

2.08.05 - Enzimologia

ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE E CATALASE EM TECIDOS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS* APÓS EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE PRATA

Marcos V.F. Matias^{1*}, Evem K.M. Toledo¹, Elton L. Santos², Claudiane dos S. Marinho³, Sonia S. Machado⁴, Carmem L.P.S. Zanta⁵

1. Estudante de IC do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL
2. Professor do Centro de Ciências Agrárias da UFAL
3. Doutoranda do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL
4. Professora do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL/ Co-orientador
5. Professora do Instituto de Química e Biotecnologia / Orientador

Resumo:

O grande aumento da aplicação da nanotecnologia nas últimas décadas tem gerado grande preocupação, devido ao destino das nanopartículas (NPs) no ambiente. O efeito das NPs no meio ambiente ainda não está completamente elucidado. O monitoramento dos efeitos tóxicos de xenobióticos tem sido avaliado com êxito por biomarcadores enzimáticos de espécies aquáticas, pois apresentam respostas a mudanças biológicas. Dentro deste contexto o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade de concentrações de nanopartículas de prata (AgNP) utilizando como espécie sentinela *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) como biomarcador, avaliando o efeito causado nas enzimas acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular e na catalase (CAT) hepática dessa espécie. Nas análises bioquímicas foi observado diferenças significativas nas atividades de AChE e CAT dos tecidos, nas diferentes concentrações de AgNP, mostrando que os biomarcadores enzimáticos de estudo foram sensíveis à esse nanomaterial.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFAL) sob o número de protocolo 59/2016.

Palavras-chave: Biomarcadores; Ecotoxicidade; Nanopartículas.

Apoio financeiro: CAPES e CNPq

Introdução:

Como consequência do avanço da nanotecnologia, uma grande variedade de nanopartículas (NPs) está sendo processada e descartada no meio ambiente, sem um prévio conhecimento dos seus possíveis efeitos tóxicos. Dentre essas nanopartículas, a nanopartícula de prata (AgNP) tem se destacado, sendo o nanomaterial mais presente nos produtos de consumo diário devido suas propriedades antimicrobianas (KALBASSI et al., 2011).

Os efeitos que os nanomateriais podem causar aos organismos aquáticos podem ser observados através do uso de bioindicadores os quais são importantes no diagnóstico desses efeitos nos sistemas biológicos. Como bioindicador, o uso de peixes se destaca, pois representam o mais diversificado grupo de vertebrados e ocupam um importante papel na cadeia trófica (MELA, 2004; LINS et al., 2010).

A exposição desses nanomateriais pode ocorrer durante a filtração que os organismos aquáticos realizam ou por bioacumulação, e assim podendo interagir com biomoléculas como proteínas devido à relação superfície-massa das NPs (SAPTARSHI et al., 2013). No monitoramento ambiental, os biomarcadores enzimáticos tem se destacado por apresentarem respostas à alteração biológica que reflete os efeitos tóxicos de compostos estranhos a um organismo ou a um sistema biológico (xenobióticos).

Acetilcolinesterase (AChE) tem sido usada como biomarcador, devido a sua relevância nas funções neurais colinérgicas ao hidrolisar a acetilcolina (ACh) finalizando contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um funcionamento normal do sistema sensorial e neuromuscular. AChE é covalentemente inibida por pesticidas como organofosforados e carbamatos (MARTINEZ & CASTRO, 2006; LIONETTO et al., 2013).

No meio celular, as nanopartículas podem gerar um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando estresse oxidativo. Para evitar os danos causados pelas ROS, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa chamados antioxidantes, dentre eles o enzimático. Entre as enzimas que formam esse sistema de defesa está a catalase, que tem a função de reduzir o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água (RODWELL et al., 2016).

Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a ecotoxicidade de nanopartículas de prata através da exposição crônica de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1857) a esse nanomaterial e observar seu efeito tóxico nas alterações das respostas bioquímicas, usando a acetilcolinesterase e catalase como biomarcadores alvos.

Metodologia:

Alevinos de *O. niloticus* foram obtidos da Estação de Piscicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL). Inicialmente foram aclimatados por um período de 10 dias, durante esse período, os peixes foram alimentados e os parâmetros de qualidade de água foram monitorados. Ao finalizar esse período, os peixes foram transferidos para os aquários de 20 L, com volume de trabalho de 15 L.

