392	3.239

4.5.2. Estudos *in vivo* do efeito de íons cobre nas culturas de *S. capricornutum*

As culturas de *S. capricornutum* mantidas em meio OECD foram suplementadas com Cu^{2+} para se obter as concentrações finais 0,1; 1; e 10 mM. Na menor concentração testada, não se observou nenhuma mudança significativa na atividade, e nem no conteúdo de proteína no extrato. Por outro lado, nas maiores concentrações, observou-se uma diminuição significativa da atividade, da ordem de 30-40 %, quando comparado ao controle (Figura 17), juntamente com uma diminuição da concentração de proteína. Não foram observados efeitos significativos quanto às alterações na atividade específica.

4.6. Efeito da ação conjunta de Hg^{2+} e Al^{3+} na atividade da fosfatase ácida de *S.*

capricornutum

Além do Hg^{2+} , outro íon metálico que afetou de um modo considerável a atividade da fosfatase ácida foi o Al^{3+} (Tabela 7). Estudou-se o efeito de concentrações variadas de Hg^{2+} e de Al^{3+} , assim como de suas misturas (1:1). De modo semelhante, em outro experimento, o efeito do Hg^{2+} ou LAS foi avaliado simultaneamente com uma combinação de Hg^{2+} +LAS (1:1). As curvas do efeito observado em função da concentração, assim como os isobogramas obtidos a partir destes dados estão ilustrados nas Figuras 18–21. A diminuição da atividade enzimática em função da concentração de Hg^{2+} , Al^{3+} , LAS e das misturas Hg^{2+} + Al^{3+} e Hg^{2+} +LAS está demonstrada nas Figuras 18 e 20. Ambos os gráficos indicam maior efeito inibidor do Hg^{2+} , e de suas misturas, comparativamente aos efeitos do Al^{3+} e LAS.

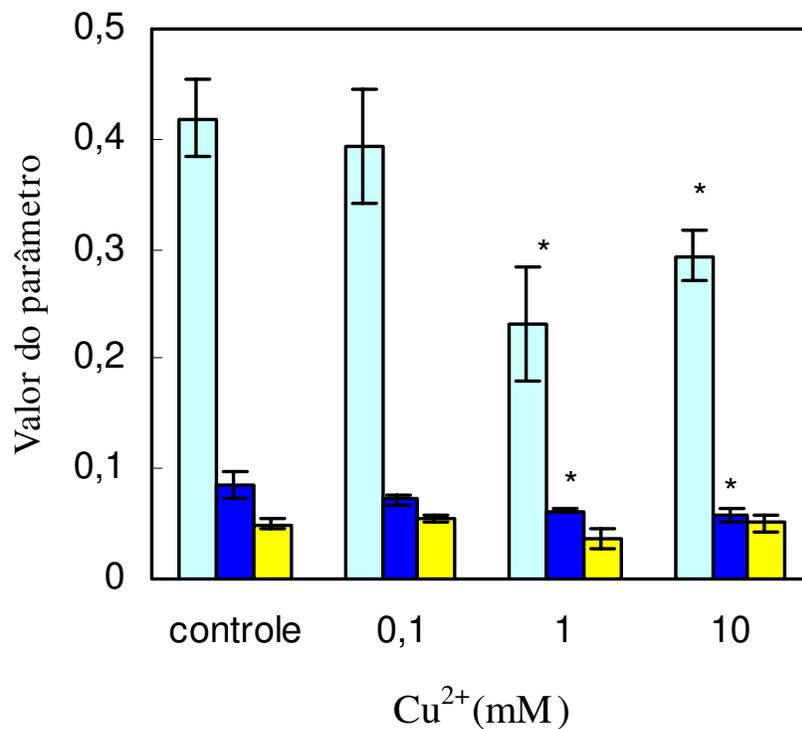


Figura 17 – Efeito do íon cobre na atividade específica de fosfatase ácida e conteúdo de proteína de culturas de *S. capricornutum*.

Atividade de fosfatase ácida (■) (U.mL⁻¹ x 100), concentração de proteína (■) (mg proteína . mL⁻¹) e atividade específica (■) (U.mg proteína⁻¹) foram determinadas em extratos de culturas de *S. capricornutum* crescidas em meio OECD após 24 horas. Os resultados são referentes à média e desvio padrão de no mínimo dois experimentos com análises em duplicata.

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

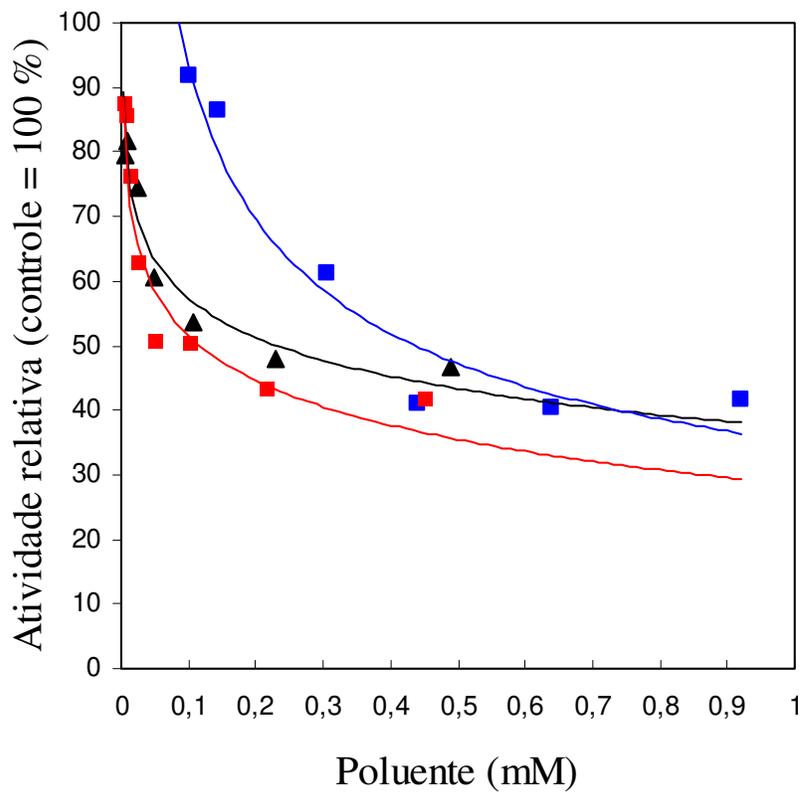


Figura 18 - Curvas dose-resposta de Hg^{2+} , Al^{3+} e da mistura $Hg^{2+} + Al^{3+}$ em função da atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.

A atividade foi medida após a incubação da enzima com diferentes concentrações de Hg^{2+} (-■-), Al^{3+} (-■-) e da mistura $Hg^{2+} + Al^{3+}$ (1:1) (-▲-), em um sistema de reação contendo p-NPP, como descrito em Métodos.

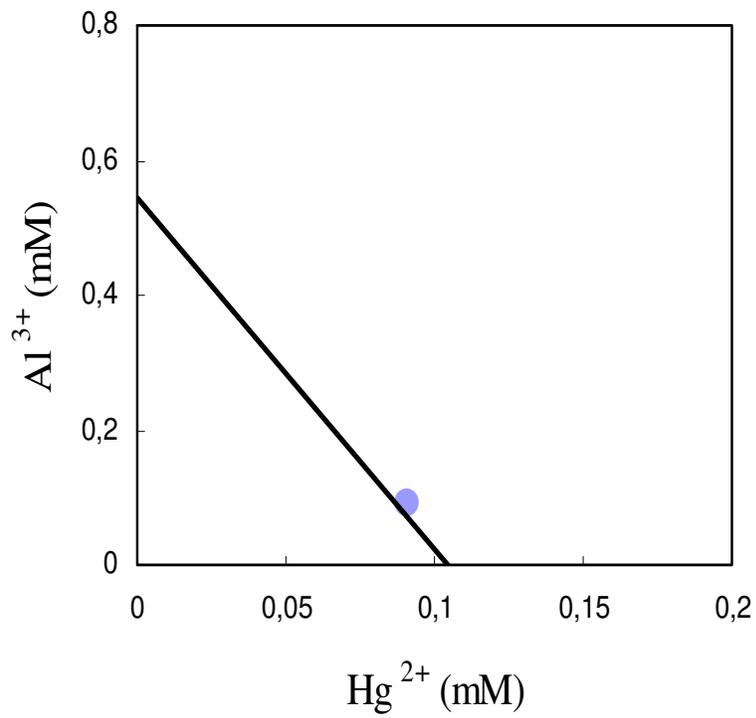


Figura 19 - *Análise isobolográfica entre Hg^{2+} e Al^{3+} .*

A reta representa a interação nula referente ao isóbolo obtido com base no efeito de cada poluente individualmente. O ponto sobre a reta é a concentração da combinação $Hg^{2+}+Al^{3+}$ (1:1) que causa 50% de inibição. O FIC calculado é igual a 1,0.

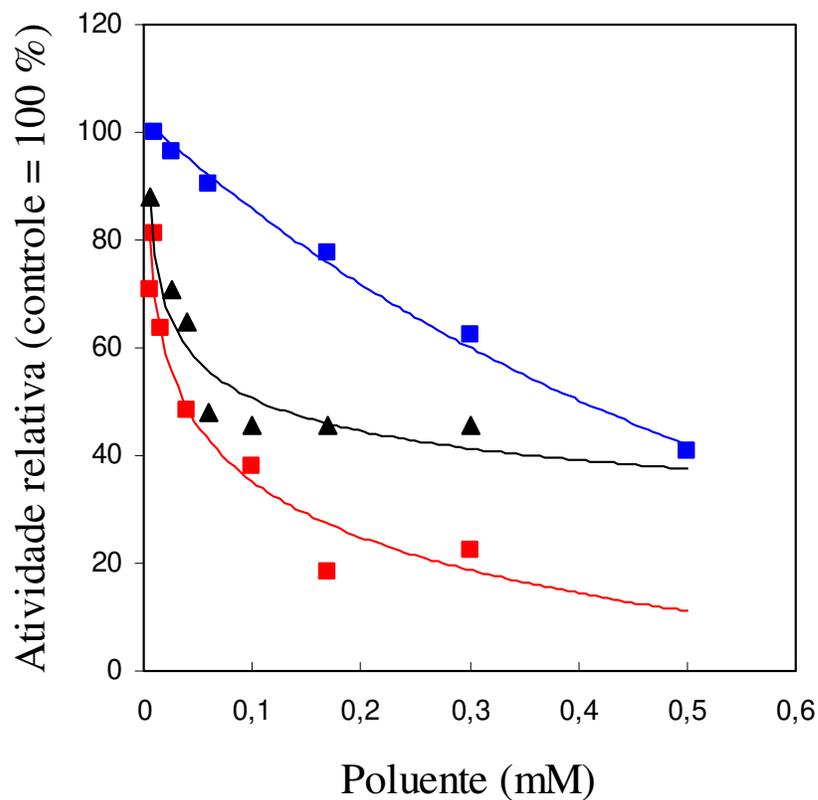


Figura 20 - Curvas dose-resposta de Hg^{2+} , LAS e da mistura Hg^{2+} + LAS em função da atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.

A atividade foi medida após a incubação da enzima com diferentes concentrações de Hg^{2+} (-■-), LAS (-■-) e da mistura Hg^{2+} +LAS (1:1) (-▲-), em um sistema de reação contendo p-NPP, como descrito em Métodos.

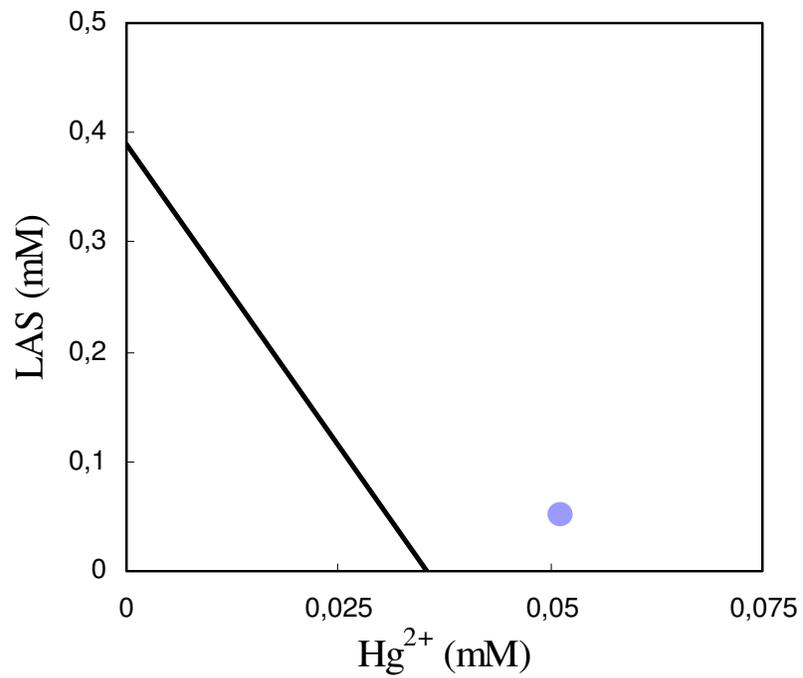


Figura 21 - *Análise isobolográfica entre Hg²⁺ e LAS.*

A reta representa a interação nula referente ao isóbolo obtido com base no efeito de cada poluente individualmente. O ponto deslocado à direita da reta é a concentração da combinação Hg²⁺+LAS (1:1) que causa 50% de inibição. O FIC calculado é igual a 1,6.

No estudo da interação entre Hg^{2+} e Al^{3+} , as CI50s calculadas, e seus intervalos de confiança 95%, para Hg^{2+} , Al^{3+} e $\text{Hg}^{2+}+\text{Al}^{3+}$ foram, respectivamente, 0,104 (0,082-0,135), 0,544 (0,422-0,761) e 0,183 (0,129-0,271) mM. Os valores desse parâmetro de inibição computados para o experimento sobre a ação conjunta de Hg^{2+} e LAS foram 0,036 (0,022-0,054), 0,390 (0,345-0,444) e 0,103 (0,082-0,145) mM, respectivamente, para Hg^{2+} , LAS e $\text{Hg}^{2+}+\text{LAS}$.

Os valores de CI50 de Hg^{2+} , LAS e Al^{3+} são representados como pontos de interseção sobre os eixos das ordenadas e abscissas do isoblograma (Figuras 19 e 21). Com base nos valores de CI50 calculados em ambos estudos, foram determinados os valores de FICs equivalentes a 1,0 e 1,6, respectivamente, para as interações $\text{Hg}^{2+}+\text{Al}^{3+}$ e $\text{Hg}^{2+}+\text{LAS}$. Os significados destes valores são demonstrados como pontos nos isoblogramas. Portanto, o ponto sobre a reta refere-se a efeito aditivo (Figura 19), enquanto que o ponto deslocado à direita da mesma significa antagonismo (Figura 21).

Na Tabela 9 são demonstrados resultados a partir de curvas concentração-inibição de Hg^{2+} e de LAS influenciadas pelo Cu^{2+} , que demonstrou ter um efeito ativador. Os resultados mostram que na presença de Cu^{2+} ocorre um aumento de aproximadamente 40% no valor da CI50 de Hg^{2+} , que é estatisticamente significativo ($p < 0,05$), pois o valor de CI50 calculado na ausência de Cu^{2+} encontra-se fora do intervalo de confiança dos valores de CI50 calculados na presença deste metal.

Um fenômeno diferente foi observado para a inibição pelo LAS, onde a alteração deste parâmetro foi muito baixa e não significativa.

Tabela 9 - Efeito inibidor de Hg^{2+} e LAS sobre a fosfatase ácida de *S. capricornutum* na presença ou ausência de íons cobre.

A atividade foi medida após a incubação da enzima com diferentes concentrações de LAS ou Hg^{2+} e com diferentes concentrações destes poluentes na presença de 0,02 e 0,2 mM de Cu^{2+} , em um sistema de reação contendo p-NPP, como descrito em Métodos.

Poluentes	CI50 (mM)	Intervalo de confiança (95%)
LAS	0,335	0,283 – 0,398
LAS + Cu^{2+} 0,02 mM	0,349	0,300 – 0,426
LAS + Cu^{2+} 0,2 mM	0,288	0,241 – 0,340
Hg^{2+}	0,026	0,022 – 0,031
Hg^{2+} + Cu^{2+} 0,02 mM	0,039*	0,033 – 0,045
Hg^{2+} + Cu^{2+} 0,2 mM	0,037*	0,032 – 0,045

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao Hg^{2+} .

5. DISCUSSÃO

5.1.. Extração e caracterização da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

5.1.1. Extração

A remoção de compostos intracelulares de algas têm sido citado pela literatura e têm sido realizado após sonicação (SIMON & HELLIWELL, 1998; RAI et al., 1998), maceração (APHA, 1992; GEOFFROY et al., 2002) ou ambos, sonicação e maceração (DOWNES et al., 1993).

No presente trabalho, foram comparados alguns procedimentos que promoveram o rompimento celular com conseqüente liberação da enzima. A combinação destes métodos para uma melhor extração da fosfatase ácida de *S. capricornutum* foi também estudada.

Ambos procedimentos de congelamento, seguido pelo descongelamento, demonstraram alguma liberação da enzima, porém sem diferenças marcantes quanto ao rendimento de extração entre os mesmos. Entretanto, quando as amostras eram tratadas com o sonicador após esse procedimento, observou-se um notável aumento da atividade enzimática no extrato.

Apesar do congelamento com N₂ líquido, seguido da maceração, ter apresentado melhor rendimento, uma de suas desvantagens é a perda de material algáceo que ocorre durante o processo de maceração. SIMON & HELLIWELL (1998) compararam a eficiência de extração da clorofila da alga *Selenastrum obliquus* e também observaram que a maceração foi mais efetiva que a sonicação.

