

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BIOINDICAÇÃO DE METAIS TÓXICOS EM ÁGUA ATRAVÉS DE PARÂMETRO
ENZIMÁTICO EM PLÂNCTON: δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

ROSELE DE FELIPPE WITTÉE NEETZOW SCHOLEM

Porto Alegre, dezembro de 1991

ROSELE DE FELIPPE WITTÉE NEETZOW SCHOLEM

BIOINDICAÇÃO DE METAIS TÓXICOS EM ÁGUA ATRAVÉS DE PARÂMETRO
ENZIMÁTICO EM PLÂNCTON: δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ecologia, pelo Curso de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Comissão Examinadora:

- . Prof. Dr. Tuiskon Dick (Orientador) - UFRGS
- . Prof. Dr. Kurt Henrique Sommer
- . Prof. Dr. Renato Dutra Dias

Data do Exame de Dissertação: 18/12/91

PORTO ALEGRE

1991

Dedico este trabalho

*Aos meus pais Carlos e Yara
pelo amor e força demonstrados no
decorrer dos anos.*

*Ao meu esposo e amigo Danny,
pelo amor que nos une, paciência
e incentivo recebidos.*

AGRADEÇO

- . Ao professor Tuiskon Dick pela orientação técnica, crítica, amiga e segura durante o desenvolvimento deste trabalho.
- . À Coordenação do Centro de Ecologia e do Curso de Pós-Graduação em Ecologia, pelo apoio recebido na concessão de bolsa de estudo do CNPq e pelo apoio logístico.
- . Aos funcionários do Centro de Ecologia, em especial ao Manoel Fraga da Cunha, Bráulio Silva e Luis Carlos Alles pelo auxílio no acompanhamento das coletas.
- . Aos colegas do Grupo de Bioquímica Ecológica, pelo interesse no trabalho, especialmente à amiga Maria de Lourdes Belinaso.
- . Ao professor Neron Arruda Leonel, pela orientação recebida no tratamento estatístico dos dados.
- . À Zulanira Meyer Rosa, da Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul, pela identificação das amostras.
- . À colega Vera Lúcia Atz, pelo auxílio na execução das análises.
- . Ao amigo Ozório José de Menezes Fonseca, pela amizade e empenho na busca de bibliografia e auxílio nas tarefas.

- . À amiga Maria Teresa Mônica Raya Rodriguez de Amazarray, pelo carinho demonstrado no decorrer dos anos.
- . Em especial às forças invisíveis de vida, representadas pelo plâncton que precisam e devem ser preservadas.

RESUMO

Com o objetivo de se utilizar um parâmetro bioquímico para avaliação ambiental do efeito de poluentes metálicos, através de bioindicadores, foi examinada a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (E.C.4.2.1.24) em plâncton "*in vitro*" e "*in vivo*".

Parâmetros enzimáticos são facilmente quantificáveis, reproduzíveis e indicados para a bioindicação precoce.

A caracterização preliminar da δ -ALA-D foi a seguinte: pH ótimo = 8,6 (a 37°C) com Km aproximado = $4,0 \times 10^{-3}$ M. A atividade é sensível à monoiodoacetamida. Íons metálicos inibem energicamente a enzima, "*in vitro*", já no nível de μ M, com efeito inibitório decrescente de $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ com I_{50} aproximado de 3, 6, 18, 18 e 100×10^{-6} M, respectivamente. Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} não inibem significativamente a enzima nas condições testadas. Co^{2+} inibe em concentrações elevadas e Ni^{2+} apresentou comportamento peculiar.

EDTA inibe a enzima δ -ALA-D no material estudado ($0,06 \times 10^{-3}$ M), indicando que ela pode requerer um cofator metálico. Os íons Zn^{2+} , Ni^{2+} e Cd^{2+} são prováveis cofatores, pois revertem a inibição pelo EDTA.

EDTA recupera a atividade da δ -ALA-D quando inibida pelos íons Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} na faixa de 0,03 a 0,09 x 10^{-3}M . No caso de inibições com Pb^{2+} e Co^{2+} existe recuperação nas concentrações de 0,15 e 0,21 x 10^{-3}M de EDTA, respectivamente. Por outro lado, EDTA não recupera suficientemente, quando a enzima for inibida por Hg^{2+} .

Concentrações de DTT acima de $7 \times 10^{-3}\text{M}$ causam um decréscimo da atividade enzimática. Em concentrações menores ($3 \times 10^{-3}\text{M}$) ele reativa a enzima inibida por Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e também por Hg^{2+} , sozinhos ou em conjunto.

Com estes dados foi desenvolvido um método para detectar a inibição da δ -ALA-D de plâncton por metais, usando DTT como reativador.

Comparou-se as atividades enzimáticas desenvolvidas no teste padrão com e sem DTT, de onde se calcula o parâmetro "atividade diferencial: $\Delta \%$ ".

Experimentou-se este método num teste piloto de monitoramento passivo em lagos artificiais da cidade de Porto Alegre e lagoas de estabilização industriais.

Trabalhou-se os dados coletados de diversas maneiras. Obteve-se correlações estatísticas significativas utilizando-se coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações molares dos metais individuais (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+}) e as diversas frações amostradas (amostra inicial, amostra filtrada, sobrenadante 1 e 2, sedimento 1 e 2 e $\Delta \%$). Correlacionou-se, também, estas amostras com o somatório das concentrações mo-

lares dos metais e com o somatório das concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição - I_{50} , referido a Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , encontrando-se, novamente, correlações significativas.

Conclui-se que a "atividade diferencial $\Delta \%$ " da δ -ALA-D em plâncton é um parâmetro expressivo para bioindicação de poluição metálica em águas.

ABSTRACT

With the purpose of using a biochemical parameter for environmental evaluation of effects of metallic pollutants through bioindicators, a δ -aminolevulinate dehydratase (E.C.4.2.1.24) was assayed in plancton, "in vitro", "in vivo".

Enzymic parameters are easily measured and reproduced and also allow early bioindication.

The preliminary characterization of δ -ALA-D was as follows: pH opt = 8,6 (at 37°C) with Km appr = $4,0 \times 10^{-3}$ M. The activity is sensitive to IAM. Inhibition by metallic ions is severe, even in concentrations of μ M with the following decreasing order of inhibition effect: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, respectively with approximated I_{50} of 3, 6, 18, 18 and 100×10^{-6} M. The enzyme was not inhibited significantly by Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} , under evaluated conditions. The enzymic activity was inhibited by Co^{2+} in high concentrations. Ni^{2+} presented a singular behaviour.

The activity is also inhibited by EDTA ($0,06 \times 10^{-3}$ M). That gives support to the idea that it might be a metalloenzyme. Zn^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} are capable of reverting the inhibition

by EDTA, and may act as cofactors.

EDTA recovers δ -ALA-D activity when inhibited by the ions Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} at the range of 0,03 to 0,09 $\times 10^{-3}\text{M}$. In the case of Pb^{2+} and Co^{2+} inhibition may be recovered by concentrations of 0,15 and 0,21 $\times 10^{-3}\text{M}$ of EDTA, respectively. However, EDTA does not recover activity sufficiently when the enzyme is inhibited by Hg^{2+} .

Concentrations of DTT higher than $7 \times 10^{-3}\text{M}$ caused a decrease in enzymic activities. In lower concentrations, DTT recovers the activity of δ -ALA-D inhibited by Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} and also by Hg^{2+} , individually or mixed.

EDTA and DTT were tested as possible reactivators in order to develop a method capable of detecting δ -ALA-D inhibition by metals in plancton.

Enzymic activities are compared, based on a standardized method, with and without DTT, therefore allowing the calculation of the Δ % parameter (differential activity).

The method was applied in a pilot test of passive monitoring in artificial lakes of Porto Alegre and stabilization lagoons of industries.

The experimental data were analyzed in different ways.

Significative statistic correlations were obtained using the Spearman correlation coefficient between the molar concentrations of the individual metals (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+}) and the different samples in fractions (initial sample, filtered sample, supernatant samples 1 and 2, sedimented samples 1 and 2 and differential activity).

These samples were correlated also, with the summ of the molar concentrations of metals and with the summ of the correct molar concentrations of the metals related to the relative effect of inhibition - I_{50} , refered to Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} , showing, again, significative correlation.

It can be concluded that the differential activity $\Delta \%$ of the δ -ALA-D, in plancton, is an expressive parameter for the bioindication of metal pollution in water.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE QUADROS	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xxv
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - <u>Metais e metais traço nos organismos</u>	1
1.2 - <u>O uso de bioindicadores</u>	2
1.3 - <u>Escolha de parâmetros bioquímicos</u>	3
1.4 - <u>Por que plâncton?</u>	4
1.5 - <u>Interações entre metais - plâncton</u>	5
1.6 - <u>Delta aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D)</u>	6
1.7 - <u>Objetivos</u>	11
2 - MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 - <u>Materiais</u>	13
2.1.1 - Reagentes	13
2.1.2 - Soluções	14
2.1.3 - Equipamentos	17
2.1.4 - Vidraria	18
2.2 - <u>δ-ALA - desidratase de plâncton</u>	18
2.2.1 - Fonte enzimática	18
2.2.2 - Técnica de ensaio para extração enzimática	19

2.2.3 - Técnica de ensaio para incubação enzimática	20
2.2.3.1 - Ensaio padrão	21
2.2.3.2 - Tempo de incubação	22
2.2.3.3 - Concentração enzimática	22
2.2.3.4 - Concentração de substrato	22
2.2.3.5 - pH ótimo de incubação	26
2.2.3.6 - Temperatura de incubação	26
2.2.4 - Determinação de proteína	26
2.2.5 - Cálculo da atividade específica	26
2.3 - <u>Fracionamento das amostras</u>	30
2.3.1 - Preparação das amostras	33
2.3.1.1 - Água dos lagos e Sobrenadante 1	33
2.3.1.2 - Filtrado e Sobrenadante 2 (Extrato Enzimático)	33
2.3.1.3 - Sedimento 1 e Sedimento 2	34
2.3.2 - Análise dos metais	34
3 - RESULTADOS	35
3.1 - <u>Caracterização da enzima</u>	35
3.1.1 - Efeito do pH	36
3.1.2 - Efeito da temperatura de incubação	36
3.1.3 - Efeito da concentração do substrato e Km	36
3.1.4 - Microorganismos representativos da fração de plâncton utilizada	37
3.1.5 - Efeito do monoiodoacetamida (IAM)	39
3.1.6 - Efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).	39
3.1.7 - Efeito do ditiotreitól (DTT)	39
3.1.8 - Efeito de cátions metálicos	42
3.2 - <u>Recuperação da atividade enzimática inibida utilizando agentes quelantes</u>	48

3.2.1 - Recuperação com DTT	48
3.2.2 - Recuperação com EDTA	55
3.2.3 - Recuperação da atividade enzimática inibida com íons metálicos, através de DTT, usando diversas concentrações de enzima	63
3.2.4 - Recuperação da atividade enzimática inibida com íons metálicos, através de EDTA, usando diversas concentrações de enzima	69
3.2.5 - Recuperação da atividade enzimática quando inibida simultaneamente por íons metálicos, através de DTT	75
3.3 - <u>Identificação de cofatores metálicos</u>	78
3.4 - <u>Teste de exposição de amostras de plâncton a Cd^{2+}, variando o tempo de exposição e a concentração de plâncton</u>	78
3.4.1 - Tempo de exposição	80
3.4.2 - Efeito da concentração de plâncton	81
3.5 - <u>Teste piloto numa amostragem em campo</u>	84
3.5.1 - Coleta e análise de amostras	84
3.5.2 - Aplicação do teste estatístico não paramétrico de Spearmann	86
3.5.3 - Caracterização dos pontos de amostragem e dos elementos	88
4 - DISCUSSÃO	108
4.1 - <u>pH ótimo, temperatura ótima e K_m</u>	109
4.2 - <u>Efeito da concentração de IAM, EDTA e DTT</u>	111
4.3 - <u>Efeito dos íons metálicos</u>	114

4.4 - <u>Inibição enzimática por metais pesados e recuperação da atividade com EDTA e DTT</u>	117
4.5 - <u>Efeito da variação de concentração de planctôn e tempo de exposição sobre a atividade enzimática quando inibida por Cd²⁺, em escala de laboratório</u>	122
4.6 - <u>Amostragem em campo</u>	123
CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	23
Figura 2 - Relação entre concentração de material enzimático sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	24
Figura 3 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton ...	25
Figura 4 - Efeito do pH de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	27
Figura 5 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton ...	28
Figura 6 - Curva de calibração usada na dosagem de proteínas do extrato enzimático do plâncton	29
Figura 7 - Fluxograma da preparação das diversas amostras obtidas pelo fracionamento do material plantônico	32
Figura 8 - Efeito da concentração de IAM sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	40

Figura 9 - Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	41
Figura 10 - Efeito da concentração de DTT sobre a atividade da δ -ALA desidratase de plâncton	43
Figura 11 - Efeito da concentração do íon Ca^{2+} sobre a atividade enzimática da δ -ALA desidratase de plâncton	44
Figura 12 - Efeito da concentração do íon Mg^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton .	45
Figura 13 - Efeito da concentração do íon Mn^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton .	46
Figura 14 - Efeito da concentração do íon Co^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton .	47
Figura 15 - Efeito da concentração do íon Ni^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton .	49
Figura 16 - Efeito das concentrações dos íons Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} e Cd^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton	50
Figura 17 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Hg^{2+} ($10 \times 10^{-6}\text{M}$) e Pb^{2+} ($100 \times 10^{-6}\text{M}$), através do DTT	51
Figura 18 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Zn^{2+} ($50 \times 10^{-6}\text{M}$) e Cu^{2+} ($15 \times 10^{-6}\text{M}$) através do DTT	52