O delineamento experimental contou com um total de 8 tratamentos, controle água, controle polivinilpirrolidona à 5mg L⁻¹ (PVP, estabilizante da AgNP) e diferentes concentrações de AgNP em pó (5, 10, 15, 20, 30 e 40 mg L⁻¹). Ao finalizar o período de 96 h em jejum exposto à AgNP, os peixes foram anestesiados e sacrificados. Os tecidos cerebrais, musculares e hepáticos foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e depois armazenados em freezer -20°C para posterior análise enzimática.

Posteriormente, os tecidos foram pesados e macerados em homogeneizador de vidro com tampão fosfato de potássio (20 mM, com 0,1% triton e 150 mM de NaCl) para o tecido hepático e com NaCl 0,9% para o tecido cerebral e muscular, em seguida os extratos cerebrais e muscular foram submetidos ao disruptor de células e por fim, os extratos hepático e muscular foram centrifugados à 10000 g por 10 min e 4 °C.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular foi determinada utilizando o método de Ellman et al., 1961 e a atividade de catalase hepática foi determinada de acordo com Miron et al., 2008. A concentração protéica foi determinada usando o método de Bradford (1976). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o modo one-way ANOVA no GraphPad 6.

Resultados e Discussão:

Ao analisar os tecidos cerebrais dos peixes expostos à AgNP foi observado que houve variação significativa na atividade específica da enzima acetilcolinesterase nas concentrações acima de 10 mg L⁻¹, comparado ao controle. E nos tecidos musculares houve variação significativa em todos os tratamentos, sendo mais acentuada os expostos à concentração de 40 mg L⁻¹ de AgNP.

Ao comparar as atividades de acetilcolinesterase de ambos os tecidos de *O. niloticus*, observa-se um decaimento em função da concentração de AgNP. Porém, nos tecidos cerebrais o percentual de decaimento é mais robusto do que nos tecidos musculares, pois apresentou uma redução máxima de 44% para o tratamento de 20 mg L⁻¹ quando comparado ao controle. Assim, as acetilcolinesterases de ambos os tecidos de *O. niloticus* mostram-se sensíveis à exposição de AgNP, podendo ser aplicadas com êxito em biomonitoramento aquático de AgNP.

Para a atividade específica da CAT hepática, observou-se também diferença significativa em todos os tratamentos com redução na atividade de até 48% para a concentração de 40 mg L⁻¹ de AgNP, quando comparado ao controle, assim, mostrando que *O. niloticus* exposto a esse nanomaterial sofre estresse oxidativo.

Conclusões:

A sensibilidade da AChE cerebral e muscular de *O. niloticus* quando em contato com as diferentes concentrações de AgNP e as alterações observadas na atividade da CAT hepática indicaram que os alevinos de *O. niloticus* (Tilápia do Nilo) sofreram estresse oxidativo quando exposto por 96 h à nanopartícula de prata, sendo o efeito dependente da concentração dessas partículas.

Referências bibliográficas:

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Department Of Biochemistry, University Of Georgia, Athens, Georgia, v. 72, p. 248-254, maio. 1976.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Department Of Pharmacology, University Of California Medical Center, San Francisco, California USA, v. 7, p. 91-95, jul. 1961.

REZA KALBASSI, Mohammad ; SALARI-JOO, Hamid ; JOHARI, Ali . Toxicity of Silver Nanoparticles in Aquatic Ecosystems: Salinity as the Main Cause in Reducing Toxicity. **Iranian Journal of Toxicology**, Faculty Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran., v. 5, n. 1 & 2, p. 436-443, abr. 2011.

LINS, José Augusto Pereira Navarro et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, dez. 2010.

LIONETTO, Maria Giulia et al. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. **BioMed Research International**, 2013.

MARTINEZ, A.; CASTRO, A. Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15(1), p. 1-12, 2006.

MELA, M. **Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra)**. 2004. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2004.

MIRON, Denise dos Santos et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, Universidade Federal de Santa Maria UFSM, v. 74, p. 1-5, dez. 2008.

RODWELL, Victor W. et al. **A Bioquímica Ilustrada de Harper**. AMGH Editora LTDA, 30º ed, 2016.

SAPTARSHI, Shruti R et al. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11(1), p. 11-26, 2013.