Os resultados demonstraram que a aplicação de congelamento/descongelamento entre os ciclos de sonicação melhorava a liberação da enzima e portanto diminuía a necessidade da realização de numerosos ciclos para uma extração mais eficiente. Devido a esta razão, e pela inconveniência do uso de N₂ líquido/maceração já citada, foi adotada a combinação do congelamento (-20 °C)/descongelamento/sonicação nos procedimentos de rotina de extração da enzima. A aplicação de congelamento/descongelamento na liberação da fosfatase ácida de estruturas celulares em homogeneizados da alga *Polytomella caeca* foi estudada por COOPER et al. (1974). Os autores observaram que a aplicação deste procedimento por 3 vezes consecutivas aumentava gradualmente a liberação da enzima, sendo que a aplicação do mesmo por mais vezes, não demonstrava acréscimo da atividade nos extratos.

As comparações entre os dois procedimentos de sonicação testados demonstraram que a sonicação em banho de ultra-som não resultou num procedimento de extração conveniente, quando comparado ao uso do sonicador, pois os extratos obtidos por este último método renderam uma atividade enzimática, em média, 4 vezes superior. Estes achados não estão parcialmente de acordo com os relatados por SIMON & HELLIWELL (1998). De acordo com estes autores, pequenas diferenças no rendimento da extração (aproximadamente 20%) foram observadas com relação à extração de material algáceo através do sonicador ou banho de ultra-som.

Os resultados demonstraram que a escolha de um valor de amplitude conveniente é relevante para uma extração bem sucedida. Assim, baixas amplitudes como 30%, parecem ser não suficientes para uma adequado rompimento da célula. Por outro lado, valores muito altos de amplitude, como 90%, parecem promover desnaturação da enzima pelo excessivo aumento da temperatura na amostra. Estas observações, e a melhor eficiência de extração constatada para a amplitude de 70%, levou a adotar este valor para os experimentos descritos no presente trabalho.

A extração de enzimas, incluindo fosfatases, de algas do gênero *Selenastrum* é relatada pela literatura. KONG & CHEN (1995) e KONG et al. (1998) extraíram a fosfatase ácida e a glicose-6- fosfato desidrogenase de *S. capricornutum* com tampão Tris-borato 0,1-0,3 M pH 7,5 em banho de gelo por 10 minutos e centrifugação a 10.000 x g. Apesar de não terem relatado o método de ruptura celular utilizado, os primeiros autores obtiveram extratos com atividade específica para a fosfatase ácida, de ordem de grandeza semelhante aos obtidos no presente trabalho. RIVOAL et al. (1996, 2002) extraíram a fosfoenol piruvato descarboxilase de células congeladas de *Selenastrum minutum* que foram descongeladas em tampão e passadas através de uma “prensa francesa” a 18.000 p.s.i. O mesmo método foi empregado por THEODOROU et al. (1991) na extração de oito enzimas desse mesmo organismo.

Alguns outros métodos associados ao rompimento de células algáceas para a liberação de fosfatases e outras enzimas são abordados pela literatura. Assim por exemplo, uma DL-glicerol-1-fosfatase foi extraída de *Dunaliella salina* pela aplicação de choque osmótico, adicionando-se uma solução gelada de 10 mM de Tricina pH 7,4 (SUSSMAN & AVRON, 1981). GEOFFROY et al. (2002) extraíram quatro enzimas de *Scenedesmus obliquus* através da maceração em areia. A maceração também foi utilizada por NAKAZATO et al. (1997) quando extraíram a fosfatase ácida da macrófita aquática *S. oligorrhiza*, entretanto, este procedimento foi realizado em N₂

líquido. O mesmo procedimento utilizado por estes últimos autores, foi realizado para a extração dessa enzima em algas da espécie *Ulva lactuca* após liofilização destes organismos (LEE, 2000). DEVRIESE et al. (2001) extraíram enzimas associadas ao metabolismo do N e S da alga *Chlamydomonas* após a permeabilização pela adição de tolueno e agitação.

5.1.2. Estabilidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum* durante o armazenamento em baixa temperatura

Os resultados do presente trabalho indicaram que a enzima mantinha sua atividade durante aproximadamente 6 meses quando armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (freezer), entretanto, sua estabilidade era apreciavelmente perdida quando estocada em geladeira.

A maior parte dos trabalhos sobre a estabilidade térmica de fosfatase ácida de algas refere-se a estudos feitos em temperaturas elevadas. À $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 70% da atividade da fosfatase ácida extraída de *Ochromonas danica* (PATNI & AARONSON, 1974), *Chlamydomonas reinhardtii* (MATAGNE et al., 1976) e *Euglena gracilis* (BENNUN & BLUM, 1966) era perdida durante 240, 1 e 17 minutos, respectivamente.

5.1.3. Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Nossos resultados indicaram que a mudança de pH do meio de incubação para o meio alcalino promovia um maior decréscimo da atividade quando comparada com a incubação em meio ácido.

Valores de pH ótimo semelhantes ao registrado no presente trabalho foram também relatados para as enzimas pertencentes a outras espécies de algas como *Euglena gracilis* (BLUM, 1965), *Chlorella pyrenoidosa* (KNUTSEN, 1968), *Chlamydomonas reinhardtii* (MATAGNE et al., 1976), *Ochromonas danica* (PATNI & AARONSON, 1974); assim como as dos protozoários aquáticos *Tetrahymena pyriformis* (MULLER et al., 1966; LAZARUS & SCHERBAUM, 1967) e *Acanthamoeba sp.* (MULLER, 1969).

De acordo com BACHIR & LOPES (1997) e BACHIR (1996), a alga verde unicelular *C. reinhardtii* produzia duas fosfatases constitutivas que estavam invariavelmente presentes em células que cresciam na ausência ou presença de Pi, com uma atividade máxima em cerca de pH 5,0. Quando estas células eram transferidas para um meio deficiente em Pi, a alga apresentava um notável aumento nas atividades de duas fosfatases, DN e DA, uma com pH ótimo de

aproximadamente 7, e a outra de 9,5, respectivamente, sendo ambas excretadas no meio de cultura. Nenhuma atividade de fosfatase alcalina foi observada em nossos estudos com a alga *S. capricornutum*, em presença de Mg^{2+} (5 mM) como cofator. Resultados análogos foram obtidos por NAGY et al. (1981). Seria interessante submeter culturas de *S. capricornutum* a um crescimento em meio pobre em Pi para verificar possíveis atividades enzimáticas em pH 7,0 – 10,0. Por outro lado, alguns estudos indicaram que a ausência de Pi no meio não parecia ser uma regra para a produção de fosfatase neutra ou alcalina, uma vez que as fosfatases sintetizadas por *Chlorella pyrenoidosa* (KNUTSEN, 1968) e *Euglena gracilis* (BENNUN & BLUM, 1966) expostas a essas condições, mostraram apenas atividades fosfatásicas com pH ótimo entre 5,0 e 6,0.

5.1.4. Especificidade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Os resultados demonstraram que a especificidade da enzima em hidrolisar os substratos é muito ampla; substratos sintéticos como p-NPP e β -naftil-fosfato são comumente utilizados na dosagem de atividade de inúmeras fosfatases. Substratos que fazem parte do metabolismo celular, os chamados substratos naturais, eram igualmente suscetíveis à hidrólise enzimática. Em analogia com os resultados do presente trabalho, eficientes taxas de hidrólise de β -glicero-fosfato e FMN foram demonstradas pelas fosfatases ácidas de *Chlamydomonas reinhardtii* (MATAGNE et al., 1976) e de rim bovino (GRANJEIRO et al., 1997). Frutose-1,6-difosfato foi também hidrolisado em grande proporção por uma fosfatase alcalina extraída da alga *Scenedesmus quadricauda* (CHAWLA et al., 1987).

Por outro lado, comparativamente aos resultados do presente estudo com os mesmos substratos, diferentes padrões de especificidade para os mesmos substratos foram observados por PATNI & AARONSON (1974) e BENNUN & BLUM (1966) para as fosfatases ácidas das algas *Ochromonas danica* e *Euglena gracilis*, respectivamente. Entretanto, os últimos autores, constataram uma especificidade para glicose-6-fosfato e serina-P, em analogia aos resultados do presente estudo. Atividades similares também foram observadas para a hidrólise de glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e 5'AMP pela fosfatase ácida extraída da alga *Enteromorpha linza* (YAMAMOTO, 1972).

Em contraste com os resultados do presente estudo, e com os apresentados por PATNI & AARONSON (1974), BENNUN & BLUM (1966) observaram que a fosfatase ácida extraída de

Euglena gracilis era capaz de hidrolisar o pirofosfato em uma taxa maior do que o p-NPP, sugerindo o primeiro substrato como o mais eficiente dentre os 21 substratos testados. NAKAZATO et al. (1997) também constataram que o pirofosfato era um eficiente substrato para a fosfatase ácida sintetizada na deficiência de Pi, extraída da planta aquática *Spirodela oligorrhiza*, enquanto que o α -glicero-fosfato e o β -glicero-fosfato não demonstraram esta eficiência.

O presente trabalho mostrou também que a tirosina-P, ribose-5-P e 5'AMP podiam ser considerados como bons substratos para a enzima em estudo. O primeiro foi o melhor substrato não sintético para as enzimas extraídas de batata (POLYA & WETTENHALL, 1992; GELLATLY et al., 1994) e gérmen de trigo (CHENG & TAO, 1989). A função do AMP como o melhor substrato não sintético para a fosfatase ácida extraída de algumas plantas foi relatada por DUFF et al. (1994), que propuseram o envolvimento da enzima com o suprimento de energia para transporte, e com uma função AMPásica.

Entre os três aminoácidos fosforilados testados como substratos, somente a tirosina-P exibiu uma razoável taxa de hidrólise. Similarmente aos resultados sobre a fosfatase ácida de *S. capricornutum*, uma baixa clivagem (11%) de serina-P foi relatada para a enzima extraída da alga *Euglena gracilis* (BENNUN & BLUM, 1966). A baixa capacidade de fosfatases ácidas em hidrolisar serina-P e treonina-P foi também observada para as enzimas extraídas da alga *Enteromorpha linza* (YAMAMOTO, 1972) e da batata doce (KAWABE et al., 1984).

A especificidade relativa da fosfatase ácida de *S. capricornutum* associada aos diferentes substratos testados, pouco indica sobre o envolvimento do substrato natural *in vivo*, porém dá um indicativo de quais os prováveis compostos intracelulares suscetíveis à hidrólise pela enzima, que poderiam ser objeto de estudo em futuros experimentos.

Os trabalhos sobre especificidade de fosfatases ácidas de diversas fontes em que se fundamentou esta discussão, indicaram que tal especificidade era particular para cada espécie. ABD ELAAH & EL NADGY (1999), estudando isoformas de fosfatases ácidas do fungo aquático do gênero *Achlya*, observaram uma grande variabilidade entre oito espécies deste gênero, sendo que cada espécie era caracterizada por um padrão específico de isoenzimas.

Experimentos com fosfatases ácidas de diversas espécies de algas pertencentes a um mesmo gênero seriam relevantes de modo a se detectar alguma especificidade em comum para um grupo

de substratos, e deste modo, caracterizar a enzima de acordo com a sua capacidade de hidrolisar um determinado substrato, e propor seu envolvimento em uma dada via metabólica.

5.1.5. Efeito de inibidores de fosfatases

De acordo com GRANJEIRO et al. (1997), as fosfatases ácidas de baixa Mr (massa molecular relativa) são insensíveis à inibição pelo tartarato e fluoreto, e fortemente inibidas por reagentes que interagem com grupos –SH como p-cloromercuribenzoato (p-CMB) e CuSO₄. Devido à alta inibição da atividade enzimática pelo fluoreto observada no presente trabalho, e parcialmente pelo p-CMB, os resultados sugerem uma predominância de isoformas de alta Mr no extrato de *S. capricornutum*. Isto seria corroborado pela manutenção da atividade enzimática quando Cu²⁺ era adicionado, na ausência de pré-incubação da enzima com o íon metálico.

Resultados similares demonstrando a insensibilidade da fosfatase ácida de algas e macrófitas aquáticas ao íon cobre foram relatados, respectivamente, por PATNI & AARONSON (1974) e NAKAZATO et al. (1997).

O fluoreto tem a capacidade de inibir fosfatases ácidas de diversos organismos unicelulares, tal como foi constatado para a enzima de *S. capricornutum*. Assim por exemplo, essa inibição também foi 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). O fluoreto, na concentração de 0,02 mM, inibia em cerca de 80% a fosfatase ácida da alga *Ochromonas danica* (PATNI & AARONSON, 1974). Estes resultados, e os relatados para a enzima extraída das algas *Euglena gracilis* (BLUM, 1965) e *Gonyaulax polyedra* (SCHMITTER & JURKIEWICZ, 1981) estão de acordo com os resultados do presente trabalho. Por outro lado, a enzima extraída da macrófita aquática *S. oligorrhiza*, sofreu somente 22% de inibição pelo fluoreto (NAKAZATO et al., 1997).

A fosfatase ácida descrita no presente estudo foi parcialmente inibida pelo tartarato. PATNI & AARONSON (1974) também observaram a inibição da enzima da alga *O. danica* por este composto, enquanto que a inibição da enzima fúngica era constatada em *Neurospora sp* (NYC, 1967) e *A. nidulans* (HARSANYI & DORN, 1972).

Como se observou, a enzima do presente trabalho hidrolisava preferencialmente FMN, como a fosfatase ácida de baixa Mr de rim bovino (GRANJEIRO et al., 1997). Entretanto, diferentemente, ela era inibida pelo tartarato, e especialmente pelo fluoreto, que são inibidores de

fosfatases ácidas de alta Mr. Este fato poderia ser explicado pela inexistência em algas de uma classificação de fosfatases ácidas, de acordo com a Mr e suscetibilidade a inibidores, como ocorre em mamíferos. Além disso, um aspecto relevante que deveria ser considerado é que os dados aqui discutidos são resultados de experimentos realizados com o extrato bruto. Por outro lado, PATNI & AARONSON (1974) não observaram grandes diferenças (máximo de 17%) quando compararam a inibição da enzima purificada com a de extratos brutos.

5.1.6. Determinação das constantes cinéticas da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

O valor da Km para p-NPP calculado neste estudo (0,27 mM) era da mesma ordem de grandeza quando comparado com os descritos para fosfatases de outras espécies de algas: 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 *Chlamydomonas reinhardtii* (LIEN & KNUTSEN, 1973). Uma similaridade também era observada com os valores de Km de fosfatase ácida fúngica (0,32 mM) (TSEKOVA & GALABOVA, 2003), alcalina algácea (0,45 mM) (CARPENE & WYNNE, 1986), e ainda de fosfatases ácidas de plantas, como as de *S. oligorrhiza* (NAKAZATO et al., 1997), e de soja, tubérculo de batata e gérmen de trigo (LEBANSKY et al. 1992; DUFF et al., 1994).

A Km obtida para fosfatase ácida de *S. minutum*, utilizando fosfoenolpiruvato como substrato, foi similar à obtida para a enzima de *Selenastrum capricornutum* (THEODOROU et al., 1991).

Com relação aos valores de energia de ativação, o obtido para a fosfatase ácida de *S. capricornutum*, 9.066 cal·mol⁻¹ era similar ao relatado por LIEN & KNUTSEN (1973) para as fosfatases extraídas da alga clorofícea *C. reinhardtii*, 10.700 cal·mol⁻¹, e para a enzima de outros organismos, por exemplo, para fosfatase ácida de rim bovino (GRANJEIRO et al., 1997), 10.848 cal·mol⁻¹.

Comparativamente a outras enzimas extraídas de algas clorofíceas unicelulares, o valor desse parâmetro cinético também era próximo ao calculado para a hidrogenase de *Scenedesmus obliquus* (SCHNACKENBERG et al., 1993), urato oxidase de *Chlamydomonas reinhardtii* (ALAMILLO et al., 1991) e ribulose-1,5-difosfato-carboxilase/oxigenase de *Euglena gracilis* (YOKOTA et al., 1989).

Por outro lado, os resultados do presente estudo discordavam dos descritos por BENNUN & BLUM (1966), que estimaram uma E_a cerca de 7 vezes maior para a fosfatase ácida induzida de *E. gracilis*, e por NAKAZATO et al. (1997), $27.800 \text{ cal mol}^{-1}$, para a enzima extraída da macrófita *S. oligorrhiza*.

5.2. Avaliação comparativa do efeito dos poluentes na fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Os resultados indicaram que a atividade da fosfatase ácida podia ser modulada pelos poluentes em uma ampla faixa de efeitos. Uma ocorrência semelhante foi constatada por SUGIURA et al. (1981) que testaram efeitos *in vitro* de 30 agentes químicos, de natureza orgânica e inorgânica, sobre a atividade de uma fosfatase ácida de origem vegetal.

No presente trabalho, 30 poluentes de origem agrícola foram testados em condições de pré-incubação para se avaliar os efeitos *in vitro* sobre a fosfatase ácida de *S. capricornutum*. A razão para o uso desta condição é que em um sistema pré-incubado a enzima é submetida a uma condição mais drástica de interação com o agente químico, sem a presença de compostos, como por exemplo, o substrato, que pudesse proteger a enzima, pela formação de um complexo enzima-substrato. A pré-incubação foi usada por PATNI & AARONSON (1974) para se avaliar o efeito de metais sobre a atividade de fosfatase extraída de algas. WALLACE & HERZBERG (1988) e CHETTY et al. (1983) pré-incubaram enzimas de cérebro de rato juntamente com inseticidas para avaliar o grau de inibição. Neste contexto, de modo a se obter dados associados ao efeito de condições mais rigorosas de exposição, foi realizado um estudo de triagem com um número considerável de poluentes, de origem agrícola, incluindo inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas e contaminantes do LE. Os resultados deste estudo preliminar teve a finalidade de selecionar os agentes químicos que mostraram maiores efeitos na atividade da fosfatase ácida. Alguns contaminantes do LE como o Hg^{2+} , LAS, Al^{3+} e Cu^{2+} demonstraram tal comportamento, enquanto que outros, na sua maioria pesticidas orgânicos, não atingiram 30% de alteração da atividade enzimática. Estes resultados estão de acordo com efeitos inibitórios promovidos por alguns metais, assim como pequenas alterações causadas por alguns agrotóxicos nas atividades de fosfatases. DURRIEU et al. (2003), estudando fosfatase alcalina de células intactas de algas (*Chlorella vulgaris*), observaram efeitos inibitórios marcantes por metais pesados, pequenos efeitos por compostos fenólicos, e nenhum efeito por pesticidas. Os herbicidas paraquat e glifosato não alteraram a atividade *in vitro* da fosfatase ácida sérica (EL

DEMERDASH et al., 2001), o mesmo ocorrendo com os inseticidas piretróides na atividade *in vitro* da fosfatase calcineurina (FAKATA et al., 1998). GIANFREDA et al. (1993), estudando efeitos de alguns agrotóxicos na atividade da fosfatase ácida da batata, observaram que o carbaril e o glifosato não alteraram a atividade, enquanto que atrazina manifestou efeito inibitório.