- Figura 19 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se em plâncton, inibida por Cd^{2+} ($50 \times 10^{-6}\text{M}$) e Co^{2+} ($200 \times 10^{-6}\text{M}$), através do DTT 53
- Figura 20 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se em plâncton, inibida por Ni^{2+} ($70 \times 10^{-6}\text{M}$) através do DTT 54
- Figura 21 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Zn^{2+} ($50 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 56
- Figura 22 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Cu^{2+} ($20 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 57
- Figura 23 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se em plâncton, inibida por Ni^{2+} ($70 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 58
- Figura 24 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Cd^{2+} ($50 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 59
- Figura 25 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Pb^{2+} ($100 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 60
- Figura 26 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Co^{2+} ($200 \times 10^{-6}\text{M}$) através de EDTA 61
- Figura 27 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidrata-se de plâncton, inibida por Hg^{2+} ($10 \times 10^{-6}\text{M}$)

	através de EDTA	62
Figura 28 -	Inibição com Pb^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT	64
Figura 29 -	Inibição com Hg^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT	65
Figura 30 -	Inibição com Zn^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT	66
Figura 31 -	Inibição com Cd^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT	67
Figura 32 -	Inibição com Cu^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT	68
Figura 33 -	Inibição com Cu^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA	70
Figura 34 -	Inibição com Zn^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA	71
Figura 35 -	Inibição com Cd^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA	72

- Figura 36 - Inibição com Pb^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA 73
- Figura 37 - Inibição com Hg^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA 74
- Figura 38 - Inibição metálica do extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton com Solução Mista 1 contendo Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 76
- Figura 39 - Inibição metálica do extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton com Solução Mista 2 de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 77
- Figura 40 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por EDTA ($0,45 \times 10^{-3}M$) através de concentrações crescentes de Ni^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} 79
- Figura 41 - Incorporação do metal Cd^{2+} , em plâncton, ao longo do tempo de exposição 82
- Figura 42 - Incorporação do metal Cd^{2+} , em diferentes concentrações de plâncton 83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Concentração dos metais Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas diversas amostras obtidas pelo fracionamento do material planctônico dos 15 pontos de amostragens, bem como a atividade específica da δ -ALA-D em cada ponto e seu Δ % 89
- Tabela 2 - Concentração molar de metais [Me] da fração A_I , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro, Σ - somatório simples das concentrações molares 94
- Tabela 3 - Concentração molar de metais [Me] da fração AF, das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares 95
- Tabela 4 - Concentração molar de metais [Me] da fração SN_1 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares 96
- Tabela 5 - Concentração molar de metais [Me] da fração SED_1 , das diversas amostragens. Concentração em

	mol/litro. - somatório simples das concentrações molares	97
Tabela 6	- Concentração molar de metais [Me] da fração SN_2 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares	98
Tabela 7	- Concentração molar de metais [Me] da fração SED_2 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares	99
Tabela 8	- Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração A_I , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas	100
Tabela 9	- Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo da inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração AF, das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas	101
Tabela 10	- Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo da inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SN_1 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas	102

- Tabela 11 - Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo da inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SED_1 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas 103
- Tabela 12 - Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo da inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SN_2 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas 104
- Tabela 13 - Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo da inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SED_2 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas 105

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 - ESQUEMA DO ENSAIO PADRÃO DE DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO PORFOBILINOGÊNIO (PBG) FORMADO NA INCUBAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE PLÂNCTON 21
- QUADRO 2 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN (r_s), UTILIZANDO AS CONCENTRAÇÕES MOLARES DOS METAIS INDIVIDUAIS 106
- QUADRO 3 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN UTILIZANDO O SOMATÓRIO DAS CONCENTRAÇÕES MOLARES DOS METAIS 106
- QUADRO 4 - COEFICIENTES DE SPEARMANN UTILIZANDO O SOMATÓRIO DAS CONCENTRAÇÕES MOLARES DOS METAIS CORRIGIDOS CONFORME EFEITO RELATIVO DE INIBIÇÃO - I_{50} , referido a Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} 107

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	- ácido delta-aminolevulínico
δ -ALA	- ácido delta-aminolevulínico
δ -ALA-desidratase	- delta-aminolevulinato desidratase
δ -ALA-D	- delta-aminolevulinato desidratase
PBG	- porfobilinogênio
DTT	- DL-ditiotreitol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
IAM	- iodoacetamida ou monoiodoacetamida
I_{50}	- concentração de produto que causa 50% de inibição da atividade enzimática
Km	- constante de Henri-Michaelis-Menten
AI	- amostra inicial
Ai	- amostra inicial (200 litros)
AF	- amostra filtrada
SN1, SN2	- Sobrenadante 1, Sobrenadante 2
SED1, SED2	- Sedimento 1, Sedimento 2
Δ %	- delta percentual
Ae	- atividade específica

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Metais e metais traço nos organismos

Na composição química dos seres vivos, íons metálicos ocupam posição fundamental. Alguns têm função plástica contribuindo para a morfologia dos mesmos (Ca^{2+} nos tecidos ósseos), outros têm função fisiológica importante (Na^+ e Cl^- na tonicidade intracelular) e um grande número possui um envolvimento direto com os processos bioquímicos nos seres vivos (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , etc). A habilidade dos organismos em assimilar nos seus tecidos, microquantidades destes elementos é um fenômeno bem conhecido, explicado pelo fato de que um certo número de metais constituem elementos traço essenciais a processos metabólicos. Participam, em regra, da catálise enzimática como cofatores e são, portanto, imprescindíveis no processo vital celular. A sua falta reflete uma redução de processos enzimáticos correspondentes e podem se traduzir em danos metabólicos. Contudo, muitos destes bioelementos, em excesso, como no caso do próprio zinco, podem causar manifestações toxicológicas (VALLE & ULMER, 1972; BONSIGNORE et al., 1965). É claro que os testes químicos para quantificar a presença de poluentes no ar, solo e água são importantes (ALLEN et al., 1974). Contudo, a

forma como estes poluentes, no caso os metais, se encontram na natureza, isto é, apresentando disponibilidades diversas, pode ser tão ou mais importante do que a concentração total medida (ALLEN et al., 1983). Ainda, sua distribuição intracelular e intertecdual diferenciada (VOLESKY, 1986) e finalmente seus diversos mecanismos de ação nos seres vivos, podem se traduzir, de caso a caso, em efeitos bem diferentes tanto em qualidade como em intensidade (WHITTON, 1970; DISSANAYAKE, 1983).

1.2 - O uso de bioindicadores

Uma das maneiras encontradas para tentar relacionar as alterações biológicas ocorridas nos organismos com a concentração de metal disponível no meio ambiente é a utilização de bioindicadores. Somente organismos vivos permitem avaliar a toxicidade do poluente sob condições variáveis, pois absorvem e concentram metais, informando se a substância incorporada causa ou não efeitos negativos ao ser que a incorporou.

Estes organismos indicadores introduzem variáveis biológicas que não estão presentes nos estudos químicos de águas ou sedimentos (PHILLIPS, 1977) e que devem ser consideradas.

No caso da poluição, o bioindicador (animal, planta, microorganismo) não é um simples coletor do agente químico poluente, mas é também o portador de processos biológicos que alterados ou mesmo abolidos, podem expressar a real modificação ou, mesmo, dano no plano biológico.

Para uma avaliação de carga ambiental de poluentes, o exame dos efeitos de poluentes pode ser mais significativo que

o levantamento de causas, tendo em vista que as respostas no nível metabólico, especialmente enzimático, face a variações de fatores ambientais, em regra, devem preceder, no ser vivo, respostas fisiológicas ou morfológicas.

Medindo-se efeitos em bioindicadores, pode-se quantificar o fenômeno, avaliar processos sinérgicos e cumulativos, realizar testes de monitoramento passivo e monitoramento ativo (testes de exposição), todos muito mais expressivos do que a simples medida da concentração de um agente químico como causa potencial de poluição.

Nos ensaios com bioindicação, ao invés do simples acompanhamento de taxas de crescimento e alterações morfológicas, cresce, cada vez mais, o uso de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (enzimáticos) como forma de averiguar as modificações biológicas (JENSEN, 1981).

1.3 - Escolha de parâmetros bioquímicos

Com o objetivo de estabelecer-se métodos eficientes de execução rápida e econômica, para "monitoramento precoce" de cargas poluentes ambientais, é proposta do grupo de Bioquímica Ecológica do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, efetuar testes enzimáticos a partir da bioindicadores, adequadamente selecionados, e que permitam perceber, em primeiro plano, precocemente, efeitos ou danos biológicos causados por um poluente (metais pesados) antes mesmo que se possa observar alteração nos planos fisiológico, toxicológico, morfológico ou letal.

Deve-se levar em consideração que, face aos processos homeostáticos que regulam as atividades enzimáticas nos seres vivos, os índices normais que podem ser estabelecidos a base de parâmetros enzimáticos, são, normalmente, constantes e de oscilação relativamente restrita. Estas oscilações, quando ocorrem, devem-se habitualmente a inibições ou ativações diretas de enzimas ou a ativação/inibição de sua síntese.

1.4 - Por que plâncton?

Por muitos anos, os peixes foram o único grupo de organismos aquáticos usados em testes de toxicidade. Contudo, está crescendo o uso de *Daphnia* sp (BERGLIND, 1985; BERGLIND et al., 1985) representando a fauna de invertebrados e mais recentemente, algas estão sendo usadas, representando os produtores primários (LLOYD, 1981).

Neste trabalho, o organismo escolhido para servir como portador do sensor enzimático, é uma fração do plâncton composto, em sua quase totalidade, por algas.

Estes organismos microscópicos são particularmente convenientes para bioensaios com metais pesados pois:

- apresentam rápido crescimento e curto tempo de geração (JENSEN, 1981);

- possuem eficiente acumulação de muitos metais num curto espaço de tempo e toleram os níveis de metais normalmente encontrados no meio (KHUMMONGKOL et al., 1982; BUTLER, 1981).

1.5 - Interações entre metais - plâncton

Quando se pretende estudar os efeitos causados por metais em organismos aquáticos, vários fatores devem ser considerados, tais como: o tipo de organismo e sua tolerância ao metal, a espécie do metal, sua concentração no meio, forma de ocorrência, tempo de exposição do organismo ao metal, estado fisiológico do organismo e seu comportamento face a variáveis ambientais como temperatura, luminosidade, pH do meio, estresse, etc. Devem ainda ser levados em consideração a presença de outros agentes químicos, metálicos ou não, componentes quelantes e complexantes, presença de material húmico (DISSANAYAKE, 1983), e por fim a solubilidade das espécies químicas envolvidas.

O mecanismo de transferência de metal da fase aquosa para a fase particulada, representada pelo plâncton (VALLEE & ULMER, 1972) assume especial importância quando é analisada a necessidade de elementos traço essenciais para os microorganismos.

No estudo da Ecotoxicologia, o bioensaio tem duas finalidades principais:

- . estimar a toxicidade relativa de agentes químicos ou tratamentos a organismos específicos, e
- . fornecer informações dos efeitos tóxicos nos organismos.

Toxicidade relativa e relação dose-efeito obtidas com organismos, no laboratório, sob condições controladas e muitas vezes, com culturas axênicas, dão naturalmente, valiosa infor

mação mostrando quais efeitos tóxicos esperar de um agente químico na natureza. Entretanto, a interação de fatores físicos e químicos na natureza é tão complexa que dois tipos de testes no sistema se fazem necessários como base de determinação dos efeitos no ecossistema:

- . no laboratório, sob condições definidas;
- . no campo, sob condições físicas e químicas, naturais, variáveis.

Os fundamentos das relações de dose-efeito de metais isoladamente, para algas planctônicas, foram objeto de freqüentes estudos em época recente (JENSEN, 1981). Todavia, muitos metais ocorrem simultaneamente nos ambientes naturais em contato com populações diversificadas de algas. Por isto seria desejável conhecer as interações entre as diversas espécies e os efeitos simultâneos de diversos metais. Convém salientar que estas informações são praticamente ausentes na literatura e é um campo de pesquisas que deve ser desenvolvido no futuro.

1.6 - Delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

Para verificar a ação de poluentes ambientais (metais pesados) e utilizando-se um parâmetro bioquímico foi escolhida a enzima delta-aminolevulinato desidratase (porfobilinogênio sintase) (E.C.4.2.1.24) de uma fração do plâncton devido aos seguintes motivos:

- ser fortemente inibida por Pb^{++} (GRANICK, 1973) e outros íons metálicos (BERGLIND, 1985; BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; MARTINS, 1986; SAKAI et al., 1982).

- fazer parte da rota metabólica que leva a formação de heme, clorofila e outros compostos porfirínicos, sendo portanto, encontrada em todas as células de seres aeróbios;

- ser encontrada, também no citoplasma, podendo, desta forma, responder aos metais que efetivamente cruzam as barreiras naturais e penetram nas células.

Disto, conclui-se que a δ -ALA-D poderia servir como parâmetro bioquímico indicativo de presença de metais pesados em diferentes tecidos de diferentes organismos vivos.

Exemplo disto é o estudo sistemático que vem sendo realizado pelo grupo de Bioquímica Ecológica, com a δ -ALA-D presente em diferentes fontes enzimáticas.