MAZORRA et al.(2002) e FATHI (2002) observaram que o Hg^{2+} foi o inibidor mais potente de fosfatases ácida e alcalina extraídas de moluscos, e de culturas *S. bijuga* e *A. spiroides*, respectivamente.

No presente trabalho, entre os 4 poluentes com maior efeito, observou-se que o Cu^{2+} possuía um efeito ativador, somente em condições de pré-incubação, cujo detalhamento será discutido posteriormente.

5.3. Efeito do íon mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida e nas culturas de *S.*

capricornutum

Parâmetros bioquímicos de inibição através de experimentos *in vitro* foram calculados para os dois poluentes com maior efeito inibitório, assim como também foram conduzidos estudos *in vivo* com ambos agentes químicos.

5.3.1. Estudos *in vitro* do efeito do íon mercúrio e do LAS na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Os resultados do presente trabalho sugeriram uma maior inibição pelo Hg^{2+} , quando comparado com o LAS, devido ao menor valor de CI50, e aos intervalos de confiança que não se sobrepujam. PATNI & AARONSON (1974) relataram um valor de CI50 para o $HgCl_2$ na faixa de 1 – 3 mM, para a fosfatase ácida extraída da alga *Ochromonas danica*. Segundo MAZORRA et al. (2002), esse parâmetro era 14 vezes menor para a inibição da enzima de moluscos pelo Hg^{2+} , quando comparado ao resultado do presente trabalho. EL DEMERDASH & ELAGAMY (1999) calcularam valores de CI50 de Hg^{2+} equivalentes a 0,5 e 0,9 mM, respectivamente, para as fosfatases alcalinas microsomal e mitocondrial de fígado de peixes. A CI50 estimada de LAS para fosfatase ácida de batata era da ordem de 0,05 mM, enquanto que o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) possuía uma CI50 similar à calculada no presente trabalho (TANAKA et al., 1975).

Ambos poluentes Hg^{2+} e LAS demonstraram uma afinidade similar pela enzima visto que os valores de K_i apresentavam semelhante ordem de grandeza, embora a inibição ocorresse por dois mecanismos diferentes. Os valores de K_i são 7 e 27 vezes menores que o valor de K_m calculado, respectivamente, para o Hg^{2+} e LAS. Valores inferiores de K_i , em relação ao da K_m , sugerem maior afinidade destes poluentes pela enzima comparativamente com o substrato.

A inibição observada na presença de Hg^{2+} ou outros metais pode ser explicada pela sua interação com grupos $-SH$ essenciais para catálise (VAN ASSCHE, 1990). Um outro mecanismo de inibição poderia ser devido à deficiência de um metal essencial em metaloproteínas ou complexos metálicos de proteínas, onde haveria substituição do metal deficiente pelo metal tóxico (OMAR, 2002).

Comparativamente aos resultados do presente trabalho, um valor similar de K_i ($36 \mu M$) foi calculado para a inibição não competitiva, pelo Hg^{2+} , da fosfatase alcalina extraída de caranguejo (CHEN et al., 2000).

VINCENZINI et al. (1982) relataram as propriedades de detergentes aniônicos de cadeia longa, como o SDS, em inibir competitivamente algumas enzimas, como a lactato desidrogenase de mamíferos e a glicose-6-fosfato desidrogenase de leveduras. De acordo com estes autores, ambos os substratos para estas enzimas, piruvato e glicose-6-fosfato, possuem uma ou duas cargas negativas concentradas em pontos específicos da molécula. Talvez, pelo fato do detergente possuir uma cabeça hidrofílica carregada negativamente, comportar-se-ia como um inibidor competitivo. Uma consideração similar poderia ser atribuída para a inibição pelo LAS, já que o grupo sulfonato, carregado negativamente, poderia competir com a carga negativa do p-NPP.

5.3.2. Estudos *in vivo* do efeito da exposição de culturas de *S. capricornutum* ao íon mercúrio e ao LAS

Em contraste com os resultados de experimentos *in vitro*, foram observados efeitos bastante diferentes entre as algas expostas ao Hg^{2+} e ao LAS. Apesar de ambos os compostos não terem diminuído a atividade específica nas exposições a curto prazo, foi observado um considerável decréscimo da atividade enzimática e da concentração de proteína nas amostras tratadas com Hg^{2+} . Por outro lado, estes parâmetros foram aumentados nas exposições ao LAS por 24 horas na maior concentração testada, assim como na menor concentração testada após 7 dias de

exposição. Estas observações foram parcialmente consistentes com o aumento da atividade específica de uma frutose difosfatase alcalina da alga *Scenedesmus quadricauda* exposta ao LAS (CHAWLA et al., 1987).

O acréscimo da atividade manifestado por LAS no presente estudo poderia estar associado às propriedades tensoativas do composto, que poderia estar atuando como um adjuvante de extração e auxiliando na ruptura de organelas celulares na liberação da enzima. Isto está de acordo com os argumentos de SARTORY & GROBBELAAR (1984) que relataram o uso do tensoativo dimetilsulfóxido para extrair substâncias intracelulares de algas. Considerações semelhantes poderiam ser feitas para o uso do detergente Triton X-100 utilizado para estudar a latência da fosfatase ácida lisossomal em algas (COOPER et al., 1974).

De acordo com os resultados de exposição por 24 horas, o Hg^{2+} afetou a atividade da fosfatase ácida e o teor de proteína em uma concentração efetiva média aproximadamente 100 a 235 vezes menor que a calculada para LAS, demonstrando o maior poder de efeito adverso exercido pelo metal sobre estes parâmetros bioquímicos. O aumento da atividade específica observada para este poluente nessa exposição está associada com o aumento da relação atividade/concentração de proteína. Segundo GILL et al. (1991), tal incremento poderia ocorrer pela indução da enzima pelo metal como parte de uma adaptação bioquímica às necessidades metabólicas aumentadas pelo estresse provocado pelo agente tóxico. Ou ainda, pela labilidade aumentada dos lisossomos, pois sabe-se que o aumento da atividade da fosfatase ácida é freqüentemente associada a um aumento da atividade lisossomal em tecidos que sofrem degeneração celular e necrose devido à exposição a agentes tóxicos. Uma outra suposição é de que alga seria capaz de sintetizar proteínas que se ligam ao metal como um mecanismo de detoxificação (OMAR, 2002).

Nos experimentos realizados durante 7 dias, os efeitos foram também mais acentuados nas exposições ao Hg^{2+} , comparativamente ao LAS. Assim sendo, a concentração de 2 mM de LAS promoveu aproximadamente 70% de diminuição da atividade enzimática, enquanto que a mesma porcentagem de efeito foi atingida com 15 μM de Hg^{2+} . O grau de inibição por este metal é próximo ao descrito para a alga *Scenedesmus bijuga*, onde 50% da atividade de fosfatase ácida foi diminuída em concentrações de 2,5 - 5,0 μM de Hg^{2+} (FATHI, 2002).

O decréscimo da atividade específica após 7 dias de exposição corrobora os resultados da inibição observada *in vitro* para ambos os poluentes e sugere que o tempo de exposição poderia

ser um fator relevante para promover a passagem dos agentes tóxicos através das membranas e interagir com a enzima causando sua inibição. Este fenômeno não foi manifestado nas exposições a curto prazo onde as alterações da atividade enzimática no extrato foram acompanhadas por uma perda do conteúdo de proteína celular pelo Hg^{2+} , ou por uma facilitação na extração da mesma devido às propriedades detergentes do LAS.

Portanto os efeitos decorrentes das 24 horas de exposição acima descritos, parecem estar mais associados a outros efeitos tóxicos de natureza aguda do que uma interação intracelular com a enzima. Em outras palavras, a capacidade do Hg^{2+} e LAS interagir com proteínas e alterar a permeabilidade da membrana sugere que eles atuem mais como agentes tóxicos celulares do que como inibidores específicos.

Não existe uma explicação óbvia para as alterações da atividade específica após 7 dias de exposição, já que alguns fatores devem estar envolvidos, incluindo depleção da síntese de proteínas ou ligação da enzima ao agente químico. Entretanto, com base nos resultados dos estudos *in vitro*, a diminuição da atividade específica deve estar realmente associada a uma interação enzima-polvente.

Comparativamente aos resultados do presente trabalho, outros autores relataram alterações das atividades de fosfatases ácidas em algas verdes expostas a metais. Assim por exemplo, em *Chlorella vulgaris*, aproximadamente 20% da atividade foi diminuída por 0,15 mM de Al^{3+} (RAI et al., 1998). A atividade específica em *S. capricornutum* foi diminuída em cerca de 86% pelo Al^{3+} e 70% pelo Zn^{2+} nas concentrações de 6 μM e 4,6 μM , respectivamente (KONG & CHEN, 1995). Em *Scenedesmus obliquus*, a inibição foi de aproximadamente 40% nas culturas expostas a 0,12 mM de Zn^{2+} , enquanto que houve um aumento de cerca de 140% na atividade específica na enzima de *Scenedesmus quadricauda* expostas a essa mesma condição (OMAR, 2002).

O decréscimo da atividade específica da fosfatase ácida foi também estudado em peixes expostos ao mercúrio ou LAS, verificando-se efeitos mais marcantes nestes organismos. Deste modo, quando se comparou com a inibição na maior concentração testada (7 dias) no presente trabalho, um grau similar de efeito na enzima de brânquias foi produzido com 0,44 μM de Hg^{2+} na água (VERMA et al., 1985). O mesmo foi válido para as concentrações de 0,014 μM de LAS (MISRA et al. 1991a) e 0,04 mM de LAS (MOHAN & VERMA, 1981), nas enzimas de brânquias e intestino, respectivamente.

Os valores de CE50 de Hg^{2+} e LAS estimados para os parâmetros bioquímicos analisados, são maiores que os relatados para os testes clássicos de crescimento algáceo (WHO, 1989; WHO, 1996). Isto sugere uma maior sensibilidade deste último parâmetro fisiológico quanto à presença de cada poluente, comparativamente aos resultados do presente trabalho. A determinação da CE50-24h (equivalente a $9,5 \mu\text{M}$) do LAS, baseada na alteração da concentração de glicerol em algas, parece ser também um parâmetro mais sensível (UTSUNOMIYA et al., 1997).

Segundo os resultados do presente estudo, as maiores concentrações testadas de Hg^{2+} e LAS, que não promoveram um efeito significativo na atividade específica, eram 5000 e 143 vezes superiores, respectivamente, às concentrações máximas permissíveis nos compartimentos aquáticos, de acordo com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2005).

5.4. Efeito do íon cobre na fosfatase ácida e nas culturas de *S. capricornutum*

5.4.1. Estudos *in vitro* do efeito do íon cobre na atividade da fosfatase ácida

A presença de íons cobre em um sistema de reação pode resultar na inibição da fosfatase ácida ou na ausência de efeito sobre a enzima. De acordo com GRANJEIRO et al. (1997), 97% da atividade da fosfatase ácida extraída de rim bovino foi inibida por 10 mM de CuSO_4 . Segundo GILL et al. (1992), ocorreu aproximadamente 40% de inibição da atividade da enzima extraída de fígado do peixe *Puntius conchoni* na presença de 0,001 mM de Cu^{2+} . A insensibilidade da enzima da planta aquática *Spirodela oligorrhiza* a 5 mM de Cu^{2+} foi relatada por NAKAZATO et al. (1997).

Por outro lado, o íon cobre pode funcionar como um ativador de várias enzimas. O efeito *in vitro* do cobre como um ativador de enzimas séricas foi estudado por KARA & CELIK (1997). Na concentração de 0,8 mM de Cu^{2+} , observou-se um aumento de aproximadamente 3 vezes na atividade da fosfatase ácida fúngica (TSEKOVA & GALABOVA, 2003). BOUNIAS et al. (1996) registraram um incremento de cerca de 40% da V_{max} da fosfatase ácida em extratos de intestino de abelhas contendo 1mM de gluconato de cobre. Este efeito ativador foi observado também para a fosfatase alcalina, constatando-se um aumento de aproximadamente 85% na atividade da enzima de testículos de peixes na presença de 0,001 mM de Cu^{2+} (GILL et al.,

1992). A ativação da lactato desidrogenase destes organismos por este íon metálico também foi relatado (GILL et al., 1992).

No presente trabalho observou-se um aumento da atividade da enzima na presença de íons cobre em um sistema pré-incubado, e insensibilidade da mesma em um sistema não pré-incubado. Um comportamento diferente foi mostrado para fosfatases intracelulares e extracelulares da alga *O. danica*, pré-incubadas nas mesmas condições do presente trabalho; não se observou nenhuma alteração na atividade da enzima intracelular, ao passo que a enzima extracelular era inibida 80% (PATNI & AARONSON, 1974).

De acordo com DIXON & WEBB (1979), o gráfico da velocidade contra a concentração do íon metálico gera uma hipérbole retangular, semelhando-se à tradicional curva para o substrato, sendo que estes dados podem ser tratados pelos métodos gráficos usuais. A “Km” para o íon metálico assim obtida, tem sido considerada como uma simples constante de dissociação (Kd) do complexo com a enzima. YOUNGS et al. (2000) aplicaram este método para determinar a Kd do complexo Cd²⁺- Mn²⁺- peroxidase. Com base nestas considerações, no presente trabalho foi calculada uma KdCu²⁺, equivalente a 1,64 ± 0,14 µM. A baixa magnitude deste valor indica uma forte capacidade de ligação deste metal que pode ser medido por um método analítico relativamente simples.

A ativação da fosfatase ácida de *S. capricornutum* pelo Cu²⁺ foi investigada com mais detalhes. Neste sentido realizamos alguns estudos para verificar se a ativação pelo íon metálico poderia ser devido a uma proteção da enzima contra desnaturação térmica, pela diminuição da Km, ou pela diminuição da energia de ativação, uma vez que todos estes fatores levariam a um aumento na atividade enzimática.

Nossos resultados mostram claramente que o efeito ativador do Cu²⁺ poderia ser devido a uma proteção conferida por este íon à fosfatase ácida, uma vez que na presença deste metal a desnaturação da enzima é menor que na sua ausência. Tal incremento da estabilidade tem sido relatado na literatura para o cobre e outros metais pesados, independentemente de possuírem ou não um efeito ativador. Assim, de acordo com BALDRIAN & GABRIEL (2002), o Cd²⁺ e o Cu²⁺ aumentaram a atividade da lacase, sendo que este último também incrementou sua estabilidade. Apesar do efeito inibitório do Cd²⁺, este metal juntamente com o Mn²⁺, aumentaram a meia vida da peroxidase fúngica por 2,7 e 2,2 vezes, respectivamente, contra a inativação

térmica (YOUNGS et al., 2000). TROTMAN & GREENWOOD (1971) observaram que a estabilidade da fosfatase alcalina dependente de Zn^{2+} foi restaurada pelo Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} .

De modo a avaliar o efeito do íon cobre na interação enzima-substrato, determinou-se a K_m na ausência ou presença do metal, ambas em sistemas pré-incubados. Em presença de Cu^{2+} observou-se uma diminuição no valor da K_m de cerca de 3,3 vezes, sugerindo que o efeito ativador deste metal também poderia ser devido a um aumento na afinidade enzima-substrato. BOUNIAS et al. (1996) também descreveram uma diminuição no valor da K_m da fosfatase ácida extraída de abelhas, na presença de gluconato de cobre.

Um achado interessante nos resultados obtidos foi que o valor da K_m para o p-NPP (0,37 mM) correspondente às amostras tratadas com o metal, era muito próximo ao calculado para a enzima, na ausência do metal, em amostras não pré-incubadas (item 4.2.5.).

As duas proposições acima para explicar o efeito ativador do Cu^{2+} podem somadas à diminuição do valor da energia de ativação na presença do metal. A causa deste fenômeno poderia ter sido devido à quebra do aumento linear da atividade observada em 37 °C, onde o efeito protetor do cobre contra a inativação térmica se tornou mais evidente em temperaturas superiores a esta.

5.4.2. Estudo *in vivo* da exposição de culturas de *S. capricornutum* ao íon cobre

Tal como foi constatado, a menor concentração de Cu^{2+} testada não foi suficiente para promover qualquer alteração dos parâmetros bioquímicos estudados, sendo esta concentração 714 vezes maior que a concentração máxima permitida do metal na água, para a proteção das comunidades aquáticas, segundo a legislação vigente (BRASIL, 2005). Apesar de ocorrer uma diminuição significativa da atividade enzimática em relação ao controle nas concentrações de 1 e 10 mM de Cu^{2+} , a atividade específica não foi alterada. Este fato foi devido a um concomitante decréscimo do conteúdo de proteína, suficiente para manter a atividade específica nos mesmos níveis do controle. Com base nestes argumentos pode-se assumir que o efeito *in vivo* não foi decorrente de uma interação enzima-substrato. Assim, a não alteração da atividade específica poderia estar associada à insensibilidade da enzima demonstrada nos estudos *in vitro*, na ausência de pré-incubação. Portanto, a perda da atividade nos extratos parece ser resultante do extravasamento da enzima do meio intracelular para o extracelular. Em outras palavras, a capacidade do cobre em interagir com proteínas e alterar a permeabilidade de membranas, sugere

que o metal se comporta mais como um agente tóxico celular, e que não promove uma ação específica sobre a fosfatase ácida.