Os estudos desta enzima no laboratório já estão em conclusão ou em fase adiantada para as seguintes fontes: sangue humano, fígado e sangue do peixe *Pimelodus maculatus* (pintado), glândula digestiva do molusco *Ampullaria canaliculata*, planta *Ricinus communis* (mamona) e a macrófita *Egeria densa*.

Em nossos ensaios laboratoriais, objeto da presente dissertação, trabalhou-se com amostras planctônicas coletadas de lagos artificiais da cidade de Porto Alegre* e lagoas de estabilização de indústrias, visando as finalidades principais do trabalho:

- verificar o comportamento, "in vitro" da δ -ALA-D da fração de plâncton, particularmente, face a metais pesados;

- estabelecer uma metodologia enzimática de avaliação dos efeitos de metais pesados, "in vitro";

* Os lagos artificiais da cidade de Porto Alegre (lagos da Redenção e Viaduto Açorianos) passarão a ser chamados, a partir deste momento, simplesmente de lagos de Porto Alegre.

- transferir esta metodologia para ensaios "em campo", tentando avaliar os efeitos da carga de poluição de metais pesados em meio aquático.

Em nosso trabalho, após alguns testes, verificou-se que o lago escolhido como principal fornecedor do plâncton para os ensaios, pela constância de suas características, como pH em torno de 7,0, temperatura (influenciada somente pelos raios solares), variabilidade de espécies e baixas concentrações de metais, poderia ser considerado como uma espécie de referência das diversas fases do trabalho.

Com uma situação referencial definida e realizados os testes relativos à cinética da enzima, a metodologia desenvolvida poderia ser aplicada diretamente para o "monitoramento precoce" de rios, lagos e lagoas de estabilização quando submetidos a descargas poluidoras.

A delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) localiza-se na rota de biosíntese de compostos porfirínicos a partir de intermediários do Ciclo de Krebs. Catalisa a reação de síntese do porfobilinogênio (PBG) a partir de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) (GIBSON et al., 1955; GRANICK, 1954; KIRUCHI et al., 1958; NANDI & SHEMIN, 1968).

Os compostos porfirínicos são substâncias que funcionam como cofatores de muitas enzimas que participam, por sua vez, de processos metabólicos essenciais para cada célula vegetal, animal e microorganismos (clorofila a e b, heme, citohemina, vitamina B12, etc). A inibição da δ -ALA-D refletir-se-á, portanto, em múltiplas funções celulares, presentes em todos

os seres vivos aeróbios como fosforilação oxidativa, oxidações biológicas outras, e nas plantas, a própria fotossíntese.

A δ -ALA-D é uma enzima que tem merecido especial atenção dos pesquisadores nos últimos 25 anos. Isto fica evidente observando-se no *Biosis Previews* o número de publicações encontradas neste período de tempo e que totalizam 348 trabalhos.

Todavia não foram encontrados trabalhos específicos no que se refere à influência de metais pesados na atividade enzimática da δ -ALA-D de plâncton.

Um estudo mais sistemático da enzima começou quando, desenvolvendo um método simplificando para determinação da atividade da δ -ALA-D, em sangue de pessoas intoxicadas por chumbo, BONSIGNORE et al. (1965) observaram que existia relação entre as incidências de saturnismo e a atividade desta enzima.

Até esta data, a delta - aminolevulinato desidratase havia sido estudada em tecidos animais (GRANICK & MAUZERALL, 1958; BATTLE et al., 1967) e bactérias (SHEMIN, 1962; NANDI et al.

1968; NANDI & SHEMIN, 1968). Em 1967, NANDI & WAYGOOD resolveram estudar a cinética da enzima em vegetais utilizando folhas de trigo.

Em 1975, BATTLE et al. estudaram a enzima em "callus" de soja e em 1978, STELLA et al. preocuparam-se com a enzima extraída de *Euglena gracilis*.

Da literatura observa-se que a enzima de origem animal tem sido mais estudada do que a de origem vegetal, tanto do ponto de vista cinético como toxicológico. Isto pode ser devi

do a sua utilização como medida indireta de metais pesados em trabalhadores, sabidamente, expostos ao poluente Pb. (MITCHELL et al., 1977). Contudo, o avanço tecnológico das últimas décadas e o lançamento indiscriminado de produtos e subprodutos no meio ambiente terrestre e aquático, estão fazendo com que plantas e microorganismos sejam mais intensamente estudadas com o objetivo de servirem como bioindicadores.

Por este fato e olhando para a δ -ALA-D como um possível parâmetro de medida de poluição por metais, resolvemos examinar material de plâncton.

Na tentativa de descobrir a localização da δ -ALA-D nas células de organismos fotossintetizantes, SLUITERS - SCHOLTEN (1973) trabalhando com *Phaseolus vulgaris* identificaram a enzima nos cloroplastos. Contudo, HOVENKAMP-OBBEMA et al. (1974) estudando *Euglena gracilis* concluíram ser esta enzima tipicamente citoplasmática, significando que a δ -ALA-D pode ser encontrada tanto nos cloroplastos como no citosol (AMAZARRAY, 1986).

As propriedades gerais da enzima como pH ótimo e temperatura ótima de atividade variam considerando-se as fontes de origem animal e vegetal e o estado de purificação do material. Todavia, percebe-se nitidamente que há, face àquelas características, dois grupos gerais (um animal e outro vegetal).

A necessidade de íons zinco e a presença de grupos - SH da enzima foi descrita por FINELLI et al. (1974) e CHINARRO et al. (1983), respectivamente em seus trabalhos. Contudo, a participação dos grupos sulfidrila já tinha sido comprovada com

iodoacetamida e p-cloromercuriobenzoato, respectivamente por GRANICK & MAUZERALL (1958) e BATTLE et al. (1967).

Agentes quelantes de cátions metálicos (EDTA) foram utilizados com o objetivo de identificar a presença de cofatores metálicos e de proteger os grupamentos sulfidrílicos (DTT).

Os prováveis cofatores metálicos, identificados, foram o Zn^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} , também observados em nosso laboratório por AMAZARRAY (1986) em *Ricinus communis*.

Reunidas todas as informações a respeito do comportamento da enzima realizou-se testes, em laboratório, determinando-se o tempo de incorporação do metal Cd^{2+} no plâncton e a influência da variação da concentração planctônica sobre a incorporação do metal. Estes testes preliminares servem como base de parâmetro para testes futuros que devem ser ampliados, inclusive com outras fontes enzimáticas.

1.7 - Objetivos

São objetivos deste trabalho:

- originar uma metodologia conveniente para o estudo da δ -ALA-D quando a fonte utilizada é o plâncton, tendo em vista sua eventual aplicabilidade no monitoramento precoce de fontes poluidoras industriais;

- com esta metodologia desenvolvida, examinar as características bioquímicas mais importantes da δ -ALA-D de plâncton;

- verificar o efeito dos íons metálicos mais tóxicos para a enzima "*in vitro*", tentando ao mesmo tempo, recuperar a

eventual perda de atividade com quelantes;

- a partir de amostras coletadas "*in vivo*", num teste piloto, testar a eficácia da metodologia desenvolvida, tentando definir o parâmetro denominado atividade diferencial ($\Delta\%$) como indicador de qualidade de água, face a metais pesados;

- verificar, a partir de testes preliminares em laboratório, a influência da concentração do plâncton e do tempo de exposição a um determinado metal;

- por fim, verificar se o método desenvolvido poderá ou não ser aplicado em monitoramento ambiental, considerando as vantagens econômicas e temporais advindas da utilização desta técnica.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Reagentes

- Acetato de cádmio II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de chumbo II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de cobalto II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de cobre II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de magnésio, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de mercúrio II, p.a. (Merck)
- Acetato de níquel II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Acetato de zinco p.a. (Baker's Analyzed)
- Ácido acético glacial, p.a. (Merck)
- Ácido clorídrico concentrado, p.a. (Merck)
- Ácido delta - aminolevulínico - hidrocloreto (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetracético, p.a. (Merck)
- Ácido nítrico concentrado, p.a. (Merck)
- Ácido perclórico, p.a. (Merck)
- Ácido tricloroacético, p.a. (Reagen)
- Bicarbonato de sódio, p.a (Carlo Erba)
- Cloreto de manganês II, p.a (Merck)

- Cloreto de mercúrio II, p.a. (Baker's Analyzed)
- Cloreto de potássio, p.a (Dr. Theodor Schuchardt)
- p - Dimetil aminobenzaldeído, p.a (Fluka)
- DL - Ditiotreitól (Sigma)
- Fosfato ácido de cálcio (Baker's Analysed)
- Hidróxido de sódio, p.a (Reagen)
- Iodoacetamida, p.a. (Sigma)
- Reativo de Folin Ciocaulteau (Laboratório de Análises Químicas Ltda).
- Sulfato de cobre II, p.a (Merck)
- Tartarato de Sódio e potássio, p.a (Carlos Erba)
- Tritisol - solução padrão de cádmio, p.a.(Merck)
- Tritisol - solução padrão de chumbo, p.a. (Merck)
- Tritisol - solução padrão de cobre, p.a. (Merck)
- Tritisol - solução padrão de zinco, p.a. (Merck)
- Tris (hidroximetil) aminometano, p.a. (Merck)

2.1.2 - Soluções

- Solução de acetato de cádmio II ($10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $6 \times 10^{-3}M$)
- Solução de acetato de chumbo II ($10^{-2}M$, $2 \times 10^{-3}M$, $8 \times 10^{-3}M$)
- Solução de acetato de cobalto II ($10^{-2}M$, $10^{-3}M$)
- Solução de acetato de cobre II ($10^{-3}M$, $4 \times 10^{-7}M$)
- Solução de acetato de magnésio ($10^{-3}M$)
- Solução de acetato de mercúrio II ($10^{-3}M$)
- Solução de acetato de níquel II ($10^{-3}M$)
- Solução de acetato de zinco II ($10^{-3}M$)
- Solução de ácido delta-aminolevulínico-hidrocloreto
(0,1M)

- Solução de ácido delta-aminolevulínico-hidroclorato em pH 8,8 (0,05M): 5ml de solução de δ -ALA.HCl mais 5 ml de NaOH 0,2N. Guardar em frasco escuro, em geladeira.
- Solução de ácido e etilenodiaminotetracético - EDTA ($3 \times 10^{-1}M$, $3 \times 10^{-3}M$) $3 \times 10^{-1}M$: 2,1919g de Titriplex II em água deionizada, sob aquecimento e agitação, adicionar NaOH 1N até dissolução completa. Levar a balão volumétrico de 50ml e completar com água deionizada.
- Solução de ácido tricloroacético - TCA 25 g% - Guardar em frasco escuro, em geladeira.
- Reativo A - solução de NaOH 0,1N em Na_2CO_3 2g%:4g NaOH em 500 ml de água deionizada e levar a ebulição. Esfriar e adicionar 20g de Na_2CO_3 , completar a 1000 ml em balão volumétrico com água deionizada.
- Reativo B - Partes iguais de sulfato de cobre 1g % e tartarato de sódio e potássio 2g %. Preparar no momento da reação.
- Reativo C - Reativo alcalino de cobre: uma parte de Reativo B para 50 partes de Reativo A. Preparar no momento da dosagem e proteger da luz.
- Solução de cloreto de manganês II ($10^{-3}M$)
- Solução saturada de $HgCl_2$ - CH_3COOH - 0,25g de $HgCl_2$ em 10ml de CH_3COOH glacial.
- Solução de cloreto de potássio ($10^{-1}M$).
- Solução de DL - Ditiotreitól - DTT - ($3 \times 10^{-1}M$). Preparar no momento de usar.

- Reativo de Ehrlich: 2,5 g de p-dimetilaminobenzaldeído em 50 ml de CH_3COOH . Adicionar 4 ml de solução saturada de $\text{Hg Cl}_2 - \text{CH}_3\text{COOH}$ e 24,5 ml de ácido perclórico completando a 100 ml com CH_3COOH glacial.
- Solução Estoque A: solução de ácido clorídrico 0,2M.
- Solução Estoque B: Solução de hidroximetilamina - TRIS (0,2M).
- Reativo de Folin Ciocalteau (1N).
- Solução de fosfato ácido de cálcio (10^{-3}M).
- Solução de hidróxido de sódio (0,2M).
- Solução de iodoacetamida - IAM ($3 \times 10^{-1}\text{M}$, $3 \times 10^{-2}\text{M}$).
- Solução de íons metálicos I - ($6 \times 10^{-6}\text{M Hg}^{+2}$; $1,2 \times 10^{-5}\text{M Cu}^{2+}$; $3,6 \times 10^{-5}\text{M Cd}^{2+}$; $3,6 \times 10^{-5}\text{M Zn}^{2+}$; $2 \times 10^{-4}\text{M Pb}^{2+}$).
- Solução de íons metálicos II - ($3 \times 10^{-5}\text{M Hg}^{2+}$; $6 \times 10^{-5}\text{M Cu}^{2+}$; $1,8 \times 10^{-4}\text{M Cd}^{2+}$; $1,8 \times 10^{-4}\text{M Zn}^{2+}$; 10^{-3}M Pb^{2+}).
- Solução de sulfato de cobre (1g%).
- Solução Tampões TRIS-HCl (0,05M) -
Solução Estoque A com solução Estoque B - pH = 7,2;
7,6; 8,0; 8,4; 8,8; 9,0.
- Solução de tartarato de sódio e potássio (2g%).