A inibição da expressão de proteínas seria uma outra possível causa do efeito do íon cobre na diminuição da atividade enzimática e da concentração protéica nos extratos.

O efeito do cobre sobre a atividade específica da fosfatase ácida de *S. capricornutum* difere ao de outros metais nesta mesma enzima, assim como sobre a fosfatase alcalina de outras espécies de algas. Assim por exemplo, os resultados do presente trabalho não estão de acordo com os achados de KONG & CHEN (1995) que registraram cerca de 70% de diminuição da atividade específica da fosfatase ácida de *S. capricornutum* exposta ao Zn^{2+} ou Al^{3+} , apesar desta exposição ter sido durante 96 horas. A atividade específica da fosfatase alcalina foi suprimida em dependência da concentração de cobre em algas da espécie *Scenedesmus bijuga* expostas a este metal (FATHI & EL SHAHED, 2000).

Os resultados do presente estudo estão parcialmente de acordo com os relatados sobre o efeito do cobre na população microbiana de sedimento contaminado com 6,25 mM de $CuSO_4$ onde aproximadamente 50% da atividade fosfatásica foi diminuída (ISOLDA & HASASAKI, 1991).

Segundo a WHO (1998), os valores de CE50-72h referentes ao teste de inibição de crescimento pela exposição ao cobre para varias espécies de algas, variam de aproximadamente 0,7 a 2 μM . FRANKLIN et al. (2001b) determinaram uma CE50-72h para esse efeito em *S. capricornutum* equivalente a 0,12 μM de Cu^{2+} . Estes autores observaram também que o parâmetro de avaliação de crescimento foi mais sensível do que de inibição enzimática (CE50-24h = 0,6 μM) para uma esterase. Os resultados do presente trabalho sugerem uma certa analogia com essa observação, pois o valor estimado de CE50-24h referente à inibição da fosfatase ácida em *S. capricornutum* seria muitas vezes superior à CE50-72h de inibição de crescimento.

Outras espécies aquáticas exibiram maior sensibilidade ao cobre em termos da alteração da atividade da fosfatase ácida, quando comparado aos resultados aqui obtidos, levando a concluir que outros organismos poderiam ser escolhidos como melhores indicadores de exposição ao metal. Assim por exemplo, a concentração de 0,3 μM foi suficiente para alterar significativamente a atividade dessa enzima na hemolinfa de gastrópodes expostos por 2 a 48 horas (SURESH et al., 1993).

5.5. Efeito da ação conjunta dos poluentes mercúrio, alumínio, cobre e LAS na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*

Os resultados obtidos mostraram um maior efeito do Hg^{2+} comparativamente ao Al^{3+} ou LAS, sendo os valores de CI50 do primeiro, 5 ou 11 vezes menor que os destes dois últimos inibidores, respectivamente. Além do mais, a faixa de valores referente aos intervalos de confiança 95% não se sobrepõe, demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os valores de CI50 de Hg^{2+} e Al^{3+} , assim como de CI50 de Hg^{2+} e LAS.

Os isobogramas relacionados à inibição de Hg^{2+} e suas combinações com Al^{3+} ou LAS geraram retas que representam a interação zero isobográfica.

Os valores de FIC obtidos para o estudo da combinação $\text{Hg}^{2+} + \text{Al}^{3+}$ foram consistentes com os resultados mostrados na análise isobográfica, que evidenciou um ponto sobre a reta isoefetiva dose-combinação. Isto caracterizou um efeito aditivo, sendo o valor de FIC calculado igual a 1,0.

Por outro lado, o valor de FIC obtido a partir do experimento da combinação $\text{Hg}^{2+} + \text{LAS}$ estava de acordo com o ponto obtido acima da reta isoefetiva dose-combinação. Isto caracterizou um efeito antagonista porque o valor de FIC foi superior a 1,0 (FIC=1,6). Apesar deste tipo de interação não ser significativo ao nível de 95%, pode-se atribuir um leve antagonismo por ser significativo ao nível de 90%. Efeito antagonista também foi observado entre poluentes, tal como entre os herbicidas oxifluorfen e diuron na atividade da catalase de algas expostas a estes produtos (GEOFFROY et al., 2002). Entretanto, estes resultados foram parcialmente inconsistentes com as observações descritas por CALAMARI & MARCHETTI (1973) sobre a ação conjunta de agentes surfatantes e metais em sistemas biológicos. Estes autores concluíram que os detergentes aniônicos produziam sinergismo em peixes expostos aos agentes tóxicos, enquanto os detergentes não iônicos pareciam produzir antagonismo.

STEEVENS & BENSON (1999) observaram antagonismo entre o inseticida clorpirifós e o metilmercúrio na inibição da acetilcolinesterase extraída de um invertebrado aquático. Um mecanismo de tal efeito poderia ser explicado pela capacidade do metilmercúrio em formar complexos fracos com átomos de S no inseticida, devido às propriedades eletrofílicas do íon metálico $^+\text{HgCH}_3$, ficando então comprometida a interação entre a enzima e o inseticida (STEEVENS & BENSON, 1999; ZEINALLI & TORRENTS, 1998; WAN et al., 1994). Um mecanismo similar poderia ser proposto para a interação antagônica entre Hg^{2+} e LAS observada

no presente trabalho, já que o átomo de S contido no detergente reagiria com o Hg^{2+} . Entretanto, esta reação não ocorreria com Cu^{2+} que não alterou significativamente a CI50 de LAS.

Outro possível mecanismo seria a formação de um composto tipo “LAS-Hg-LAS” no qual o metal substitui o Na^+ de duas moléculas do alquil benzenosulfonato. Assim sendo, a ação biológica do detergente poderia ser alterada (CALAMARI & MARCHETTI, 1973).

Apesar do efeito ativador do Cu^{2+} ter sido observado somente em amostras pré-incubadas com este metal, estudos de ação conjunta em amostras não pré-incubadas foram realizados para avaliar qualquer interferência do Cu^{2+} na inibição enzimática por um íon metálico (Hg^{2+}) ou por um composto orgânico (LAS). Devido ao provável efeito protetor do Cu^{2+} sobre a inibição por ambos os poluentes, considerou-se relevante a realização deste estudo devido as implicações ecotoxicológicas do Cu^{2+} como um agente altamente tóxico para algas e sua freqüente presença no meio ambiente juntamente com outros agentes tóxicos.

Pelos resultados obtidos, o Cu^{2+} antagonizou significativamente a inibição pelo Hg^{2+} , sendo esta observação consistente com dados de um experimento adicional em amostras pré-incubadas com Cu^{2+} (Anexo 12).

Embora o Cu^{2+} não tivesse promovido uma alteração do grau de inibição de Hg^{2+} em uma grande proporção, foi detectado um comportamento diferente na atividade da enzima decorrente da combinação $\text{Hg}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$, comparativamente à combinação LAS+ Cu^{2+} . Talvez, este fato estivesse associado com a afinidade de ambos os metais por grupos -SH da enzima (VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990) e com algum efeito protetor do Cu^{2+} contra a ligação de Hg^{2+} nestes grupamentos, já que o primeiro não exibiu efeito inibidor. Portanto, o leve efeito protetor do Cu^{2+} poderia ser explicado pelos cátions possuírem a mesma valência e conseqüentemente pela competição por grupos-SH nos quais o Cu^{2+} estabilizaria a proteína contra o efeito de Hg^{2+} . Por outro lado, Al^{3+} não teria capacidade de competir com Hg^{2+} , o que explicaria a interação do tipo aditiva.

No presente trabalho, a obtenção do extrato bruto de *S. capricornutum* permitiu realizar alguns estudos sobre a extração e caracterização da fosfatase ácida, assim como também avaliar os efeitos *in vitro* de 30 poluentes de origem agrícola sobre a atividade desta enzima. Estudos mais específicos sobre o efeito inibidor ou ativador *in vitro* dos poluentes que demonstraram maior grau de efeito (Hg^{2+} , LAS e Cu^{2+}) foram realizados, incluindo também a avaliação da ação

conjunta dos mesmos. Investigou-se também a atividade enzimática decorrente da exposição das algas a alguns destes poluentes.

Espera-se que os resultados do presente trabalho auxiliem no delineamento experimental e discussão de resultados em estudos com enzimas de algas ou outros organismos, no que se refere a sua extração, caracterização e efeitos de agentes químicos. Espera-se ainda que os resultados melhorem o entendimento dos eventos básicos sobre o impacto de poluentes de origem agrícola em níveis bioquímicos de produtores primários. Embora estas informações não possam ser facilmente generalizadas para outras espécies de algas, elas proporcionam dados que auxiliam na elucidação do mecanismo de interferência de poluentes em vias metabólicas e contribuem para expansão da base de dados sobre efeitos *in vitro* e *in vivo* de agentes tóxicos sobre organismos não-alvo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados das avaliações discutidos anteriormente pode-se concluir que:

- a) A sonicação na amplitude equivalente a 70%, seguida do congelamento/descongelamento, com nova sonicação, demonstrou ser o método mais conveniente e eficiente de extração da enzima, tendo sido adotado na preparação rotineira dos extratos brutos.
- b) O extrato se manteve estável por armazenamento à - 20 °C (freezer), por aproximadamente 6 meses, sem ocorrer perda da atividade da fosfatase ácida. Para este mesmo período, a atividade enzimática remanescente foi muito baixa por armazenamento a 4°C (geladeira).
- c) Alguns parâmetros enzimáticos como pH ótimo, Km e energia de ativação possuíam valores muito próximos aos relatados para a fosfatase ácida de outras espécies de algas.
- d) Vários substratos puderam ser reconhecidos pela enzima, pois considerando-se a hidrólise de p-NPP como 100%; tirosina-P, ribose-5-P, FMN, frutose-1,6-difosfato, 5'AMP e α -glicero-fosfato foram hidrolisados com mais de 50% de eficiência. Portanto, a clivagem destes compostos não sintéticos, poderia explicar sua função como “substratos naturais” e o envolvimento da enzima em diversas vias metabólicas.
- e) Com exceção do LAS, a enzima foi fracamente afetada por poluentes orgânicos em condições *in vitro*, comparativamente com alguns metais pesados, o que sugere a escolha destes últimos no delineamento de futuros estudos *in vitro* e *in vivo* sobre o uso de fosfatase ácida como um potencial biomarcador.
- f) Dentre os vários poluentes testados, Hg²⁺ e LAS mostraram ser os inibidores mais potentes, sendo que seus parâmetros de inibição não diferiram marcadamente em termos de ordem de grandeza, e que uma ligeira maior inibição podia ser atribuída ao

Hg²⁺. Por outro lado, estes dois poluentes diferiram muito quanto ao seu mecanismo de ação inibitória, e efeitos *in vivo* associados a valores de concentração e tipo de efeito.

- g) A atividade específica da fosfatase ácida podia ser alterada pela exposição de algas à presença de Hg²⁺ e LAS, sendo que o primeiro promoveu os efeitos mais contundentes. Entretanto, a alteração deste parâmetro bioquímico por ambos os poluentes, não pareceu ser ecologicamente relevante, já que se manifestou em concentrações muito maiores que as máximas permitidas para a proteção das comunidades aquáticas.
- h) A ativação da enzima pelo Cu²⁺ poderia ser explicada pelo efeito protetor do metal impedindo a inativação térmica da enzima, pelo aumento na afinidade enzima-substrato (diminuição do valor de Km), e diminuição da energia de ativação. Os baixos valores de CE50 e constante de dissociação indicaram uma forte afinidade enzima - Cu²⁺.
- i) Segundo dados da literatura, a alteração de outros parâmetros fisiológicos e bioquímicos decorrentes da exposição *in vivo* ao Hg²⁺, LAS ou Cu²⁺ pareceu ser mais sensível do que a alteração da atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.
- j) O efeito de um poluente sobre a atividade da enzima pode ser alterado pela presença de outro agente químico, tal como foi constatado para o LAS e o Cu²⁺, que abrandaram o efeito inibidor de Hg²⁺.

7. PERSPECTIVAS

- a) O método de extração da fosfatase ácida, implementado no presente trabalho, poderia ser aplicado em estudos de outras enzimas de algas.
- b) Estudos mais detalhados de especificidade *in vitro* e *in vivo* da fosfatase ácida de *S. capricornutum* poderiam dar maiores informações sobre o possível substrato natural desta enzima, e portanto de sua função biológica.
- c) Seria interessante submeter culturas de *S. capricornutum* a um crescimento em meio pobre em Pi para verificar possíveis atividades de fosfatase alcalina, uma vez que em condições normais, nenhuma atividade desta enzima foi observada em nossos estudos, em presença de Mg^{2+} (5 mM) como cofator.
- d) Apesar de não ter sido observado efeitos consideráveis *in vitro* da maioria dos poluentes orgânicos sobre a enzima, a influência destes compostos sobre fosfatases e outras enzimas de algas em exposições *in vivo*, requer mais atenção.
- e) A grande afinidade do íon cobre pela enzima sugere o estudo do possível uso desta propriedade como um método simples de determinação do metal.
- f) No presente trabalho, a constatação da alteração da atividade enzimática pelo efeito combinatório de poluentes, reforçaria 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*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD ELAAH, G.A.; EL NAGDY, M.A. (1999) **Seasonal variations of zoosporic and terrestrial fungi in cultivated soil Sohag Governorate and isozyme differences among *Achlya* species.** *African J. Mycol. Biotechnol.* 7: 7-23.
- ADHAM , K.J.; HASSAN, I.F.; TAHA, N.; AMIN, T.H. (1999) **Impact of hazardous exposure to metals in the Nile and Delta lakes on the catfish , *Clarias Lazera*.** *Environ. Monit. Assess.* 54: 107-124.
- AGUERO-ALVARADO, R.; APPLEBY, A.P.; ARMSTRONG, D.J. (1991) **Antagonism of haloxyfop activity in tall fescue (*Festuca arundinacea*) by dicamba and bentazon.** *Weed Sci.* 39: 1-5.
- AJAY SINGH; AGARWAL, R.A. (1993) **Effect of cypermethrin on lactate and succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase of snail and fish.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 445-452.
- AL GHAI, S. M.; AHMAD, S.; ALI, B. (2000) **Differential inhibition of xenobiotic-metabolizing carboxylesterases by organotins in marine fish.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46: 258-264.
- ALAMILLO, J.M.; CARDENAS, J.; PINEDA, M. (1991) **Purification and molecular properties of urate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Biochim. Biophys. Acta* 1076: 203-206.
- ALMEIDA, V.C.de; LENZI, E.; BORTOTTI-FAVERO, L.O.; LUCHESE, E.B. (1998) **Avaliação do teor de alguns metais e de nutrientes de lodos de estações de tratamento de Maringá.** *Acta Scientiarum* 20: 419-425.
- ANTON, F.A.; LABORDA, E.; LABORDA, P.; RAMOS, E. (1993) **Carbofuran acute toxicity to freshwater algae and fish.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 400-406.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos. Monografias (Ingredientes Ativos)* [online]. Disponível: www4.anvisa.gov.br/AGROSIA [capturado em 02 de dec. 2004].
- APHA (1992) *Standard Methods of the Examination of Water and Wastewaters*, 18th edition. American Public Health Association, American Works Association, Washington, DC.

- ARNOLD, H.; PLUTA, H.J.; BRAUNBECK, T. (1995) **Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological, and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquat. Toxicol.* 33: 17-43.
- ASOKAN, P.; DAS, M.; DIXIT, R.; MUKHATAR, H. (1985) **Interaction of certain metal ions with aryl hydrocarbon hydroxylase of rat lung microsomes.** *Acta Pharmacol. Toxicol.* 57: 72-77.
- BACHIR, F. (1996) **Mutants impaired in derepressible alkaline activity in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant Sci.* 119: 93-101.
- BACHIR, F.; LOPPE, R. (1997) **Identification of new derepressible phosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 195-200.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. (2002) **Copper and cadmium increase lacase activity in *Pleurotus ostreatus*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 69-74.
- BALINT, T.; FERENCZY, J.; KATAI, F.; KISS, I.; KRACZER, L.; KUFESAK, O.; LANG, G.; POLYHOS, C.; SZABO, I.; SZEGLETES, T.; NEMCSOK, J. (1997) **Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37: 17-23.
- BASSOI, L.J.; NIETO, R.; TREMAROLI, D. (1990) *Implementação de testes de toxicidade para o controle de efluentes líquidos.* CETESB, São Paulo. Série Manuais/Secretaria do Meio Ambiente. 7 p.
- BECCALONI, E.; BORRELLO, P.; MUSMECI, L.; STACUL, E. (2000) **Arsenic and heavy metals in leachate from a real landfill and a laboratory landfill.** *Ann. Chim.* 90: 629-636.
- BENKOEL, L.; DODERO, F.; ROUSSEL, E.; BAUDIN, J.C.; LAMBERT, R.; CHAMLIAN, A.; AUGIER, H. (2000) **Hepatotoxic effect of metallic pollutants on enzyme histochemical activities of yellow-legged gull *Larus cachinnans michahellis* liver.** *Cell. Mol. Biol.* 46: 1183-1189.
- BENNUN, A.; BLUM, J.J. (1966) **Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of *Euglena*.** *Biochim. Biophys. Acta* 128: 106-123.
- BLUM, J.J. (1965) **Observations on the acid phosphatases of *Euglena gracilis*.** *J. Cell Biol.* 24: 223-234.

- BOUNIAS, M.; KRUK, I.; NECTOUX, M.; POPESKOVIC, D. (1996) **Toxicology of cupric salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35: 67-76.
- BRASIL (2005) *Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.* Diário Oficial da União, Brasília, 18 de março de 2005.
- BRATEN, T. (1975) **Ultrastructural localization of phosphohydrolases in gametes, zigotes and zoospores of *Ulva mutabilis* FØYN.** *J. Cell. Sci.* 17: 647-653.
- BURDEN, V.M.; SANDHEINRICH, M.B.; CALDWELL, C.A. (1998) **Effects of lead on the growth and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Environ. Pollut.* 101: 285-289.
- CALAMARI, D.; MARCHETTI, R. (1973) **The toxicity of mixtures of metals and surfactants to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.).** *Water Res.* 7: 1453-1464.
- CARILLO-CASTANEDA, G.; ORTEGA, M.V. (1967) **Effect of inorganic phosphate upon *Salmonella typhimurium* phosphatase activity : non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta* 146: 535-543.
- CARPENE, E. & WYNNE, D. (1986) **Properties of an alkaline phosphatase from the dinoflagellate *Peridinium cinctum*.** *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B: 163-167.
- CARPI, A.; LINDBERG, S.E.; PRESTBO, E.M.; BLOOM, N.S. (1997) **Methyl mercury contamination and emission to the atmosphere from soil amended with municipal sewage sludge.** *J. Environ. Qual.* 26: 1650-1655.
- CASTRO, V.L.S.; JONSSON, C.M. (2001) **Aspectos toxicológicos em ambiente aquático e em mamíferos.** In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P., RAIJ, B. van & ABREU, C.A. *Micronutrientes e Elementos Tóxicos na Agricultura.* CNPq/FAPESP/POTAFOS. Jaboticabal. p.577-596.
- CHAIMOVICH, H.; NOME, F. (1970) **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain.** *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 9-16.
- CHAWLA, G.; VISWANATHAN, P.N.; DEVI, S. (1987) **Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture.** *Environ. Exp. Bot.* 27: 311-323.

- CHEN, Q.X.; ZHENG, W.Z.; LIN, J.Y.; SHI, Y.; XIE, W.Z.; ZHOU, H.M. (2000) **Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase.** *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 879-885.
- CHENG, W.F.; TAO, M. (1989) **Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings.** *Biochim. Biophys. Acta*, 998: 271-276.
- CHETTY, S.C.; ALDOUS, C.N.; RASHATWAR, S.S.; DESAIAH, D. (1983) **Effect of chlordecone on pH and temperature dependent substrate activation kinetics of rat brain synaptosomal ATPases.** *Biochem. Pharmacol.* 32: 3205-3211.
- CID, A.; TORRES, E.; HERRERO, C.; ABALDE, J.E. (1997) **Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in short-time exposure assays.** *Cah. Biol. Mar.* 38: 201-206.
- COLLEN, J.; PINTO, E; PEDERSEN, M.; COLEPICOLO, P. (2003) **Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals.** *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 45: 337-342.
- COOPER, A.; BOWEN, I.D.; LLOYD, D. (1974) **The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga , *Polytomella caeca*.** *J. Cell. Sci.* 15: 605-618.
- CZUCZWAR, M.; KIS, J.; POTASINSKI, A.; TURSKI, W.A.; PRZESMYCKI, K. (2001) **Isobolographic analysis of interaction between vigabatrin and bancelofen in the formalin test in mice.** *Polish J. Pharmacol.* 53: 527-530.
- DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. (2000) **Chronic effects of quinalphos on some biochemical parameters in *Labeo rohita*.** *Toxicol. Lett.* 114: 11-18.
- DE AND, A.; SUR, R.K. (1990) **Changes in some enzymes activity in different tissues of the crab *Parataphusa spinigera* exposed to monocrotophos.** *Environment & Ecology* 8: 107-110.
- DeLORENZO, M.E.; SERRANO, L. (2003) **Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*.** *J. Environ. Sci. Health Part B Pest. Food Contam. Agric. Wastes B* 38: 529-538.
- DeLORENZO, M.E.; TAYLOR, L.A.; LUND, S.A.; PENNINGTON, P.L.; STROZIER, E.D.; FULTON, M.H. (2002) **Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural**

- pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 173-181.
- DENTON, D.L.; WHEELLOCK, C.E.; MURRAY, S.A.; HAMMOCK, B.D.; HINTON, D.E. (2003) **Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*).** *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 336-341.
- DETEN QUÍMICA S.A. *Produtos* [online]. Disponível: www.deten.com.br/produtos.htm [capturado em 26 de nov. de 2004].
- DEVRIESE, M.; TSAKALOUDI, V.; GARBAYO, I.; LEON, R.; VILCHEZ, C.; VIGARA, J. (2001) **Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant Physiol. Biochem.* 39: 443-448.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. (1979) *Enzymes*. 3rd ed. Longmans Green, and Co, Ltd., London. 1116 p.
- DOMINGUEZ, M.J.; GUTIERREZ, F.; LEON, R.; VILCHEZ, C.; VEJA, J.M.; VIGARA, J. (2003) **Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant Physiol. Biochem.* 41: 828-832.
- DOMOZYCH, D.S. (1989) **The endomembrane system and mechanism of membrane flow in the green alga, *Gloeomonas kupfferi* (Volvocales, Chlorophyta) II. A cytochemical analysis.** *Protoplasma* 149: 108-119.
- DOWNES, M.T.; HRSTICH, L.; VINCENT, W.F. (1993) **Extraction of chlorophyll and carotenoids pigments from antarctic benthic mats for analysis by HPLC.** *J. Appl. Phycol.* 5 : 623-628.
- DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. (1994) **The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism.** *Physiol. Plant.* 90: 791- 800.
- DURRIEU, C; BADREDDINE, I.; DAIX, C. (2003) **A dialysis system with phytoplankton for monitoring chemical pollution in freshwater ecosystems by alkaline phosphatase assay.** *J. Appl. Phycol.* 15: 289-295.
- EL DEMERDASH, F.M.; ELAGAMY, E.I. (1999) **Biological effects in *Tilapia nilotica* fish as indicators of pollution by cadmium and mercury.** *Int. J. Environm. Health Res.* 9: 173-186.

- EL DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ELAGAMY, E.I. (2001) **Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behaviour (*in vitro*)**. *J. Environ. Sci. Health B* 36: 29-42.
- EL ENANY, A.E.; ISSA, A.A. (2001) **Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus***. *Folia Microbiologica* 46: 227-230.
- EL HISSY, F.T.; EL NAGDY, M.A.; EL SHAROUNY, H.M.; ABD ELAAH, G.A. (1995) **Effect of the fungicide chlorothalonil (Bravo) on some metabolic activities of aquatic fungi**. *Folia Microbiologica* 40: 341-344.
- ELIA, A.C.; GALARINI, R.; TATICCHI, M.I.; DORR, A.J.; MANTILACC, L. (2003) **Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure**. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 162-167.
- ELSEBAE, A.A. (1996) **Enzyme activity as a biomarker for shrimp and artemia exposure to insecticides**. *Alex. Sci. Exch.* 17: 417-428.
- ELSGAARD, L.; PETERSEN, S.O.; DEBOSZ, K. (2001) **Effects and risks assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 1. Short term effects on soil microbiology**. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1656-1663.
- EVANDRI, M.G.; COSTA, L.G.; BOLLE, P. (2003) **Evaluation of brominated diphenyl ether-99 toxicity with *Raphidocelis subcapitata* and *Daphnia magna***. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2167-2172.
- FAHRAEUS, V.R.G.E.; SPURRELL, D.R. (2000) **Effect of Toxaphene on isolated hepatocytes of the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* storer**. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46: 289-297.
- FAKATA, K.; SWANSON, S.A.; VORCE, R.L.; STEMMER, P.M. (1998) **Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors**. *Biochem. Pharmacol.* 55: 2017-2022.
- FARGASOVA, A. (2001) **Interactive effect of manganese, molybdenum, nickel, copper I and II, and vanadium on the freshwater alga *Scenedesmus quadricauda***. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 688-695.
- FATHI, A. A.; EL-SHAHED, A. M. (2000) **Response of tolerant and wild strains of *Scenedesmus biguja* to copper**. *Biol. Plant.* 43: 99-103.
- FATHI, A.A. (2002) **Toxicological response of the green algae *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead**. *Folia Microbiologica* 47: 667-671.

- FELSOT, A. S.; RACKE, K.D.; HAMILTON, D.J. (2003) **Disposal and degradation of pesticide waste.** *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 177: 123-200.
- FENET, H.; CASELLAS, C.; BONTOUX, J. (1998) **Laboratory and field –caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40: 137-143.
- FERNANDEZ, N.A. CHACIN, E.; GUTIERREZ, E.; ALASTRE, N.; LLAMAZO, B.; FORSTER, C.F. (1995) **Adsorption of lauryl benzyl sulphonate on algae.** *Bioresource Technol.* 54: 111-115.
- FIORENTINO, A.; GENTILI, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A.; TEMUSSI, F. (2003) **Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low molecular weight phenol components.** *J. Agric. Food Chem.* 51: 1005-1009.
- FORGET, J.; PAVILLON, J.F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENE, G. (1999) **Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida).** *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 912-918.
- FRANKLIN, N.M.; ADAMS, M.S.; STAUBER, J.L.; LIM, R.P. (2001a) **Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 469-480.
- FRANKLIN, N.M.; STAUBER, J.L.; LIM, R.P. (2001b) **Development of flow cytometry – based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters.** *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 160-170.
- GELLATLY, K., MOOREHEAD, G.B.G.; DUFF, S.M.G.; LEFEBVRE, D.D.; PLAXTON, W.C. (1994) **Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity.** *Plant Physiol.* 106: 223-232.
- GEOFFROY, L.; TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. (2002) **Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*.** *Pest. Biochem. Physiol.* 72: 178-185.
- GERALDINE, P.; BHAVAN, P.S.; KALIAMURTHY, J.; ZAYAPRAGASSARAZAN, Z. (1999) **Effects of dichlorvos intoxication in the freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*.** *J. Environ. Biol.* 20:141-148.

- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAUJO, R.P.A.; RAMOS, M.L.L.C. (1990) *Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. CETESB, São Paulo. Série Manuais/Secretaria do Meio Ambiente. 17 p.
- GIAMBERINI, L.; PIHAN, J.C. (1997) **Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc.** *Diseases Aquat. Organ.* 28: 221-227.
- GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; FILAZZOLA, M.T.; VIOLANTE, A. (1993) **Influence of pesticides on the activity and kinetics of invertase, urease, and acid phosphatase enzymes.** *Pest. Sci.* 39: 237-244.
- GIANNACCINI, G.; BETTI, L.; PALEGO, L.; CHELLI, B.; GALLO, A.; PIRONE, A.; FABIANI, O.; BERTELLOTTI, S.; LUCACCHINI, A. (2004) ***In vitro* effects of lead ions on peripheral benzodiazepine receptors and adenylyl cyclase activity in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*.** *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 137: 197-206
- GILL, T.S., TEWARI, H.; PANDE, J. (1992) **Short and long effects of copper on the roshy barb (*Puntius conchoni* Ham.).** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 294-306.
- GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J. (1991) ***In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* Ham. (Rosy barb).** *Comp. Biochem. Physiol. C* 100: 501-505.
- GILL, T.S.; PANDE, J.; TEWARI, H. (1990a) **Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues.** *Pest. Biochem. Physiol.* 38: 231-244.
- GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J. (1990b) **Use of the fish enzyme system in monitoring water quality : effects of mercury in tissue enzymes.** *Comp. Biochem. Physiol. C* 97: 287-292.
- GOLDSBOROUGH, L.G.; BROWN, D.J. (1988) **Effect of glyphosate (Roundup formulation) on periphytic algal photosynthesis.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 253-260.
- GONZALEZ, O.; FERNANDEZ, J.; MARTIN, M. (1987) **Inhibition of trout (*Salmo gairdneri* R.) PBG-synthase by some metal ions (Mg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}).** *Comp. Biochem. Physiol. C* 86: 163-167.

- GRANJEIRO, J.M.; FERREIRA, C.V.; JUCA, M.B.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. (1997) **Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics.** *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41: 1201-1208.
- GUIMARÃES, J.R.D.; ROULET, M.; LUCOTTE, M.; MERGLER, D. (2000) **Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajos river floodplain, Brazilian Amazon: Seasonal and vertical variations.** *Sci. Total Environ.* 261: 91-98.
- GUNER, S.; COLAK, A. (1996) **Effect of divalent metal ions on the microsomal aniline hydroxylase system of rainbow trout.** *J. Biochem. Toxicol.* 11: 257-262.
- HAMPEL, M.; MORENO-GARRIDO, I.; SOBRINO, C.; LUBIAN, L.M.; BLASCO, J. . (2001) **Acute toxicity of LAS homologues in marine microalgae: esterase activity and inhibition growth as endpoints of toxicity.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48: 287-292.
- HARSANYI, L.S.; DORN, G.L. (1972) **Purification and characterization of acid phosphatase from *Aspergillus nidulans*.** *J. Bacteriol.* 110: 240-255.
- HEIJERICK, D.G.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C. R. (2002) **Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Possibilities and limitations.** *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 133C: 207-218.
- HENDERSON, R.F. (1995) **Strategies for use of biological markers of exposure.** *Toxicol. Lett.* 379: 379-383.
- HIRAKI, M.; OHKI, S.; SATO, Y.; JABLONKAI, I.; BOEGER, P.; WAKABAYASHI, K. (2001) **Protoporphyrinogen-IX oxidase inhibitors: Bioactivation of thiadiazolidines.** *Pest. Biochem. Physiol.* 70: 59-167.
- HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H. (2001) **Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 3. Sublethal effects on soil invertebrates.** *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1673-1679.
- HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H.; LOKKE, H.; WOLF, W.de; MARSHALL, S.; FOX, K.; de WOLF, W. (2001) **Effect and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 4. The influence of salt speciation, soil type, and sewage sludge on toxicity using the collembolan *Folsomia fimetaria* and the earthworm *Aporrectodea caliginosa* as test organisms.** *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1680-1689.

- HOLTER, H.; LOWY, B.A. (1959) **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.
- HURTIG, A.K.; SAN SEBASTIAN, M.; SOTO, A.; SHINGRE, A.; ZAMBRANO, D.; GUERRERO, W. (2003) **Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador.** *Arch. Environ. Health* 58: 223-228.
- IBAMA (1988) *Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.* Secretaria do Meio Ambiente. Brasília. 351p.
- IKINGURA, J.R.; AKAGI, H. (1999) **Methylmercury production and distribution in aquatic systems.** *Sci. Total Environ.* 234: 109-118.
- ISOLDA, A. & HAYASAKA, S.S. (1991) **Effect of herbicide residues on microbial processes in pond sediment.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 81-86.
- JASRA, N.; SANYAL, S.N.; KHERA, S. (1990) **Effect of thiabendazole and fenbendazole on glucose uptake and carbohydrate metabolism in *Trichuris globulosa*.** *Veter. Parasitol.* 35: 201-209.
- JERGENTZ, S.; MUGNI, H.; BONETTO, C.; SCHULZ, R. (2004) **Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 345-352
- JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. (1990) **Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish.** *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 67-79.
- JIN-CLARK, Y.; LYDY, M.J.; ZHU, K.Y. (2002) **Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae).** *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 598-603.
- JONSSON, C.M.; MAIA, A. H. N. (1999) *Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes em organismos não alvo do ambiente aquático.* Embrapa Meio Ambiente. Serie Documentos. 33 p.
- JONSSON, C.M.; TOLEDO, C.M.F. (1993) **Acute toxicity of endosulfan in the fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio*.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 151-155.

- JONSSON, C.M.; FERRACINI, V.L.; PARAIBA, L.C.; RANGEL, M; AGUIAR, S.R. (2002) **Alterações bioquímicas em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol.** *Scientia Agri.* 59: 441-446.
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.A.; RIBEIRO, E.O. (1998) **Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life.** *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1724 – 1726.
- JONSSON, C.M.; TOLEDO, L.G.; BEILE, J. (1997) **Efeito de três herbicidas usados em culturas de arroz irrigado sobre a mobilidade e crescimento de organismos aquáticos bioindicadores.** In: *XXII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Anais.* EPAGRI-IRGA-EMBRAPA/CPACT, Balneário Camboriú, 23 a 26 / 09 / 1997. p. 538-539 (resumo expandido).
- KARA, M. & CELIK, I. (1997) **The effects of some fungicides on activity of eight serum enzymes *in vitro*.** *J. Environ. Sci Health. A.* 32: 1377-1382.
- KASAI, F. & HATAKEYAMA, S. (1993) **Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*.** *Chemosphere* 27: 899-904
- KAWABE, H.; SUGIURA, Y.; TERAUCHI, M.; TANAKA, H. (1984) **Mn(III) containing acid phosphatase. Properties of Fe(III)-substituted enzyme and function of Mn(III) and Fe(III) in plant and mammalian acid phosphatases.** *Biochim. Biophys. Acta* 784: 81-89.
- KEDDY, C.J.; GREENE, J.C.; BONNEL, M.A. (1995) **Review of whole-organism bioassay: soil, freshwater, sediment, and freshwater assessment in Canada.** *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 30: 221-251.
- KIRAN, R.; BANSAL, M.; BANSAL, R.C. (1988) **Effect of carbamates on some enzymes of rat liver and kidney.** *Pesticides* 22: 8-10.
- KLOEPPER-SAMS, P.; TORFS, F.; FEIJTEL T. ; GOOCH, J. (1996) **Effects assessments for surfactants in sludge-amended soils: a literature review and perspectives for terrestrial risks assessment.** *Sci. Total Environ.* 185: 171-185.
- KNUTSEN, G. (1968) **Repressed and derepressed synthesis of phosphatases during synchronous growth of *Chlorella pyrenoidosa*.** *Biochim. Biophys. Acta* 161: 205-214.
- KONG, F. X. & CHEN, Y. (1995) **Effect of aluminium and zinc on enzyme activities in the green alga *Selenastrum capricornutum*.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55: 759-765.