2.1.3 - Equipamentos

- Agitador para tubos de ensaio Retsch
- Balança analítica Sartorius, modelo 2474
- Balança Sartorius, modelo 1265 MP
- Balde plástico
- Bombas de Tölg de Teflon com sistema pressurizado Berghof
- Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC-5B, rotor SS-34
- Centrífuga Heraeus - Christ, modelo Labofuge 6000
- Chapa térmica Fanem
- Deionizador de água, marca Permution com resina trocadora de cátions e ânions
- Espectrofotômetro Zeiss, modelo PM₂K, com cubetas de vidro de 1cm de percurso óptico
- Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer, modelo 2380 com amostrador para forno de grafite Perkin Elmer, modelo AS40, registrador Perkin Elmer, modelo 561 e printer Perkin Elmer, modelo PRS-10
- Estufa Heraeus (20-240°C)
- Freezer marca Consul
- Homogeneizador Potter - Elvehjem de 15ml
- Incubadora Kottermann, com controle temostático
- Lâmpadas de cátodo - oco de Cu, Zn, Pb, Perkin Elmer
- Lâmpada EDL de Cd, Perkin Elmer
- Medidor de pH Metrohm, digital, modelo 632
- Micropipetas automáticas Eppendorf e Cakil
- Refrigerador Brastemp
- Sistema bloco digestor e regulador de temperatura Berghof

2.1.4 - Vidraria

- Balões volumétricos de 5ml, 10ml, 50ml, 100ml 200ml e 1000ml
- Bastões de vidro
- Copos de becker de 50ml, 100ml, 250ml e 600ml.
- Dessecador
- Erlenmeyer de 125ml e 250ml
- Frascos de vidro ambar para estocagem de soluções
- Frascos de polietileno para estocagem de soluções metálicas
- Funil plástico para filtração quantitativa
- Pipetas graduadas de 0,1ml, 1,0ml, 2,0ml, 5,0ml e 10,0ml
- Pipetas volumétricas de 1,0ml, 5,0ml, 20,0ml e 25,0ml
- Provetas de 10ml, 25ml, 50ml, 100ml e 250ml
- Tubos de ensaio de 10ml.

2.2 - δ -ALA - desidratase de plâncton

2.2.1 - Fonte enzimática

Plâncton de água doce foi escolhido como fonte enzimática para a realização dos ensaios (SCHOLEM & DICK, 1986).

A coleta do material planctônico era realizada no máximo uma hora antes do teste filtrando-se determinado volume de água (100 l) utilizando-se duas redes de nylon superpostas com malhas de 25 μ m e 112 μ m.

Este procedimento visava selecionar o material planctônico utilizado no experimento pelo seu tamanho (organismos maio

res do que 112 μ m e menores do que 25 μ m seriam automaticamente eliminados na filtração).

Esta amostragem apresentou, obviamente, uma heterogeneidade de espécies de algas. Embora se deva pressupor que as diversas espécies possam reagir diferentemente a ação de metais pesados, é igualmente válido estabelecer a hipótese de que a enzima usada como parâmetro tenha, dentro dos limites de sensibilidade do teste, um comportamento semelhante nas diversas espécies de algas presentes, exatamente por se tratar de um teste bioquímico.

Em outras palavras, o comportamento global de uma população diversificada poderá representar uma uniformidade de resposta, apesar de sua heterogeneidade.

O material amostrado era colocado em recipiente de polietileno, envolto com gelo e levado para o laboratório. Eram anotados dados sobre a coleta como localização do lago/lagoa, pH da água, temperatura da água e do ar e condições ambientais (sol, chuva).

2.2.2 - Técnica de ensaio para extração enzimática

No laboratório procedia-se a centrifugação refrigerada a 43.500g por 15 minutos a 4°C, a fim de separar o material plânctônico da água do lago. A água sobrenadante era denominada de Sobrenadante 1.

O material sedimentado, chamado Sedimento 1 era ressuspendido com 15ml de Tampão Tris 0,05M, pH 8,8, gelado.

Este material era colocado no Potter-Elvehjem, envolto em gelo picado, onde, após 40 movimentos observava-se o rompimento celular caracterizado pela suspensão de coloração verde obtida.

Esta suspensão era rapidamente centrifugada a 43.500g durante 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante obtido, denominado Sobrenadante 2 era utilizado para a incubação enzimática, sendo que a fração não utilizada era acondicionada em tubos de ensaio fechados e guardados no freezer para posterior determinação da proteína extraída.

O material celular sedimentado da segunda centrifugação chamado de Sedimento 2 era descartado, pois na extração enzimática, após a centrifugação, a enzima permanece no sobrenadante.

2.2.3 - Técnica de ensaio para incubação enzimática

A técnica para a determinação da atividade da δ -ALA-desidratase utilizada orientou-se pelos parâmetros usados por BATTLE et al. (1967) e modificados por AMAZARRAY (1986).

Com o objetivo de estabelecer-se uma técnica padronizada para os ensaios com a δ -ALA-desidratase de plâncton pesquisou-se as condições mais adequadas ao tempo de incubação, concentração enzimática e de substrato, pH ótimo de incubação e temperatura de incubação para a fonte em estudo em diversos ensaios.

2.2.3.1 - Ensaio padrão

Com os valores obtidos nos ensaios para a δ -ALA desidratase de plâncton, elaborou-se o seguinte ensaio padrão de incubação, utilizado em todos os testes deste trabalho (SCHOLEM & DICK, 1985).

CONSTITUINTES	BRANCO (ml)	AMOSTRA (ml)
. H ₂ O deionizada e/ou*	0,2	0,2
. Soluções de metais ou agentes quelantes		
. Aliquota do sobrenadante	0,6	0,6
. KCl	0,1	0,1
* Prê-incubação por 10 min em temperatura ambiente		
. Solução δ -ALA 0,05M em tampão Tris-pH 8,8	0,1	0,1
. Solução de TCA 25g%	0,3	-
Incubação por 60 min a 37°C		
. Solução de TCA 25g%	-	0,3
Centrifugação a 43500g por 10 min.		
. Aliquota do sobrenadante	0,5	0,5
. H ₂ O deionizada	0,5	0,5
. Reagente de Ehrlich	1,0	1,0
Desenvolvimento e estabilização da cor - 5 min.		
Leitura da absorbância em 555 nm.		

QUADRO 1 - Esquema do ensaio padrão de determinação espectrofotométrica do porfobilinogênio (PBG) formado na incubação de extrato enzimático de plâncton

2.2.3.2 - Tempo de incubação

A forma absorvância cresce linearmente até 60 minutos de incubação a 37°C (Figura 1).

A partir daí, observa-se uma pequena inflexão na curva de atividade específica x tempo de incubação com probabilidade de, após este tempo, iniciar-se uma leve desnaturação do material proteico.

2.2.3.3 - Concentração enzimática

A atividade específica mostrou-se linear com o aumento da concentração da enzima até o valor de aproximadamente 1,12 mg de proteína (0,6 ml de homogeneizado), como mostra a Figura 2. Após este volume, houve modificação na inclinação da curva o que poderia ser um indicativo de excesso de enzima em relação ao substrato e/ou também a presença de uma substância inibidora no extrato.

Trabalhou-se com 0,6 ml de homogeneizado nos testes realizados.

2.2.3.4 - Concentração de substrato

Optou-se pelo valor de 5×10^{-3} M de δ -ALA 0,05M em pH8,8 como concentração usual de substrato neste trabalho, valor já empregado por AMAZARRAY (1986), na determinação da atividade da enzima em *Ricinus communis*, uma vez que não atingiu-se a saturação da enzima pelo substrato. (Figura 3).

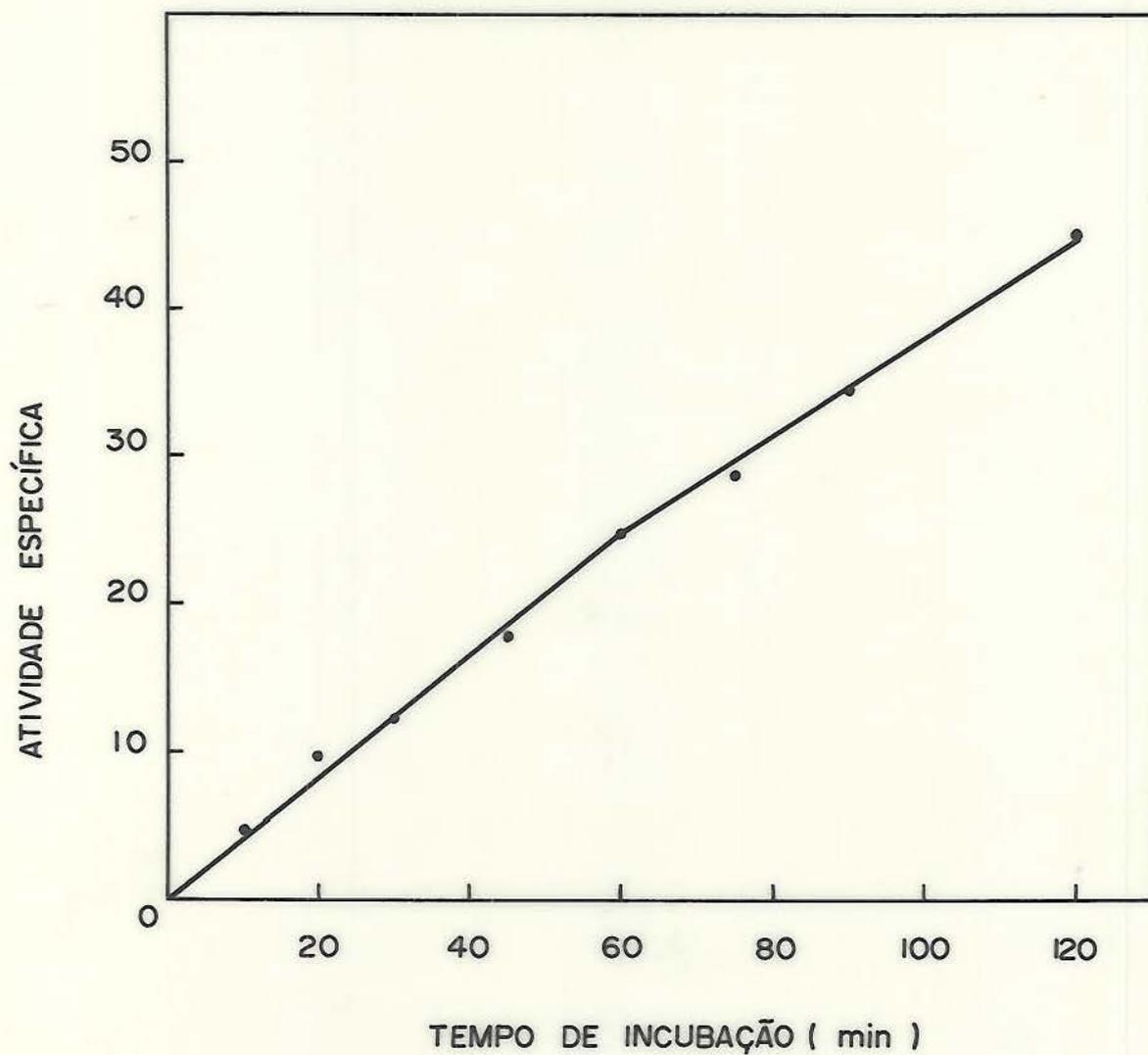


Figura 1 - Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

[substrato] = $5,0 \times 10^{-3}\text{M}$ δ -ALA-D

[enzima] = 0,196 mg proteína

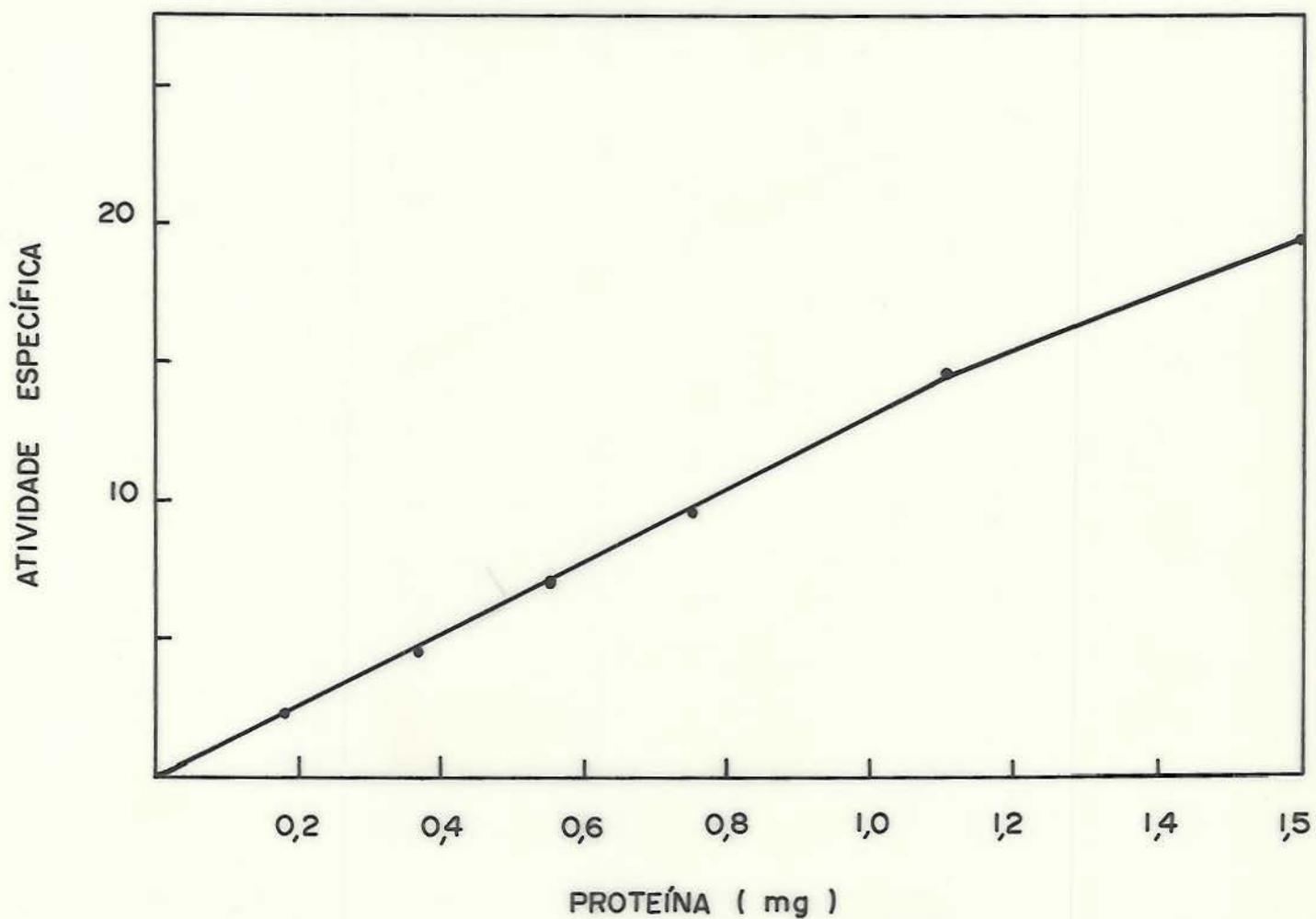


Figura 2 - Relação entre concentração de material enzimático sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.
Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)
[substrato] = $5,0 \times 10^3\text{M}$ δ -ALA-D
Tempo = 60 min.