- KONG, F.X.; HU, W.; LIU, Y. (1998) **Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum***. *Environ. Exp. Bot.* 40: 105-111.
- KOTORMAN, M.; LASZLO, K.; NEMCSOK, J.; SIMON, L.M. (2000) **Effects of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.)**. *J. Environ. Sci. Health A Toxic Hazar. Subst. Environ. Engin.* 35A: 1517-1526.
- KRUSKOPF, M. M. & DU PLESSIS, S. (2004) **Induction of both acid and alkaline phosphatase activity in two green-algae (chlorophyceae) in low N and P concentrations**. *Hydrobiologia* 513: 59-70.
- KUMAR, K.; ANSARI, B.A. (1986) **Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae)**. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 12: 199-205.
- LARINI, L. (1987) *Toxicologia*. Editora Manole Ltda. São Paulo. 313 p.
- LASMAN, M. (1967) **Observation on acid phosphatase in *Mayorella palestinesis***. *J. Cell. Physiol.* 69: 151-154.
- LAZARUS, L.H.; SCHERBAUM, O.H. (1967) **Some properties of the acid phosphatases of *Tetrahymena pyriformis***. *Life Sci.* 6: 2401-2407.
- LEANER, J.J.; MASON, R.P. (2002) **Methylmercury accumulation and fluxes across the intestine of channel catfish, *Ictalurus punctatus***. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 132: 247-59
- LEBANSKY, B.R.; McKNIGHT, T.D.; GRIFFING, L.R. (1992) **Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures**. *Plant Physiol.* 99: 391-395.
- LEE, R.E. (1989) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 645 p.
- LEE, T.M. (2000) **Phosphate starvation induction of acid phosphatase in *Ulva lactuca* L. (Ulvales, Chlorophyta)**. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 19-25.
- LELAND, H.V.; KUWABARA, J.S. (1985) **Trace metals**. In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. p.374-415.
- LEONOVA, I.N.; SLYNKO, N.M. (1996) **Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxication enzymes in larvae and adults of cotton bollworm, *Heliothis armigera***. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 157-172.

- LIEN, T.; KNUTSEN, G. (1973) **Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: Properties and regulation of repressible phosphatases.** *Physiol. Plant* 28: 291-298.
- LIRA, R.; CONTRERAS, L.M.; RITA, R.M.; URBINA, J.A. (2001) **Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole.** *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 537-546.
- LOPPES, R. ; MATAGNE, R.F. (1973) **Acid phosphatase mutants in *Chlamydomonas*: isolation and characterization by biochemical, eletrophoretic and genetic analysis.** *Genetics* 75: 593-604.
- LOWRY, O.H.; LOPEZ, J.A. (1945). **The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters.** *J. Biol. Chem.* 162: 421-424.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.F.; RANDALL, R.J. (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MALLICK, N. (2004) **Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system.** *J. Plant Physiol.* 161: 591-597.
- MAMAI, D.; KOUZELI-KATSIRI, A.; CHRISTOULAS, D.G.; ANDREADAKIS, A.; AFTIAS, E. (2000) **Evaluation of agricultural utilisation of the sludge produced at Psytthalia WWTP.** *Water Sci.Technol.* 42: 21-27.
- MARINOVICH, M.; GHILARDI, F.; GALLI, C.L. (1996) **Effect of pesticide mixtures on *in vitro* nervous cells: comparision with single pesticides.** *Toxicology* 108: 201-206.
- MARKING, L.L. (1985) **Toxicity of chemical mixtures.** In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application.* Hemisphere Publishing Corporation, Washington. p.164-176.
- MATAGNE, R.F.; LOPPE, R.; DELTOUR, R. (1976) **Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*: Biochemical and cytochemical approach with specific mutants.** *J. Bacteriol.* 126: 937-950.
- MATTIAZZO, M.E.; BERTON, R.S.; CRUZ, M.C.P. (2001) **Disponibilidade e avaliação de metais pesados potencialmente tóxicos.** In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P., RAIJ, B. van AND ABREU, C.A. *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura.* CNPq/FAPESP/POTAFOS. Jaboticabal. p. 213-234.

- MAYCOCK, D.S.; PRENNER, M.M.; KHEIR, R.; MORRIS, S.; CALLAGHAN, A.; WHITEHOUSE, P.; MORRITT, D.; CRANE, M. (2003) **Incorporation of *in situ* and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides.** *Water Res.* 37: 4180-90.
- MAZORRA, M.T.; RUBIO, J.A.; BLASCO, J. (2002) **Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals.** *Comp. Biochem. Physiol. B*, 13: 241-249.
- MAZZEI, F.; BOTRE, F.; BOTRE, C. (1996) **Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides.** *Anal. Chim. Acta*, 336: 67-75.
- MELLER, M.; EGELER, P.; ROMBKE, J.; SCHALLNASS, H.; NAGEL, R.; STREIT, B. (1998) **Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 39: 10-20.
- MISRA, V.; KUMAR, V., PANDEY, S.D.; VISWANATHAN, P.N. (1991a) **Biochemical alterations in fish fingerlings (*Cyprinus carpio*) exposed to sublethal concentration of linear alkyl benzene sulphonate.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 514-517.
- MISRA, V.; PANDEY, S.D.; VISWANATHAN, P.N. (1991b) **Retardation of biodegradation of linear alkyl benzene sulphonate by sublethal concentration of mercuric chloride.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 561-564.
- MISRA, V.; KUMAR, V.; PANDEY, S.D.; VISWANATHAN, P.N. (1989) **Uptake and distribution of ^{203}Hg by fish fingerlings *Cirrhina mrigala*, exposed to linear alkyl benzene sulphonate.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 139-143.
- MOENNE, A. (2001) **Eucaryotic metallothioneins: proteins, gene regulation and copper homeostasis.** *Cah. Biol. Mar.* 42: 125-135.
- MOHAN, D.; VERMA, S.R. (1981) **Effect of synthetic detergents on *in vivo* activity of tissue phosphatases and succinic dehydrogenase from *Mystus vittatus*.** *Toxicol. Lett.* 8: 171-178.
- MORENO-GARRIDO, I.; HAMPEL, M.; LUBIÁN; BLASCO, J. (2001) **Marine microalgae toxicity test for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and alkylphenol ethoxylate (APEO).** *Fresenius J. Anal. Chem.* 371: 474-478.
- MULLER, M. (1969) **Lysosomal hydrolases in *Acanthamoeba* sp.** *J. Protozool.* 16: 428-431.

- MULLER, M.; BAUDHUIN, P.; DE DUVE, C. (1966) **Lysosomes in *Tetrahymena pyriformis*. I. Some properties and lysosomal localization of acid phosphatase.** *J. Cell. Physiol.* 68: 165-176.
- MURTY, A. S. (1986a) **Pesticides in the environment.** In: MURTY, A. S. *Toxicity of pesticides to fish*. v.1, CRC Press, Boca Raton. p.1-36.
- MURTY, A. S. (1986b) **Joint action of pesticide mixtures.** In: MURTY, A. S. *Toxicity of pesticides to fish*. v.2, CRC Press, Boca Raton. p.35-43.
- MUYSSSEN, B.T.A.; JANSSEN, C.R. (2001) **Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments.** *Chemosphere* 45: 507-514.
- NAGY, A.H.; ERDOS, G.; BELIAEVA, N.N.; GYURJAN, I. (1981) **Acid phosphatase isoenzymes of *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Mol. Gen. Genet.* 184: 314-317.
- NAKAZATO, H.; OKAMOTO, T.; ISHIKAWA, K.; OKUYAMA, H. (1997) **Purification and characterization of phosphatase inducibly synthesized in *Spirodela oligorrhiza* grown under phosphate-deficient conditions.** *Plant Physiol. Biochem.* 35: 437-446.
- NELSON, A.C.; KURSAR, T.A. (1999) **Interactions among plant defense compounds: a method for analysis.** *Chemoecology* 9: 81-92.
- NETRAWALI, M.S.; GANDHI, S.R. (1990) **Mechanism of cell destructive action of organophosphorus insecticide phosalone in *Chlamydomonas reinhardtii* algal cells.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 819-825.
- NEUMAN, H. (1968) **Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase.** *J. Biol. Chem.* 243: 4671-4676.
- NICOLAU, A.; MOTA, M.; LIMA, N. (2004) **Effect of different toxic compounds on ATP content and acid phosphatase activity in axenic cultures of *Tetrahymena pyriformis*.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57: 129-135.
- NIMMO, D.R. (1985) **Pesticides.** In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application.* Hemisphere Publishing Corporation, Washington. p.335-373
- NYC, J.F. (1967) **A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 183-188.

- OBST, U. (1988) **Application of enzyme assays for toxicological water testing.** *Toxic. Assess. Int. J.* 3: 81-91.
- OECD (1981) *Guidelines for Testing of Chemicals.* Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OMAR, H.H. (2002) **Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth metabolism.** *Intern. Biodeter. Biodegrad.* 50: 95-100.
- ORTIZ, J.B.; GONZALEZ DE CANALES, M. L.; SARASQUETE, C. (2003) **Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes.** *Scientia Marina* 67: 53-61.
- PANG, X.P.; LETEY, J. (1999) **Pesticide leaching sensitivity to irrigation, salinity and N application: Model simulations.** *Soil Sci.* 164: 922-929.
- PATNI, N.J. & AARONSON, S. (1974) **Partial characterization of the intra- and extracellular acid phosphatase of an alga, *Ochromonas danica*.** *J. Gen. Microbiol.* 83: 9-20.
- PAYNE, J.F.; FANCEY, L.; RAHIMTULA, A. ; PORTER, E. (1987) **Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring.** *Comp. Biochem. Physiol. C.* 86: 233-245
- PENA-LLOPIS, S.; PENA, J.B.; SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEJA, C.; FERRANDO, M.D. (2001) **Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicidemolinate.** *Chemosphere* 45: 671-681.
- PETERSON, S.M.; STAUBER, J.L. (1996) **New algal enzyme bioassay for the rapid assesment of aquatic toxicity.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 750-757.
- PHILIP, G.H.; ANURADHA, J. (1996) **Role of phosphatases during transport and energy metabolism in *Labeo rohita* after exposure to cypermethrin.** *Biomed. Environ. Sci.* 9: 52-59.
- PIERRE, J.F. (2001) **Suivi algologique de la reserve d'approvisionnement en eau de Richardménil (Lorraine, France).** *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences* 40: 1-2.
- POLYA, G.M.; WETTENHALL, R.E.H. (1992) **Rapid purification and N-terminal sequencing of a potato tuber cyclic nucleotide binding phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta* 1159: 179-184.

- PRISTA, N.; ALVES, C.A. ; MORGADO, R.H. (1979) **Estabilidade dos medicamentos.** In: PRISTA, N.; ALVES, C.A. ; MORGADO, R.H. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica.* V.2. 2 ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 2465-2510.
- RADWAN, M.A.; EL WAKIL, H.B.; OSMAN, K.A. (1992) **Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail *Theba pisana* (Muller).** *J. Environ. Sci. Health B* 27: 759-773.
- RAHMAN, M.F.; MAHBOOB, M.; GOVER, P. (2004) ***In vitro* acetylcholinesterase inhibition by novel OP compounds in various tissues of the fish *Channa punctatus*.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 38-44.
- RAI, L.C.; HUSAINI, Y.; MALLICK, N. (1998) **pH altered the interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*.** *Aquat. Toxicol.* 42: 67-84.
- RAI, L.C.; RAI, P.K.; MALLICK, N. (1996) **Regulation of heavy metal toxicity in acid tolerant *Chlorella*: physiological and biochemical approaches.** *Environ. Exp. Bot.* 36: 99-109.
- RAI, P.K.; RAI, L.C. (1997) **Interactive effects of UV-B and Cu on photosynthesis, uptake and metabolism of nutrients in a green alga *Chlorella vulgaris* under simulated ozone column.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 281-288.
- RAM, R.N.; SINGH, S.K. (1988) **Carbofuran induced histological and biochemical changes in liver of the teleost fish, *Channa punctatus* (Bloch).** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16: 194-201.
- RAMLJAK, S.; HACKENBERGER, B.K.; SMITAL, T.; BRITVIC, S. (2000) **Evaluation of the genotoxic and cytochrome P450 monooxygenase inhibitory potential of dicuran on procaryotic and eucaryotic test systems.** *J. Environ. Sci. Health B, Pest. Food Contam. Agric. Wastes.* 35: 751-770.
- RANDHAWA, V.K.; ZHOU, F.; JIN, X.; NALEWAJKO, C.; KUSHNER, D.J. (2001) **Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green algae *Scenedesmus acutus* f. *alternans*.** *Can. J. Microbiol.* 47: 987-993.

- RAO, K.V.R.; SURENDRANATH, P. (1991) **Effect of kelthane on pH dependency of lipases in tissues of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under sublethal exposure.** *Pest. Biochem. Physiol.* 39: 205-209.
- REDDY, M.S.; RAO, K.V.R. (1990) Aldrin and lindane impact on acid and alkaline phosphatase activities of prawn, *Metapenaeus monoceros*: *in vitro* study. *Biochem. Intern.* 22: 1033-1040.
- REID, R. J. (2001) **Mechanisms of micronutrient uptake in plants.** *Australian J. Plant Physiol.* 28: 659-666
- REPETTO, G.; PESO, A. D.; REPETTO, M. (2000) **Alternative ecotoxicological methods for the evaluation, control and monitoring of environmental pollutants.** *Ecotoxicol. Environ. Restoration* 31: 47-51.
- RICHARDS, S.M.; KENDALL, R.J. (2002) **Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*.** *Environ Toxicol Chem.* 21: 1826-1835.
- RIOBOO, C.; GONZALEZ, O.; HERRERO, C.; CID, A. (2002) **Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides.** *Aquat. Toxicol.* 59: 225-235.
- RIVOAL, J.; DUNFORD, R.; PLAXTON, W.C.; TURPIN, D.H. (1996) **Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green algae *Selenastrum minutum*: Evidence that association of the 102-kDa catalytic with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme.** *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 47-57.
- RIVOAL, J.; TURPIN, D.H.; PLAXTON, W.C. (2002) ***In vitro* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green algae *Selenastrum minutum*.** *Plant Cell Physiol.* 43: 785-792.
- ROCHA, M.T. *Utilização de lodo de esgoto na agricultura: um estudo de caso para as bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivarí e Jundiáí.* Tese de Mestrado. ESALQ/USP, Piracicaba, 1998.
- ROCHE, M.J. (1931) **Sur les phosphatases du sang.** *Bull. Soc. Chem. Biol.* 13: 841-856.
- RODELA, A. A.; ALCARDE, J.C. (2001) **Legislação sobre micronutrientes e metais pesados.** In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P., RAIJ, B. van AND ABREU, C.A. *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura.* CNPq/FAPESP/POTAFOS. Jaboticabal. p.555-576.
- ROST, T.L. (1984) *Botany: a brief introduction to plant biology.* J. Wiley, New York.

302 p.

- ROUND, F.E. (1973) *Biologia das algas*. 2^a edição, Editora Guanabara Dois S.A , Rio de Janeiro. 263 p.
- RUETER, J.G.J.; O'REILLY, K.T.; PETERSON, R.R. (1987) **Indirect aluminum toxicity to the green alga *Scenedesmus* through increased cupric ion activity.** *Environ. Sci. Technol.* 21: 435-438.
- RUUS, A.; SANDVIK, M; UGLAND, K.I.; SKAARE J.U. (2002) **Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web.** *Aquat. Toxicol.* 61: 73-87.
- SABATER, C.; CARRASCO, J.M. (2001) **Effects of the organophosphorus insecticide fenitrothion on growth in five freshwater species of phytoplankton.** *Environ. Toxicol.* 16: 314-320.
- SAEED, A.; TREMORI, E.; MANAO, G.; CAMICI, G.; CAPPUGI, G.; RAMPONI, G. (1990) **Bovine brain low Mr acid phosphatase: Purification and properties.** *Physiol.Chem. Phys. & Med. NMR* 22: 81-94.
- SAEZ, M.; GOMEZ PARRA, A.; GONZALEZ MAZO, E. (2001) **Bioconcentration of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in marine algae.** *Fresenius J. Anal. Chem.* 371: 486-490.
- SAFI, J.M.D. (1996) **Liver enzymes as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides.** *Alex. Sci. Exch.* 17: 351-360.
- SAMUEL, M.; SASTRY, K.V. (1989) **In vivo effect of monocrotophos on the carbohydrate metabolism of the freshwater snake head fish, *Channa punctatus*.** *Pest. Biochem. Phisiol.* 34: 1-8.
- SARTORY, D.P.; GROBBELAAR, J.U. (1984) **Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis.** *Hydrobiologia* 114: 177-187.
- SCHMITTER, R.E.; JURKIEWICZ, A. J. (1981) **Acid phosphatase localization in PAS – bodies of *Gonyaulax*.** *J. Cell. Sci.* 51: 15-23.
- SCHNACKENBERG, J.; SCHULZ, R.; SENGER, H. (1993) **Characterization and purification of a hidrogenase from eukaryotic green algae *Scenedesmus obliquus*.** *FEBS Lett.* 327: 21-24.