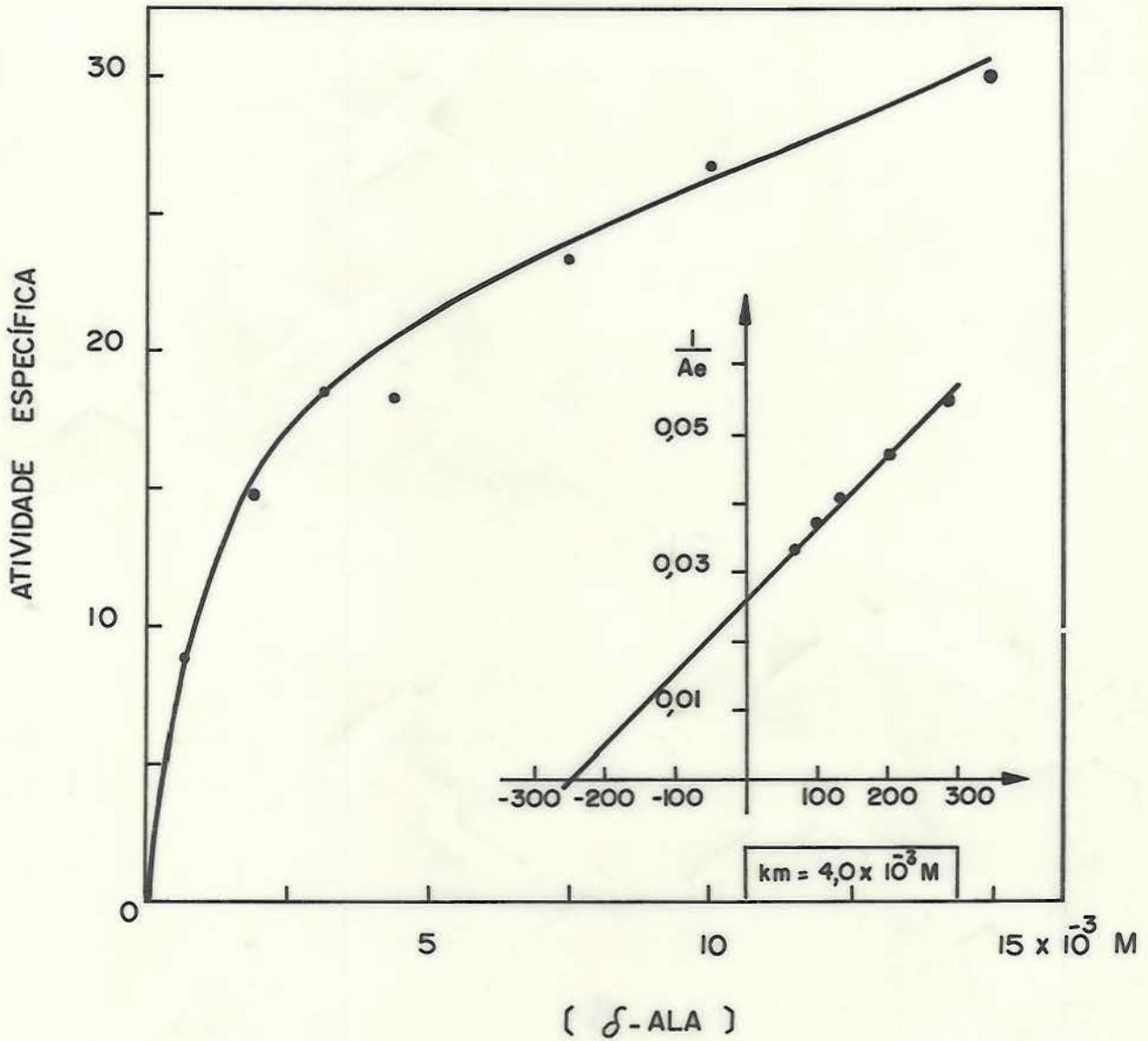


Figura 3 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

[enzima] = 0,062 mg proteína

Tempo = 60 min.

2.2.3.5 - pH ótimo de incubação

A atividade enzimática atinge um valor máximo em pH em torno de 8,5-8,6 (Figura 4) decrescendo, a seguir, até o pH de 9,2. Os ensaios foram realizados em pH de incubação de 8,6.

2.2.3.6 - Temperatura de incubação

A atividade máxima foi obtida em torno de 40°C (Figura 5). Os ensaios foram realizados a 37°C, temperatura comumente utilizada na incubação de enzimas.

2.2.4 - Determinação de proteína

A determinação da proteína presente no extrato enzimático de plâncton foi realizada segundo o método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

A curva de calibração absorvância (500mm) x μ g proteína en contra-se na Figura 6.

Para trabalhar-se na faixa linear de calibração foi necessário diluir o extrato enzimático duas vezes com água deio nizada, utilizando-se 0,1 ml deste extrato para a dosagem pro teica.

2.2.5 - Cálculo da atividade específica

Devido à dificuldade de padronização da quantidade do ma terial coletado procurou-se um índice que pudesse expressar a atividade específica da δ -ALA - desidratase em plâncton.

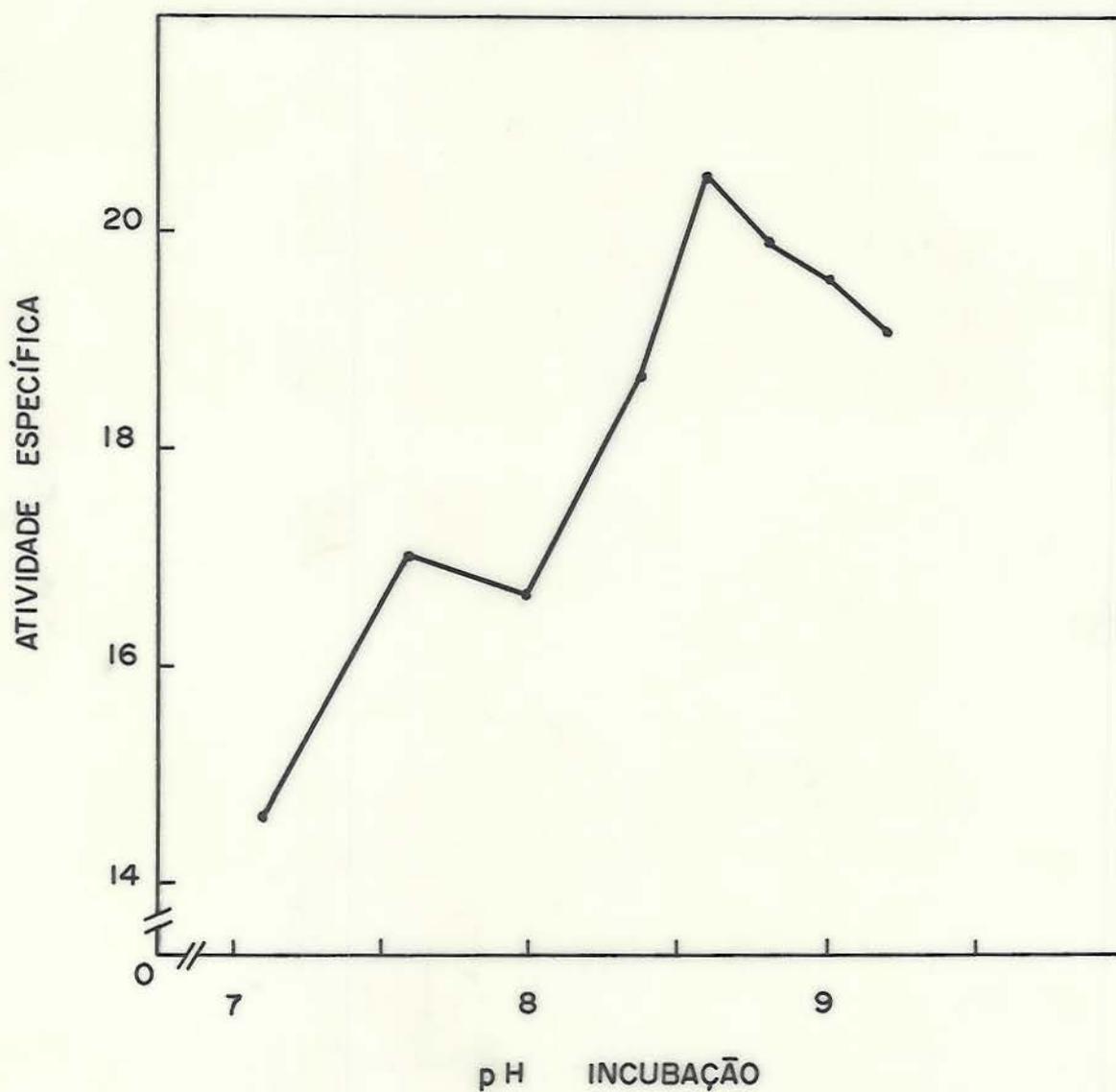


Figura 4 - Efeito do pH de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Tampão Tris: 0,05M

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

[substrato] = $5,0 \times 10^{-3}$ M δ -ALA-D

[enzima] = 0,165 mg proteína

Tempo = 60 min.

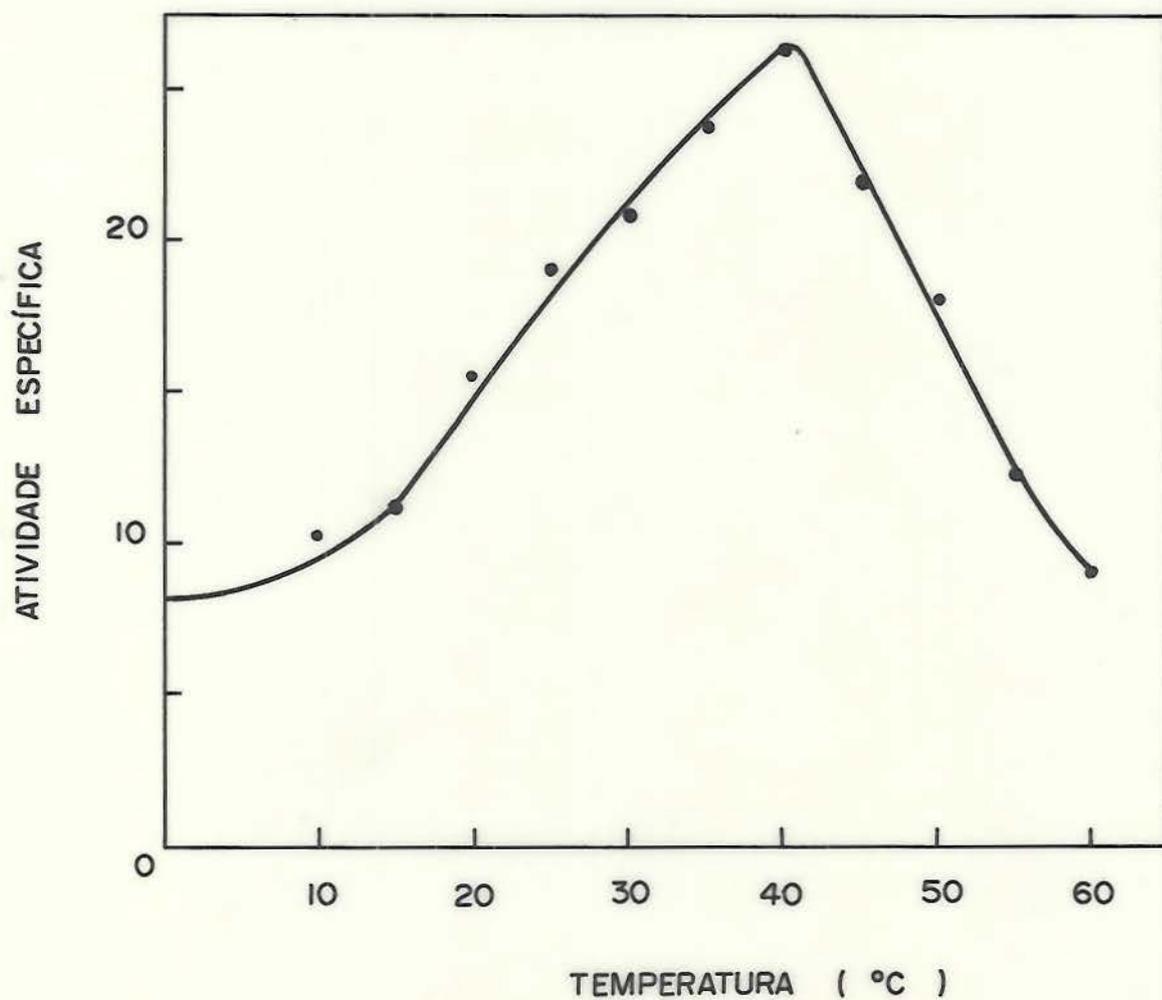


Figura 5 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton
Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)
[substrato] = $5,0 \times 10^3$ M δ -ALA-D
[enzima] = 0,137 mg proteína
Tempo = 60 min.