- SHARMA, R.M. (1990) **Effect of endosulfan on acid and alkaline phosphatase activity in liver, kidney, and muscles of *Channa gachua***. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 443-448.
- SHEELA, M.; MUNIANDY, S. (1992) **Impacts of pesticide dimethoate on the body composition, acid and alkaline phosphatases in different tissues of the fish *Lepidocephalichthys thermalis***. *Environ. Ecol.* 10: 220-223.
- SHIZHONG, T.; ZAN, L.; JIANHUA, W.; YONGYUAN, Z. (1997) **Growth of *Chlorella vulgaris* in cultures with low concentration dimethoate as source of phosphorous**. *Chemosphere* 35: 2713-2718.
- SIMON, D.; HELLIWELL, S. (1998) **Extraction and quantification of chlorophyll A from freshwater green algae**. *Wat. Res.* 32: 2220-2223.
- SIMON, L.M.; LASZLO, K.; KOTORMAN, M.; VERTESI, A.; BAGI, K.; NEMCSOK, J. (1999) **Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.)**. *J. Environ. Sci. Health B Pest. Food Contam. Agr. Wastes* 34: 819-828.
- SINDAG. *Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Informações do Setor* [online]. Disponível: www.sindag.com.br/new_upload/inforsetor/ingredientes_ativos.xls [capturado em 02 de dec. 2004].
- SINGH, S.P.; TACK, F.M.G.; GABRIELS, D.; VERLOO, M.G. (2000) **Heavy metal transport from dredged sediment derived surface soils in a laboratory rainfall simulation experiment**. *Water Air Soil Poll.* 118: 73-86
- SIVORI, J.L.; CASABE, N.B.; ZERBA, E.N.; WOOD, E.J. (1999) **Fenitrothion toxicity in *Triatoma infestans* synergized by quercetin or thymol blue**. *Pest. Sci.* 55: 18-26.
- SJOBLOM, A.; MEILI, M.; SUNDBOM, M. (2000) **The influence of humic substances on the speciation and bioavailability of dissolved mercury and methylmercury, measured as uptake by *Chaoborus larvae* and loss by volatilization**. *Sci. Total Environ.* 261: 115-124.
- SKLADAL, P.; FIALA, M.; KREJCI, J. (1996) **Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases**. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 65: 139-148.
- SLOAN, J.J.; DOWDY R.H.; BALOGH, S.J.; NATER, E. (2001) **Distribution of mercury in soil and its concentration in runoff from a biosolids-amended agricultural watershed**. *J. Environ. Qual.* 30: 173-2179.

- SOMMER, J.R.; BLUM, J.J. (1965) **Cytochemical localization of acid phosphatase in *Euglena gracilis***. *J. Cell. Biol.* 24: 235-251.
- SPACIE, A. & HAMELINK, J.L. (1985) **Bioaccumulation** In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. p. 495-525.
- STEEVENS, J.A.; BENSON, W.H. (1999) **Toxicological interactions of chlorpirifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyaella azteca***. *Toxicol. Sci.* 52: 168-177.
- STEEVENS, J.A.; BENSON, W.H. (2000) **Interactions of chlorpyrifos and methyl mercury : a mechanistic approach to assess chemical mixtures**. *Mar. Environ. Res.* 50: 113-117.
- STERLING, T.M. (1994) **Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells**. *Weed Sci. (USA)* 42: 263-276
- STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. (2002) **Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes**. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53: 293-304.
- STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. (2000) **Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems**. *Toxicol. in vitro* 14: 361-377.
- SUGIURA, Y.; KAWABE, H.; TANAKA, H., FUJIMOTO, S.; OHARA, A. (1981) **Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese(III)-containing acid phosphatase**. *J. Biol. Chem.* 256:10664-10670.
- SURENDRANATH, P.; GHOUSELAZAM, S.; RAO, K.V.R. (1991) **Significance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tissues of penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under acute kelthane exposure**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 738-744.
- SURESH, P.G.; REJU, M.K.; MOHANDAS, A. (1993) **Haemolymph phosphatase activity levels in two fresh-water gastropods exposed to copper**. *Sci. Total Environ. Suppl.* 2: 1265-1277.
- SUSSMAN, I.; AVRON, M. (1981) **Characterization and partial purification of DL-glycerol-1-phosphatase from *Dunaliella salina***. *Biochim. Biophys. Acta* 661: 199-204.
- TAKAHASHI, H.; OHKI, A.; KATO, S.; TANAKA, A.; SATO, Y.; MATTHES, B.; BOEGER, P.; WAKABAYASHI, K. (2001) **Inhibition of very-long-chain fatty acid biosynthesis by 2-**

- chloro-N-(3-methoxy-2-thenyl)-2',6'-dimethylacetanilide, thenylchlor, and its analogs.** *Pest. Biochem. Physiol.* 71: 140-146.
- TALLARIDA, R.J. (2001) **Drug synergism: its detection and applications.** *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 298: 865-872.
- TALLARIDA, R.J.; PORRECA, F.; COWAN, A. (1989) **Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms.** *Life Sci.* 45: 947-961.
- TANAKA, H.; HORIUCHI, Y.; KONISHI, K. (1975) **Determination of surfactants by use of acid phosphatase.** *Anal. Biochem.* 66: 489-497.
- TANG, J.X.; SIEGFRIED, B.D.; HOAGLAND, K.D.; TANG, J.X. (1998) **Glutathione-S-transferase and *in vitro* metabolism of atrazine in freshwater algae.** *Pest. Bioch. Physiol.* 59: 155-161.
- TARJA, N; KIRSTI E.; MARJA L.; KARI E. (2003) **Thermal and metabolic factors affecting bioaccumulation of triazine herbicides by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Environ. Toxicol.* 18: (4) 219-226.
- TAYLOR, G.E. JR.; SCHALLER, K.B.; GEDDES, J.D.; GUSTIN, M.S. (1996) **Microbial ecology, toxicology and chemical fate of methyl isothiocyanate in riparian soils from the Upper Sacramento River.** *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1694-1701.
- TAYSSE, L.; CHAMBRAS, C.; MARIONNET, D.; BOSGIRAUD, C.; DESCHAUUX, P. (1998) **Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 300-305.
- TEH, S.J.; CLARK, S.L.; BROWN, C.L.; LUOMA, S.N.; HINTON, D.E. (1999) **Enzymatic and histopathological biomarkers as indicators of contaminant exposure and effect in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*).** *Biomarkers* 4: 497-509.
- TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. (1998) **Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40: 194-200.
- THEODOROU, M.E.; ELRIFI, I.R.; TURPIN, D.H.; PLAXTON, W.C. (1991) **Effect of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green algae *Selenastrum minutum*.** *Plant Physiol.* 95: 1089-1095.

- TORNQVIST, L. (1989) **Ultrastructural changes and altered localization of acid phosphatases in *Monoraphidium* and *Stichococcus* cells (Chlorophyceae) influenced by aluminium.** *Environ. Exp. Bot.* 29: 457-465.
- TREBST, A.; DEPKA, B.; HOLLANDER-CZYTKO, H. (2002) **A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *FEBS Lett.* 516: 156-160.
- TROTMAN, N.A.; GREENWOOD, C. (1971) **Effects of zinc and other metal ions on the stability and activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase.** *Biochem. J.* 124: 25-30.
- TSAKOU, A.; ROULIA, M.; CHRISTODOULAKIS, N.S. (2001) **Growth of cotton plants (*Gossypium hirsutum*) as affected by water and sludge from a sewage treatment plant: II. Seed and fiber yield and heavy metal accumulation.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 743-747
- TSEKOS, I.; SCHNEPF, E. (1991) **Acid phosphatase activity during spore differentiation of the red algae *Gigartina teedii* and *Chondria tenuissima*.** *Pl. Syst. Evol.* 176: 35-51.
- TSEKOVA, K.; GALABOVA, D. (2003) **Phosphatase production and activity in copper (II) accumulating *Rizopus delemar*.** *Enzyme Microb. Technol.* 33: 926-931.
- TSUI, M.T.; WANG, W.X. (2004) **Uptake and elimination routes of inorganic mercury and methylmercury in *Daphnia magna*.** *Environ. Sci. Technol.* 38: 808-816.
- TSUJI N.; HIRAYANAGI, N.; IWABE, O.; NAMBA, T.; TAGAWA, M.; MIYAMOTO, S.; MIYASAKA, H.; TAKAGI, M.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. **Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*.** *Phytochemistry* 62: 453-459.
- U.S.E.P.A. U.S. (1994) **96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*.** Environmental Protection Agency SOP#: 2027. 5 p.
- UTSUNOMIYA, A.; WATANUKI, T.; MATSUSHITA, K.; TOMITA, J. (1997) **Toxic effect of linear alkylbenzenesulfonate and quaternary alkylammonium chloride on *Dunaliella sp.* as measured by ¹H-NMR analysis of glycerol.** *Chemosphere* 35: 1215-1226.
- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. (1990) **Effect of metals on enzyme activity in plants.** *Plant Cell Environ.* 13:195-206.

- VERMA, S.R.; BANSAL, S.K.; GUPTA, A.K.; PAL, N.; TYAGI, A.K.; BHATNAGAR, M.C.; KUMAR, V.; DALELA, R.C. (1982) **Bioassay trails with twenty three pesticides to a fresh water teleost, *Saccobranhus fossilis***. *Water Res.* 16: 525-529.
- VERMA, S.R.; TONK, I.P.; CHAND, R. (1985) ***In vivo* accumulation and effects of mercuric chloride on tissue phosphatases of *Notopterus notopterus***. *Clin. Physiol. Biochem.* 3: 199-203.
- VERSTEEG, D.J.; GIESY, J.P. (1986) **The histological and biochemical effects of cadmium exposure in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*)**. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11: 31-43.
- VICENTINI, C.B.; MARES, D.; TARTARI, A.; MANFRINI, M.; FORLANI, G. (2004) **Synthesis of pyrazole derivatives and their evaluation as photosynthetic electron transport inhibitors**. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1898-1906.
- VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. (2004) **Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica**. *Química Nova* 27: 139-145.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASATALDI, H. (1978) *Bioquímica*. 4^o ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 780 p.
- VINCENZINI, M.T.; FAVILLI, F.; TERVES, C.; VANNI, P. (1982) **Specific interaction among some enzymes and sodium dodecyl sulfate**. *Life Sci.* 31: 463-470.
- VRBA, J.; KOMARKOVA, J.; VYHNALEK, V. (1993) **Enhanced activity of alkaline phosphatases – Phytoplankton response to epilimnetic phosphorous depletion**. *Wat. Sci. Technol.* 28 (6): 15-24.
- WALLACE, K.B.; HERZBERG, U. (1988) **Reactivation and aging phosphorylated brain acetyl cholinesterase from fish and rodents**. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92: 307-314.
- WALSH, G.E.; ALEXANDER, S.V. (1980) **A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial wastes**. *Water Air Soil Poll.* 13: 45-55.
- WAN, H.B.; WONG, M.K.; CHUP., Y. (1994) **Mercury (II) ion promoted hydrolysis of some organophosphorous pesticides**. *Pest. Sci.* 42: 93-99.
- WERNER, I.; GEIST, J.; OKIHIRO, M.; ROSENKRANZ, P.; HINTON, D.E. (2002) **Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*)**. *Mar. Environ. Res.* 54: 609-614.
- WHO (1998) *Copper*. Environmental Health Criteria 200. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.

- WHO (1996) *Linear alkylbenzene sulfonates and related compounds*. Environmental Health Criteria 169. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.
- WHO (1989) *Mercury. Environmental Aspects*. Environmental Health Criteria 86. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.
- YAMAMOTO, M. (1972) **Acid phosphatase in *Enteromorpha***. *Phytochemistry* 11: 2451-2453.
- YOKOTA, A.; HARADA, A.; KITAOKA, S. (1989) **Characterization of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from *Euglena gracilis*** *Z. J. Biochem.(Tokyo)* 105: 400-405.
- YOUNG, L.M.; WOUNG, S.H. (2003) **Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata***. *J. Appl. Phycol.* 15: 13-19.
- YOUNGS, H.L.; SUNDARAMOORTHY, M.; GOLD, M.H. (2000) **Effects of cadmium on manganese peroxidase. Competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme**. *Eur. J. Biochem.* 27: 1761-1769.
- ZEINALLI, M; TORRENTS, A. (1998) **Mercury promoted hydrolysis of parathion-methyl: effect of chloride and hydrated species**. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2338-2342.
- ZHOU, X.W.; CHEN, Q.X.; CHEN, Z.; HE, Z.Q.; ZHOU, H.M. (2000) **Effects of oxodiperoxovanadate (V) complexes on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase**. *Biochem. (Moscow)* 65: 1424-1428.
- ZIKIC, R.V.; STAJN, A.S.; PAVLOVIC S.Z; OGNJANOVIC, B.I.; SAICIC, Z.S. (2001) **Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium**. *Physiol. Res.* 50: 105-111.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Preparação do meio de cultura de *S. capricornutum* (OECD, 1981).

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

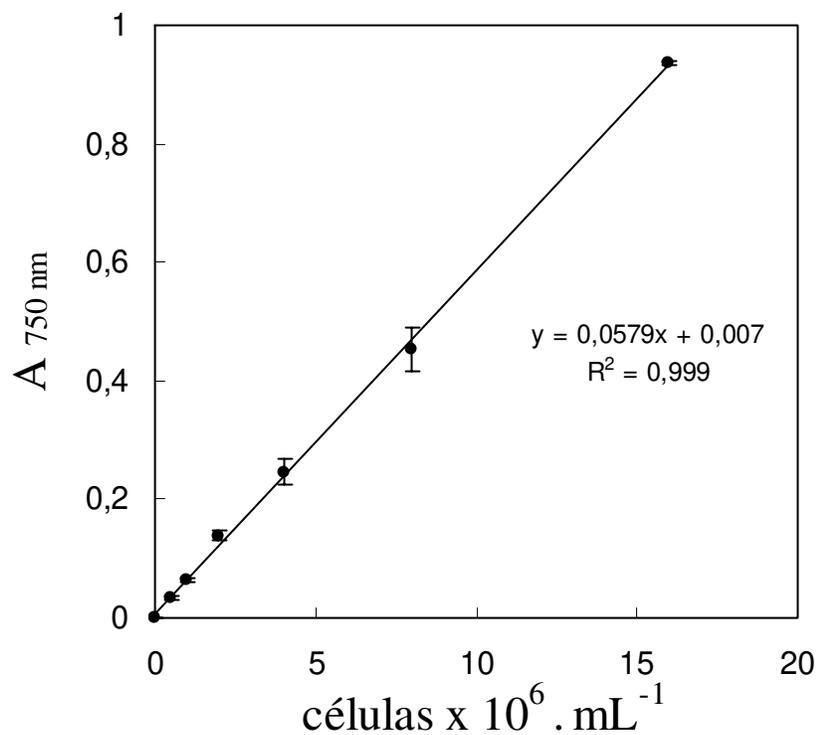
Reagentes	Conc. (g L ⁻¹)
1. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
2. NaNO ₃	50
3. NH ₄ NO ₃	33
4. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5,2
5. CaCl ₂ .2H ₂ O	3,5
6. Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	5,4
7. Citrato férrico	0,6
8. Ácido cítrico monohidratado	0,6
9. Solução de elementos traço:	
H ₃ BO ₃	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08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

As soluções-estoque foram autoclavadas por 20 minutos e guardadas em geladeira.

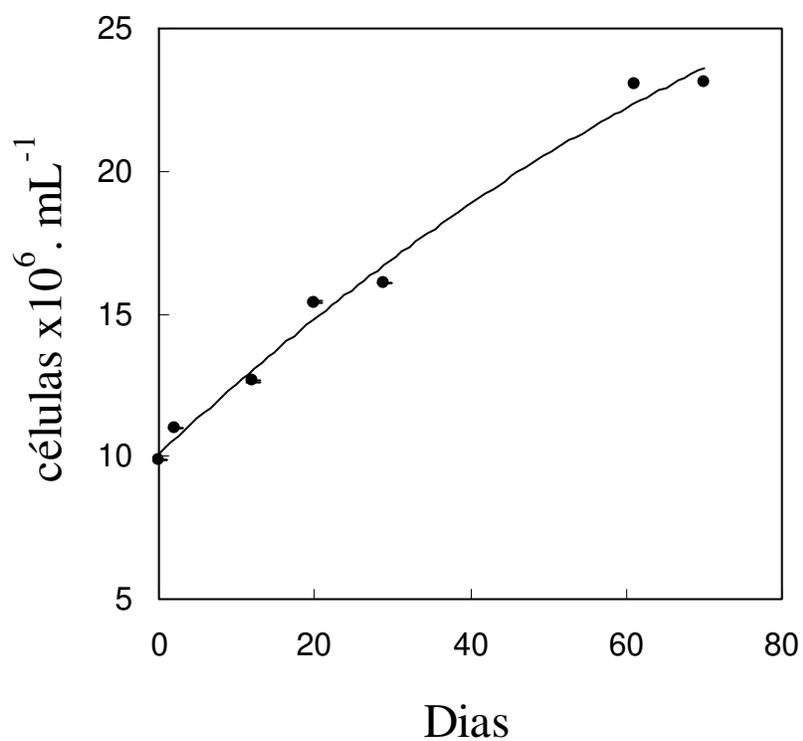
Um volume final de meio de cultura foi preparado adicionando-se os volumes correspondentes de solução-estoque a um volume definido de água destilada, conforme o quadro abaixo:

Volume final do meio de cultura	Volumes de soluções-estoque (mL)									Água destilada (mL)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1 Litro	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	1,0	919,0

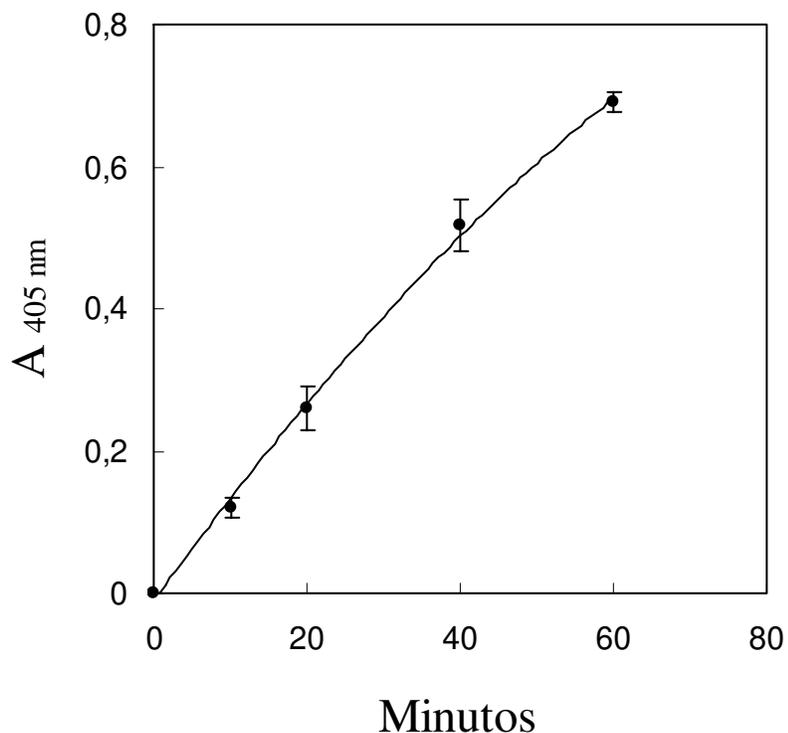
A solução final resultante foi autoclavada durante 20 minutos.



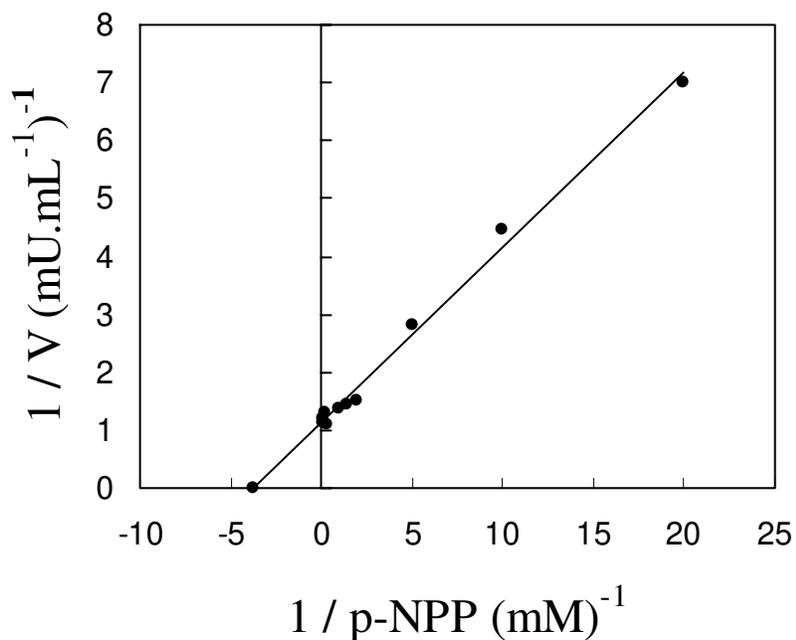
Anexo 2 - Absorvância da suspensão de *S. capricornutum* em função do número de células.



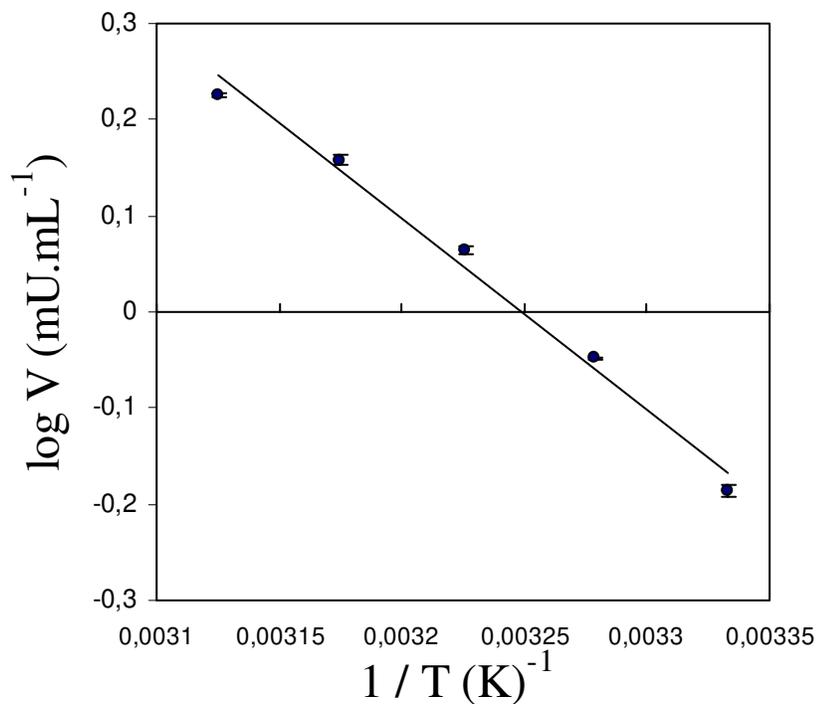
Anexo 3 - Curva de crescimento de *S. capricornutum*.



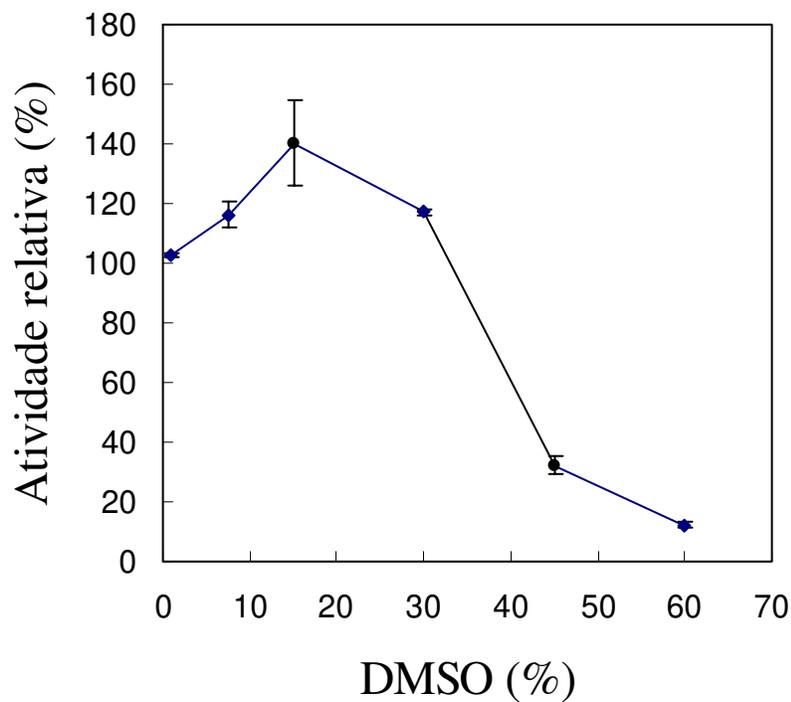
Anexo 4 - Efeito do tempo de incubação na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*. A atividade foi medida pelo p-NP produzido, em um meio de reação contendo, inicialmente, 10 mM de p-NPP.



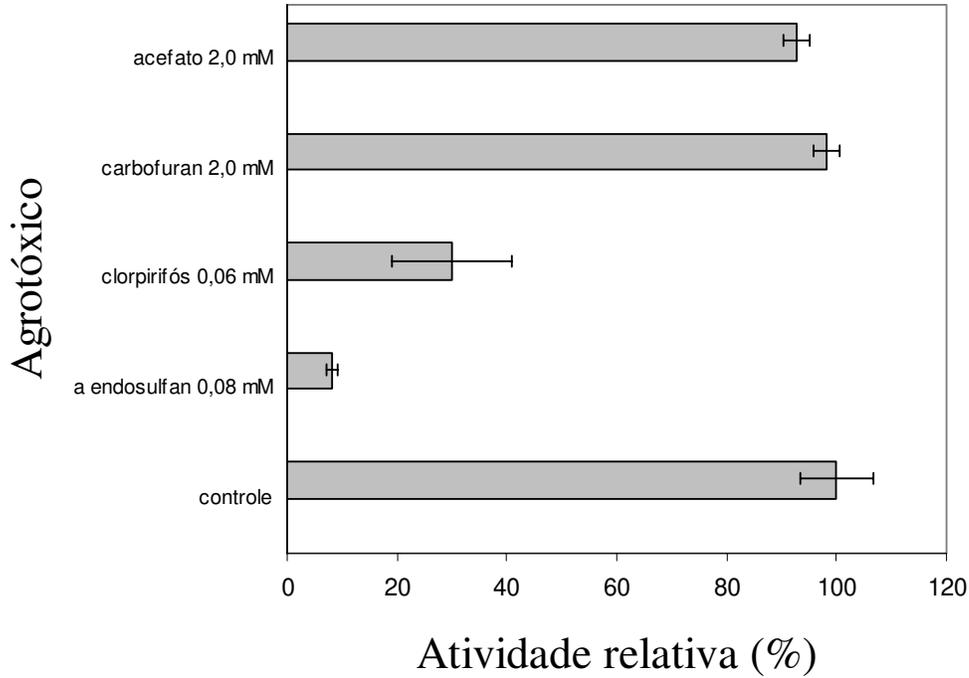
Anexo 5 - Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação de Km e Vmax da fosfatase ácida de *S. capricornutum*. A velocidade inicial (V) foi calculada pela produção de p-NP em amostras incubadas durante 40 minutos a 37 °C.



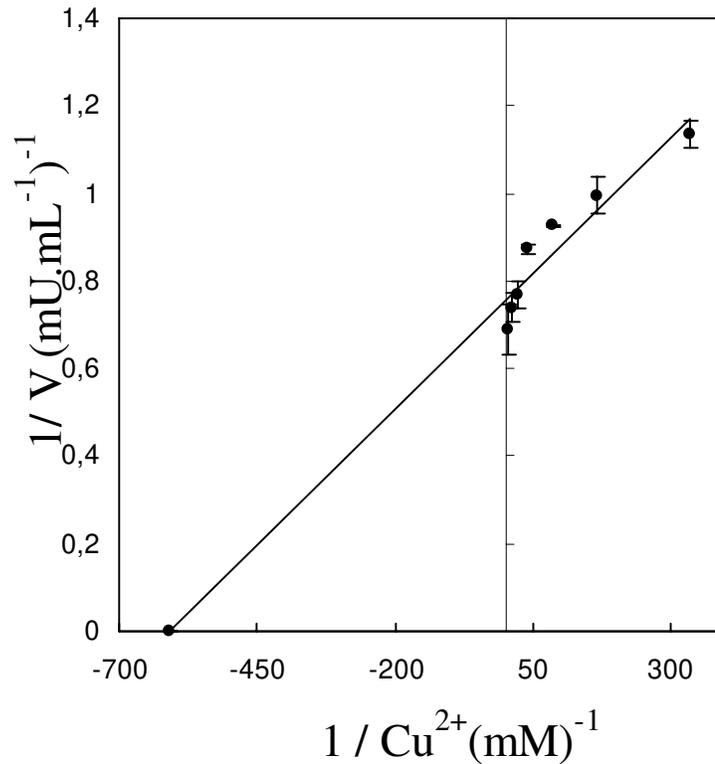
Anexo 6 - Gráfico de Arrhenius na determinação energia de ativação (E_a) da fosfatase ácida de *S. capricornutum*. A velocidade inicial (V) foi calculada pela produção de p-NP em amostras incubadas durante 40 minutos em diferentes temperaturas.



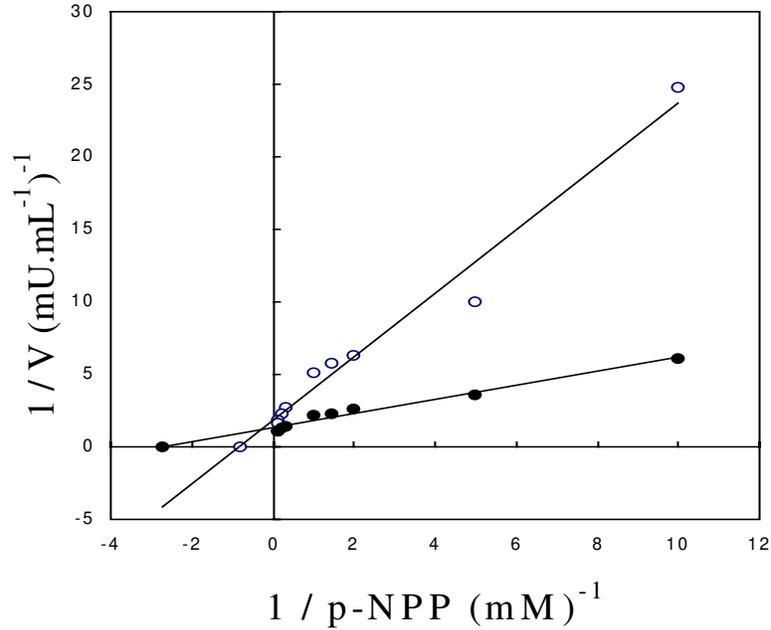
Anexo 7 - Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) na atividade da fosfatase ácida de *S. capricornutum*.



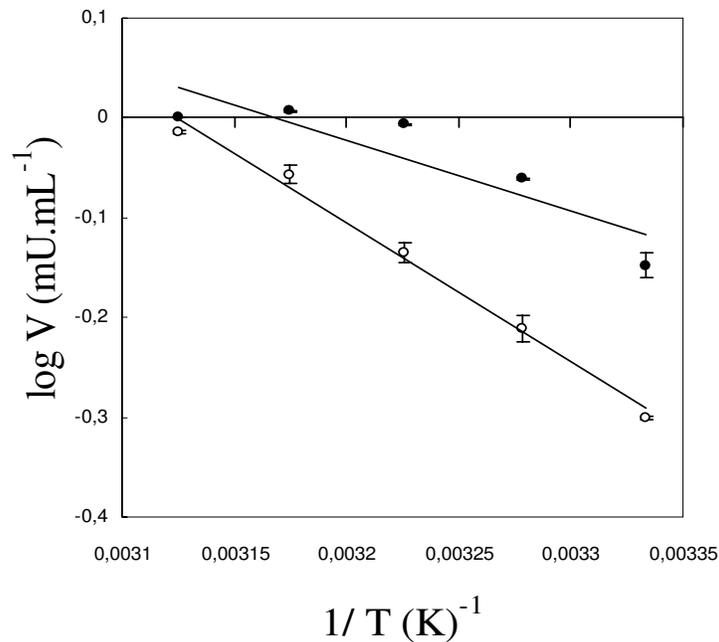
Anexo 8 - Efeito de agrotóxicos na atividade da fosfatase ácida de fígado de tubarão.



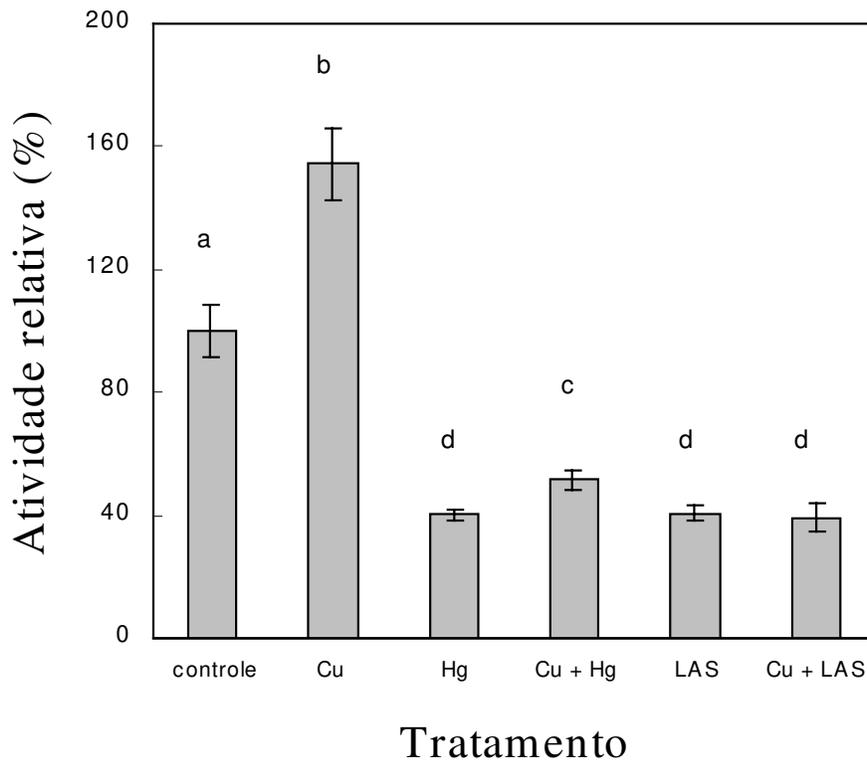
Anexo 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação da constante de dissociação de cobre ($KdCu^{2+}$). A enzima e o metal foram pré-incubados durante 20 min à 37 °C, e no final deste período a atividade enzimática foi determinada após a incubação com 10 mM de p-NPP.



Anexo 10 – Gráfico de Lineweaver-Burk na determinação de parâmetros cinéticos da fosfatase ácida de *S. capricornutum* na ausência ou na presença de íons cobre. A enzima foi pré-incubada na ausência (○) ou na presença de 0,2 mM de Cu²⁺ (●) durante 20 min à 37 °C, e no final deste período a reação enzimática foi iniciada pela adição de 10 mM de p-NPP como substrato.



Anexo 11 - Gráfico de Arrhenius na determinação da energia de ativação (E_a) da fosfatase ácida de *S. capricornutum* na ausência ou na presença de íons cobre. A enzima foi pré-incubada na ausência (○) ou na presença de 0,2 mM de Cu²⁺ (●) durante 20 min a 37 °C, e no final deste período a reação enzimática foi iniciada pela adição de 10 mM de p-NPP como substrato.



Anexo 12 - Efeito da pré-incubação com cobre na inibição da fosfatase ácida pelo mercúrio e LAS. A enzima foi pré-incubada durante 20 min à 37 °C na ausência (controle) ou presença de Cu^{2+} (0,2 mM) sendo que o Hg^{2+} (0,2 mM) e LAS (0,3 mM) foram adicionados após este período. A reação foi iniciada pela adição de p-NPP (10 mM). Tratamentos com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) um do outro.