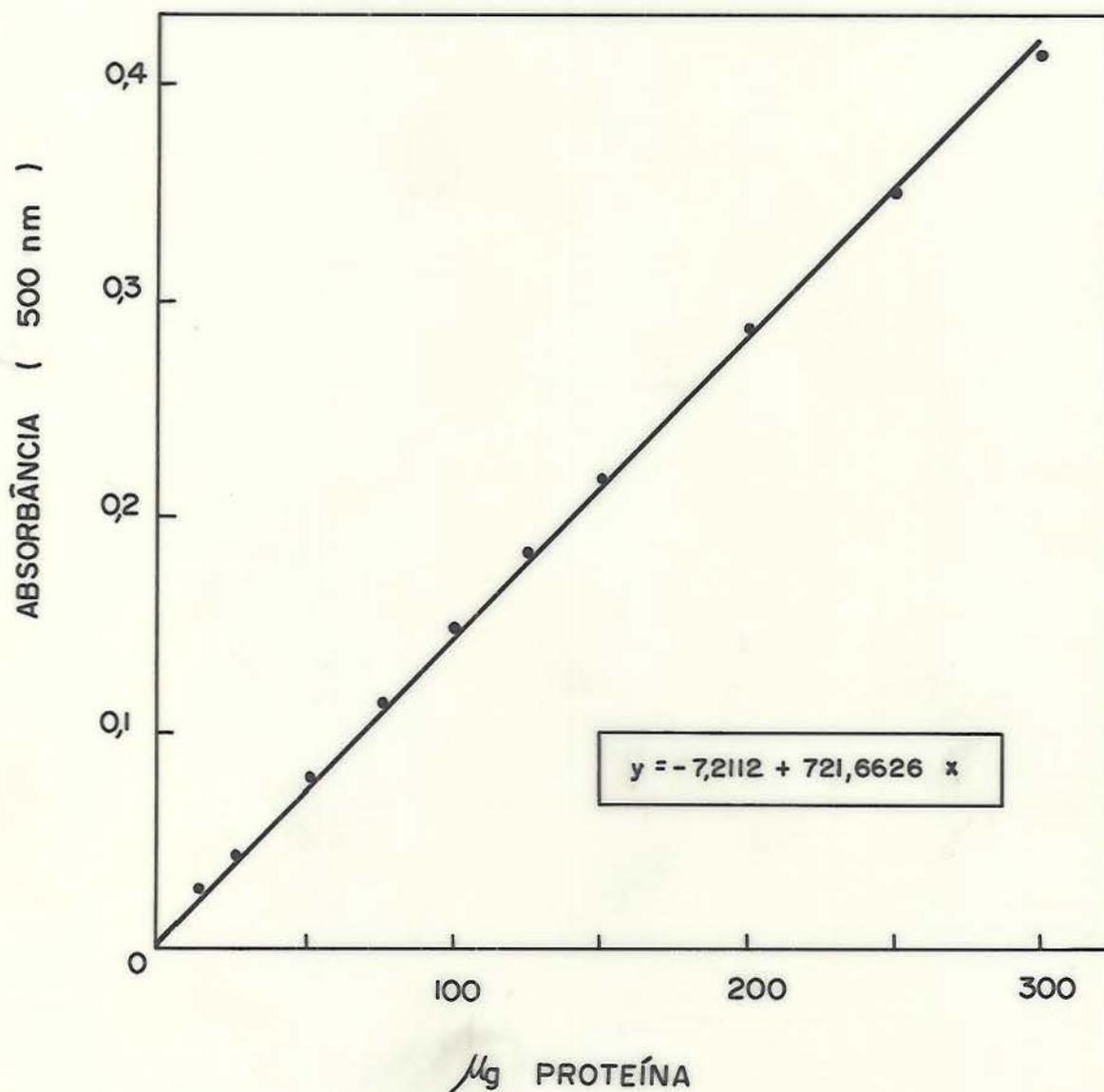


Figura 6 - Curva de calibração usada na dosagem de proteínas do extrato enzimático do plâncton.

(y = μg proteína; x = Absorbância (500nm))

AMAZARRAY (1986) comparou estatisticamente a atividade específica da δ -ALA em *Ricinus communis* em relação ao teor de proteína extraída e em relação ao peso seco num total de 50 amostras, constatando uma amplitude de variação para média e desvio padrão de 43,6% e 44,2%, respectivamente para cada método.

Com base nos resultados o método escolhido para este trabalho foi expressar a atividade específica em relação ao teor de proteína extraída.

A unidade da atividade específica foi dada em nmois PBG produzidos / mg proteína/h a 37°C.

$$\text{Atividade específica: } \frac{A \times 4 \times 1,3 \times 10^{-3}}{b \times \epsilon \times \text{proteína} \times 6}$$

A = absorvância em 555nm

$1,3 \times 10^6$ = volume final do meio de incubação, após adição de TCA (l)

4 = fator de diluição do sobrenadante

b = percurso óptico, em cm (1cm)

ϵ = coeficiente molar de absorção, em $\text{cm}^{-1}\text{nM}^{-1}$

($6,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}\text{nM}^{-1}$) de MAUZERALL & GRANICK (1956).

2.3 - Fracionamento das amostras

O fracionamento das amostras, com determinação dos metais cobre, cádmio, zinco e chumbo, foi realizado com o objetivo de estudar a distribuição destes metais nas diversas frações de água e plâncton presentes nos lagos. Em todas as fra-

ções obtidas, conforme mostra o esquema da Figura 7 foi dosado o teor destes metais.

AI = Amostra inicial

Metal em $\mu\text{g/l}$

Ai = Amostra inicial (200 l)

Metal em μg

AF = Amostra filtrada (25 - 112 μm)

Metal em $\mu\text{g}/100\text{ml}$

SN1 = Af - centrifugada: sobrenadante 1

Metal em $\mu\text{g}/100\text{ml}$

SED1 = Af - centrifugada: sedimento 1

Metal em $\mu\text{g}/15\text{ml}$

SN2 = SED₁ - homogeneizado: sobrenadante 2

Metal em $\mu\text{g}/10\text{ml}$

SED2 = SED₁ - homogeneizado: sedimento 2

Metal em $\mu\text{g}/5\text{ml}$

Ae = Atividade específica enzimática do SN2

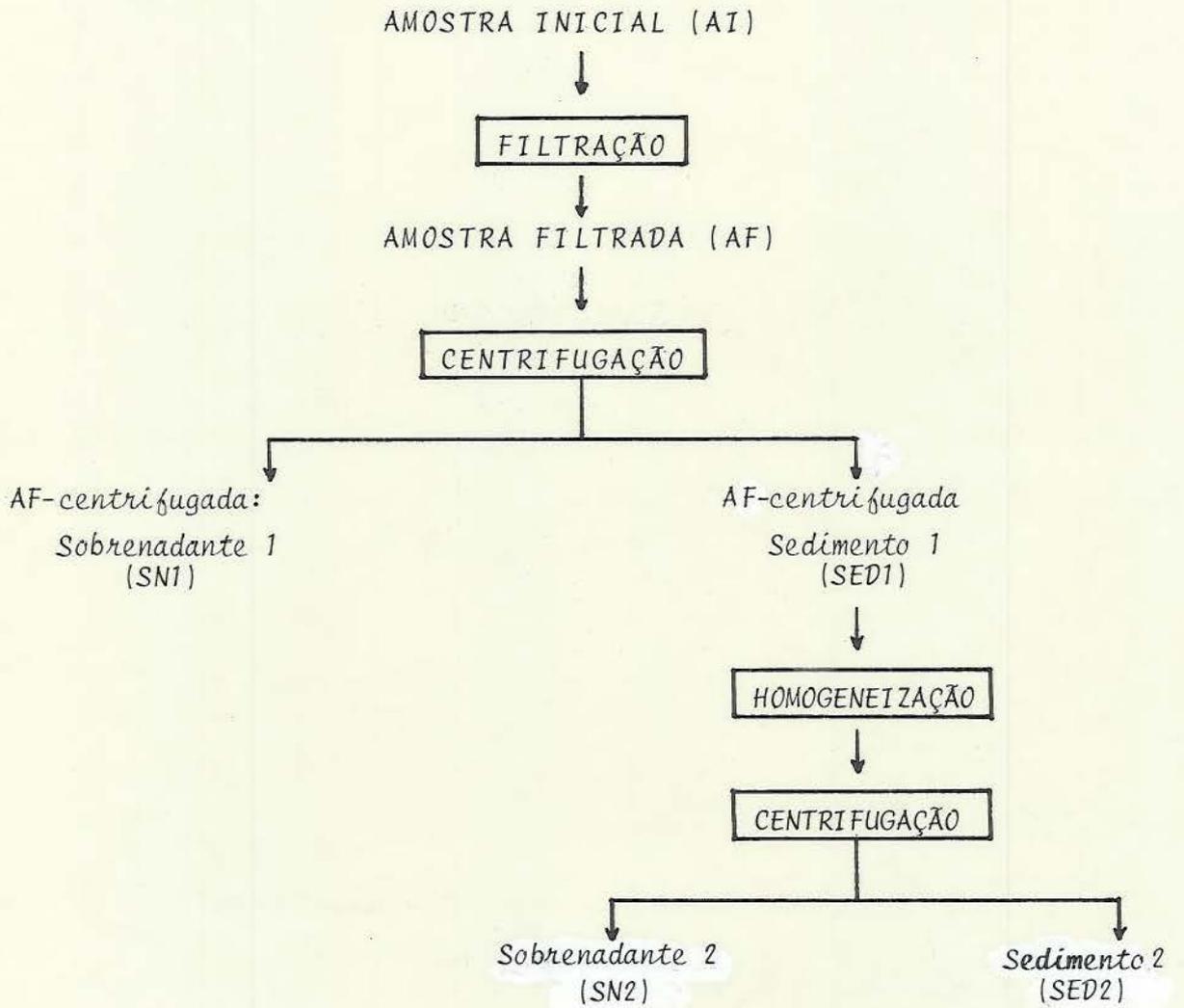


Figura 7 - Fluxograma da preparação das diversas amostras obtidas pelo fracionamento do material planctônico

2.3.1 - Preparação das amostras

2.3.1.1 - Água dos lagos e Sobrenadante 1

Amostras de 100 ml foram colocadas em erlenmeyers de 250 ml com 5ml de ácido nítrico concentrado e levadas à chapa térmica até completa dissolução da matéria orgânica até quase a secura com o cuidado de que a amostra não entrasse em ebulição.

Após, adicionou-se 5 ml de ácido nítrico, cobriu-se com vidro de relógio e deixou-se em refluxo até quase a secura. Filtrou-se a amostra quantitativamente e transferiu-se para balão volumétrico de 100ml completando-se o volume com água deionizada sendo após estocadas em frascos de polietileno no refrigerador.

2.3.1.2 - Filtrado e Sobrenadante 2 (Extrato Enzimático)

Do material filtrado nas redes e sobrenadante 2 eram coletados 3ml de amostra que eram colocados dentro de uma bomba Tölg de teflon adicionando-se 3ml de ácido nítrico concentrado. As bombas eram pressurizadas com 1,5 Kpm e colocadas no digestor a 140°C por 2h.

Após este tempo as bombas eram abertas e filtrava-se quantitativamente para um balão volumétrico de 10ml as amostras digeridas, completando-se a marca com água deionizada.

As amostras eram então, transferidas para frascos de polietileno conservando-as no refrigerador para posterior análise.

se de metais.

2.3.1.3 - Sedimento 1 e Sedimento 2

O material sedimentado era ressuspensionado em volume conhecido de água deionizada e colocados 3ml de amostra com 3ml de ácido nítrico concentrado em bombas Tölg de teflon, seguindo-se o procedimento descrito em 2.3.1.2.

2.3.2 - Análise dos metais

As análises das concentrações dos metais Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas amostras foram feitas por espectrofotometria de absorção atômica com uso do forno de grafite seguindo-se as condições padrão indicadas no Manual de PERKIN-ELMER(1980).

Análises com Hg^{2+} não foram realizadas devido à necessidade de uma grande quantidade de amostra para esta análise.

3 - RESULTADOS

Sendo um dos objetivos deste trabalho utilizar comunidades planctônicas naturais, como portadoras do sensor enzimático em processos de bioindicação frente a metais pesados, fez-se necessário realizar alguns ensaios "in vitro" que pudesse:

- caracterizar o comportamento cinético da enzima δ -aminolevulinato desidratase;
- identificar quais os íons metálicos que afetariam o desempenho da enzima;
- verificar a eficiência de quelantes na recuperação da atividade enzimática inibida por estes cátions;
- observar a influência da concentração de plâncton e do tempo de exposição a metais pesados sobre a resposta enzimática.

A partir destas informações seria possível estabelecer os parâmetros do ensaio a ser realizado em campo com o intuito de verificar a aplicabilidade do teste em monitoramento ambiental.

3.1 - Caracterização da enzima

Com o objetivo de realizar o estudo cinético da enzima foi necessário, inicialmente, caracterizá-la. A partir daí, estudou-se efeitos de inibidores, ativadores e recuperadores da atividade enzimática sob diversos aspectos.

3.1.1 - Efeito do pH

Foi estudado o efeito causado pela variação do pH de incubação na atividade enzimática no intervalo de 7,2 a 9,2 com tampão Tris 0,05M. O pH de incubação "ótimo" situa-se entre 8,5 - 8,6 como mostrou a Figura 4.

Usou-se na padronização do ensaio o pH de incubação de 8,6.

3.1.2 - Efeito da temperatura de incubação

Os intervalos de temperatura estudados variaram de 0°C até 60°C, de 5°/5°C e encontrou-se o valor de 40°C como temperatura "ótima" de incubação nas condições experimentais usadas, como mostrou a Figura 5.

No ensaio habitual trabalhou-se com a temperatura de 37°C que está um pouco abaixo da temperatura que produz a atividade máxima da enzima para garantir condições de incubação não prejudicadas, sensivelmente, por desnaturação térmica da mesma.

3.1.3 - Efeito da concentração do substrato e Km

Foi constatado que a δ -ALA desidratase de plâncton obe-

dece a uma cinética normal de saturação do tipo Michaelis-Menten como mostrou a Figura 6.

Para as condições do ensaio padrão obteve-se, através do método das duplas-recíprocas de Lineweaver-Burk, a constante cinética K_m desta reação enzimática e que é aproximadamente $4,0 \times 10^{-3} M$.

3.1.4 - *Microorganismos representativos da fração de plâncton utilizada*

Para poder generalizar a aplicabilidade do teste e sua utilização em campo, procurou-se trabalhar com amostras planc_tônicas não homogêneas. Mesmo assim, foi realizada uma identificação qualitativa das populações presentes nas amostras utilizadas, a nível de gênero.

Este trabalho foi executado pela Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pela bióloga Zulanira Meyer Rosa.

Constatou-se que a presença do fitoplâncton era predominante em relação às outras formas de microorganismos (zooplâncton, rotíferos, microcrustáceos, etc.) na fração de plâncton coletada entre as redes de $25 \mu m$ e $112 \mu m$.

Os principais gêneros encontrados nos lagos de Porto Alegre e lagoas de estabilização industriais foram:

Aulacosira spp

Actinastrum spp

Atheia spp

Achnantes spp

Ankistrodesmus spp

Anabaena spp

Aphanothece spp

Botryococcus spp

<u>Chroococcus</u> spp	<u>Merismopedia</u> spp
<u>Closterium</u> spp	<u>Navicula</u> spp
<u>Coelastrum</u> spp	<u>Neidium</u> spp
<u>Cymbella</u> spp	<u>Nitzschia</u> spp
<u>Crucigenia</u> spp	<u>Oscillatoria</u> spp
<u>Cosmarium</u> spp	<u>Oocystis</u> spp
<u>Cyclotella</u> spp	<u>Pediastrum</u> spp
<u>Centrित्रactus</u> spp	<u>Pleurotaenium</u> spp
<u>Dictyosphaerium</u> spp	<u>Pinnularia</u> spp
<u>Dynobryon</u> spp	<u>Peridinium</u> spp
<u>Euglena</u> spp	<u>Phacus</u> spp
<u>Eunotia</u> spp	<u>Rephidiopsis</u> spp
<u>Euolorina</u> spp	<u>Rhopalodia</u> spp
<u>Gonyochloris</u> spp	<u>Spirogyra</u> spp
<u>Gymnodinium</u> spp	<u>Strombomonas</u> spp
<u>Gonphonema</u> spp	<u>Synedra</u> spp
<u>Golenkinia</u> spp	<u>Selenastrum</u> spp
<u>Isthmochlorin</u> spp	<u>Surirella</u> spp
<u>Kirchneriella</u> spp	<u>Staurastrum</u> spp
<u>Lyngbya</u> spp	<u>Scenedesmus</u> spp
<u>Micrasterias</u> spp	<u>Trachelomonas</u> spp
<u>Mougeotia</u> spp	<u>Tetrallanthos</u> spp
<u>Micractinium</u> spp	<u>Tetraplekton</u> spp
<u>Mallomonas</u> spp	<u>Zygnema</u> spp
<u>Microcystis</u> spp	
<u>Monoraphydium</u> spp	

3.1.5 - Efeito do monoiodoacetamida (IAM)

Com o objetivo de verificar a participação de grupos sulfidrílicos na atividade da δ -ALA-D do plâncton, foram testadas diversas concentrações de IAM (agente alquilante sulfidrílico) sobre o extrato enzimático. Observou-se inibição de 36% da atividade específica da enzima na última concentração testada, $60 \times 10^{-3}M$ (Figura 8).

3.1.6 - Efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Em trabalhos anteriores, com fontes enzimáticas distintas, constatou-se que o δ -ALA-D é uma metaloenzima, requerendo, portanto, cofator metálico.

Utilizou-se a capacidade do EDTA em ser um agente quelante, relativamente inespecífico para o teste da δ -ALA-D em amostras de plâncton.

Observou-se que o EDTA atua como ativador e inibidor enzimático, dependendo da concentração usada no ensaio (Figura 9).

A ativação enzimática é observada quando foram utilizadas concentrações de até $0,06 \times 10^{-3}M$, sendo que a ativação máxima ocorre em $0,03 \times 10^{-3}M$.

3.1.7 - Efeito do ditioneitol (DTT)

Sendo o DTT um agente protetor dos grupamentos sulfidrílicos decidiu-se verificar seu efeito sobre a δ -ALA desidratase do plâncton.

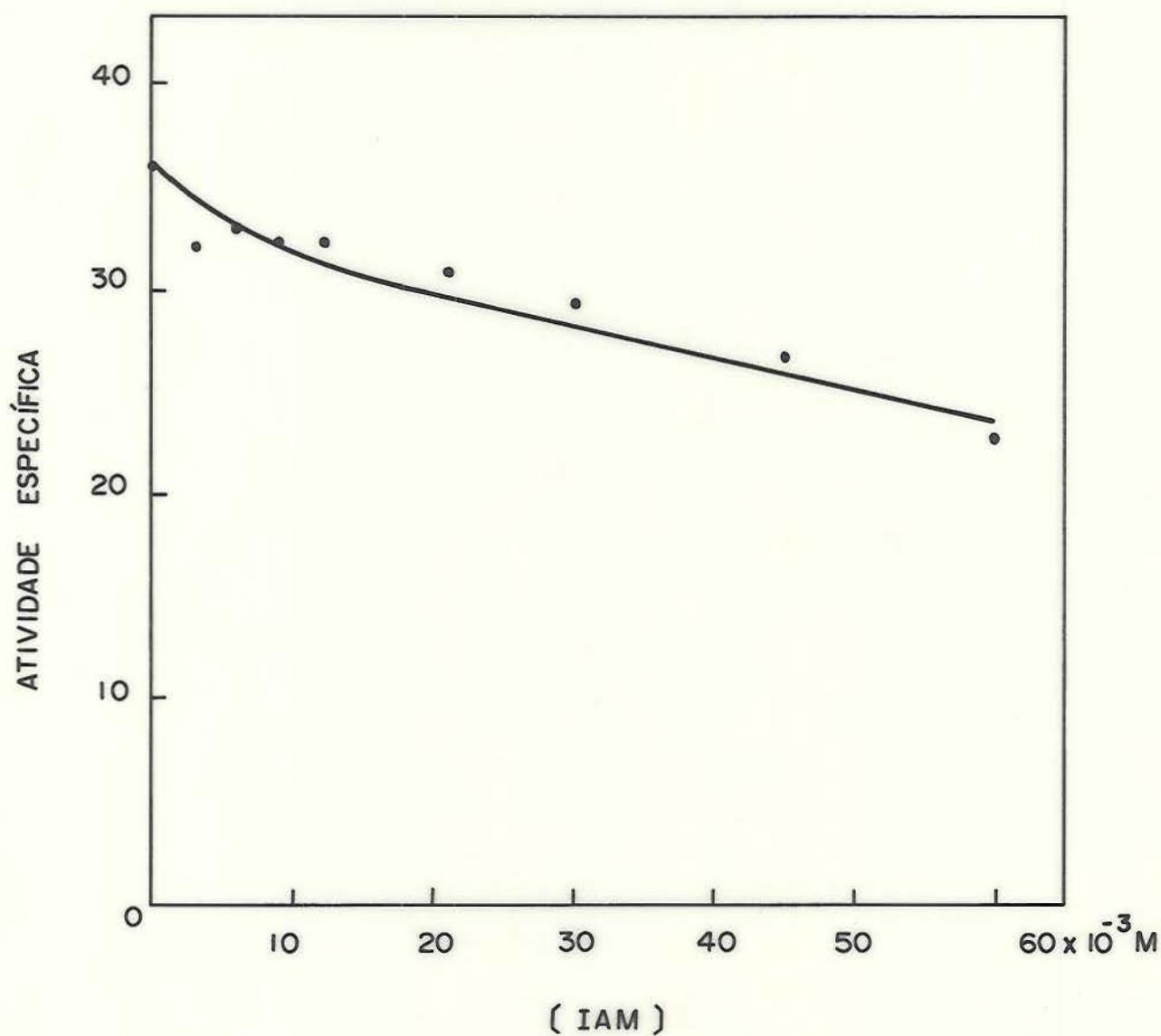


Figura 8 - Efeito da concentração de IAM sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
(37°C)

[enzima] = 0,169 mg proteína

Tempo de incubação = 10 min.

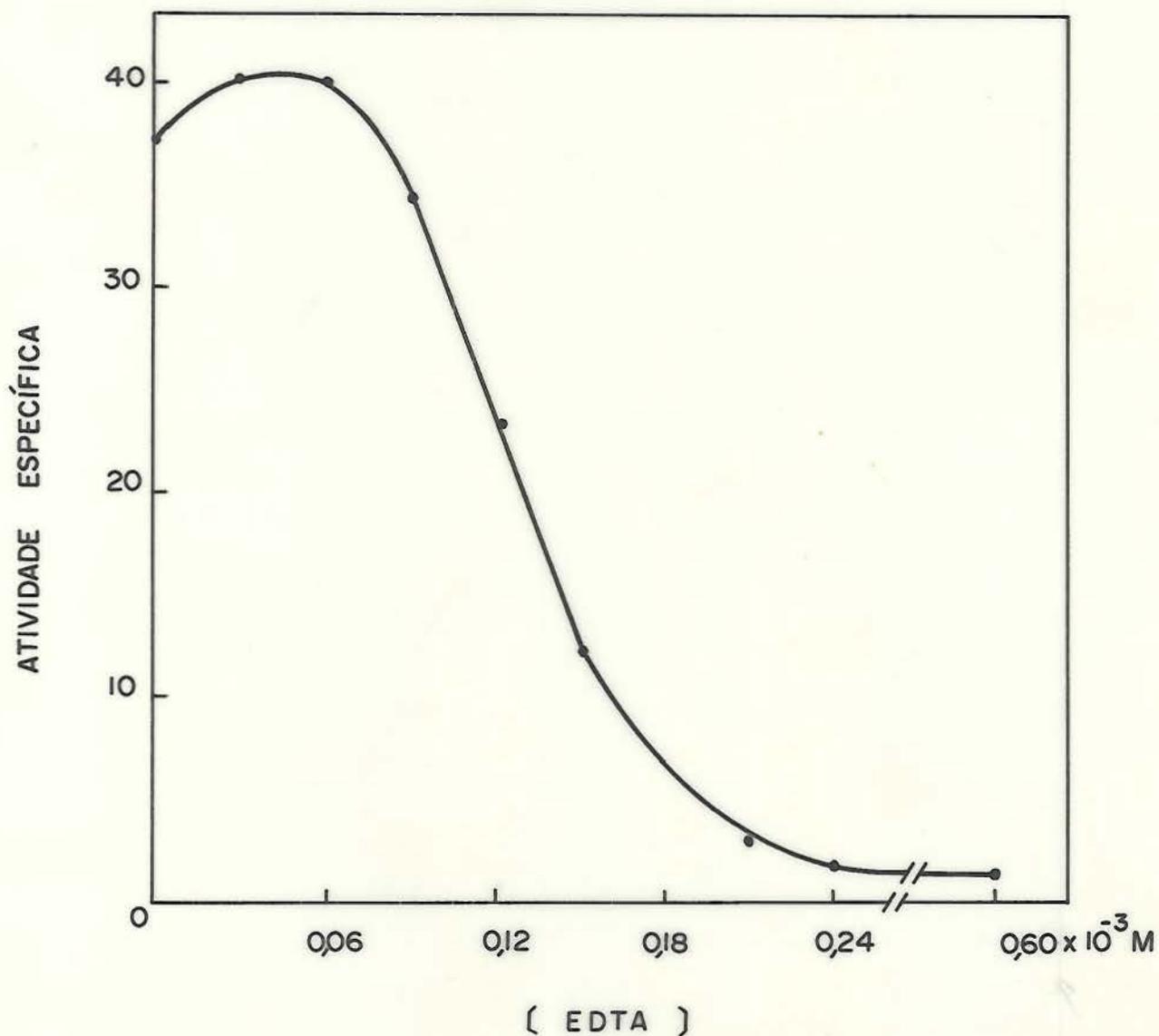


Figura 9 - Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.
Atividade específica: nmóis PBG/mg proteína/h (37°C)
[enzima] = 0,138 mg proteína
Tempo de incubação = 60 min.
Pré-incubação = 10 min.

Observou-se que em concentrações até $3 \times 10^{-3}M$ de DTT a enzima era ativada. Concentrações superiores a $7 \times 10^{-3}M$ causaram um efeito inibitório, indicando novamente ser a δ -ALA-D uma metaloenzima. (Figura 10)

Portanto, o DTT pode atuar como inibidor enzimático, no caso de metaloenzimas, bem como proteger a atividade enzimática quando houver inibição por metais pesados.

3.1.8 - Efeito de cátions metálicos

Sendo constatada a presença de grupamentos sulfidrila, essenciais para a atividade catalítica da enzima, decidiu-se verificar se cátions metálicos inibiam esta atividade e a partir de que concentrações.

Os íons metálicos testados foram adicionados ao meio de incubação, separadamente, pré-incubados por 10 minutos, em concentrações que variaram entre 5 e $200 \times 10^{-6}M$ para os íons Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ni^{2+} . Para o íon Co^{2+} as concentrações variaram entre 5 e $2000 \times 10^{-6}M$.

A δ -ALA desidratase de plâncton não é inibida significativamente pelos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} no intervalo de concentração estudado (Figuras 11, 12 e 13).

Co^{2+} consegue inibir em 50% a atividade enzimática somente em concentrações elevadas, de aproximadamente $200 \times 10^{-6}M$ (Figura 14).

Ni^{2+} apresentou uma inibição de 10% em torno de $30 \times 10^{-6}M$, mostrando em seguida uma forte reativação da enzima que che-

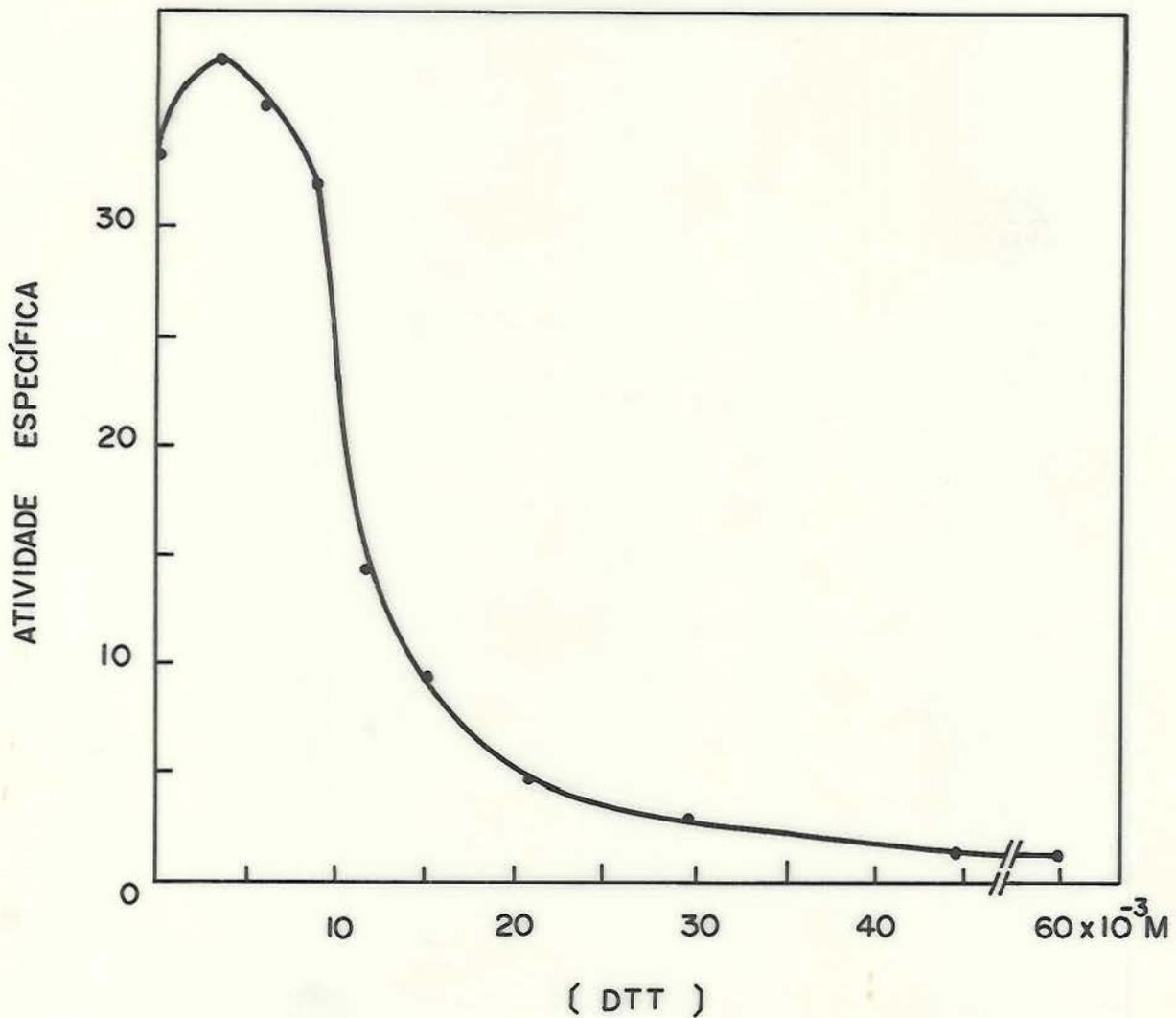


Figura 10 - Efeito da concentração de DTT sobre a atividade da δ -ALA desidratase de plâncton. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°)
 [enzima] = 0,169 mg proteína
 Tempo de incubação = 60 min.
 Pré-incubação = 10 min.

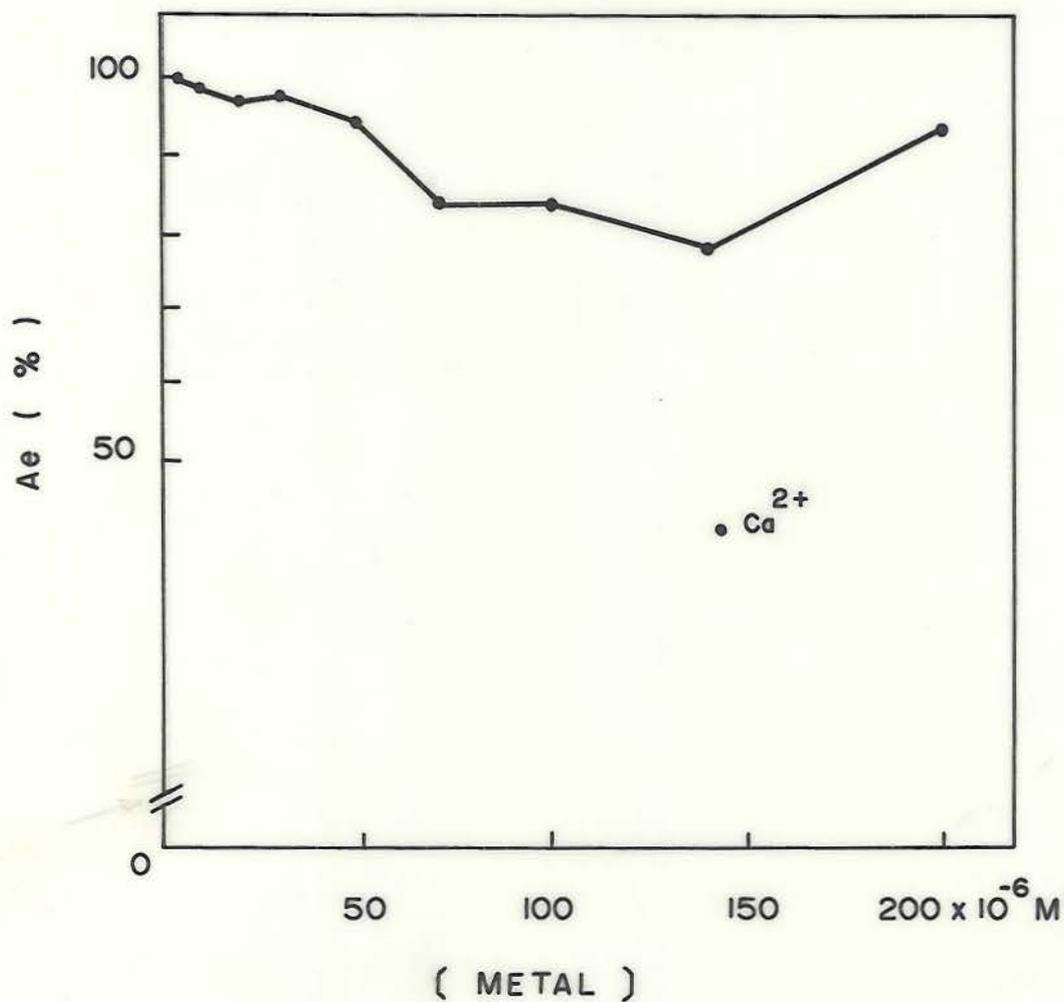


Figura 11 - Efeito da concentração do íon Ca^{2+} sobre a atividade enzimática da δ -ALA desidratase de plâncton.
 Atividade específica = nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)
 [enzima] = 0,174 mg proteína
 Tempo de incubação = 60 min.
 Pré-incubação = 10 min.

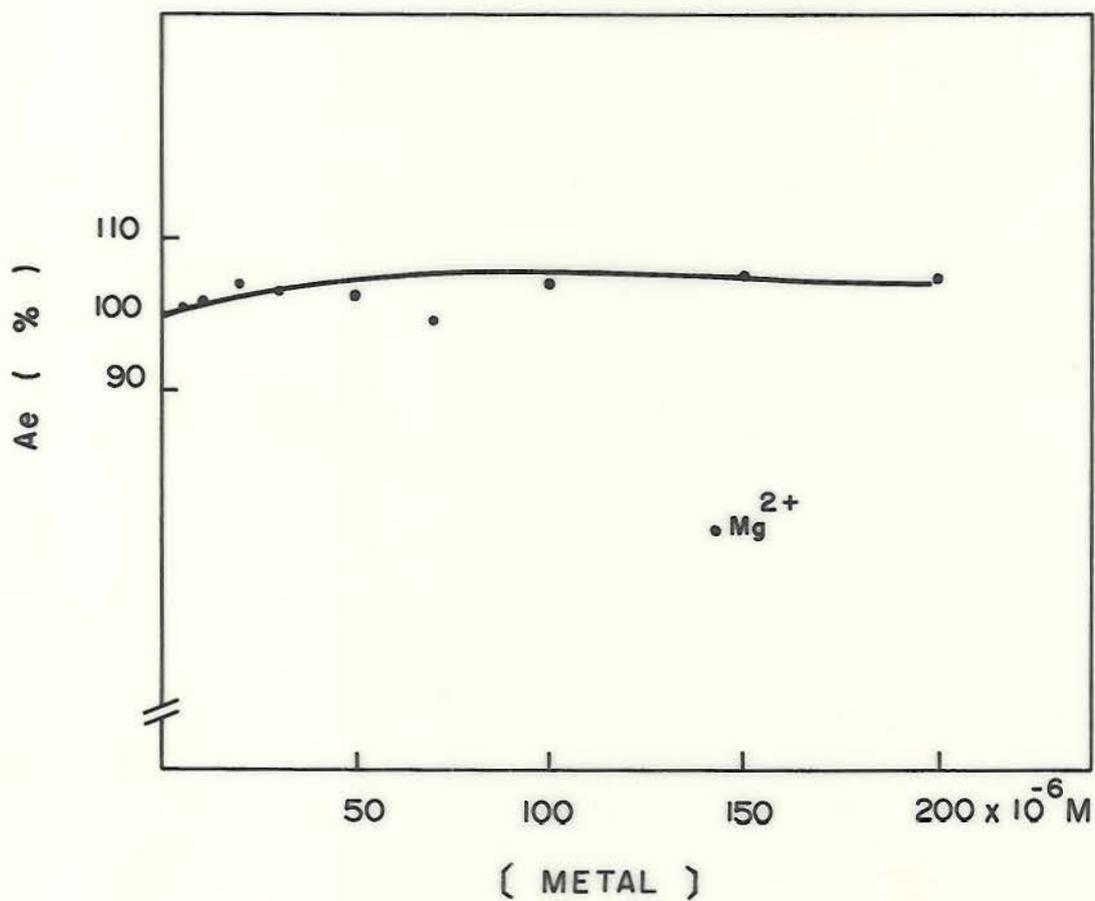


Figura 12 - Efeito da concentração do íon Mg^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)
 [enzima] = 0,162 mg proteína
 Tempo de incubação = 60 min.
 Pré-incubação = 10 min.

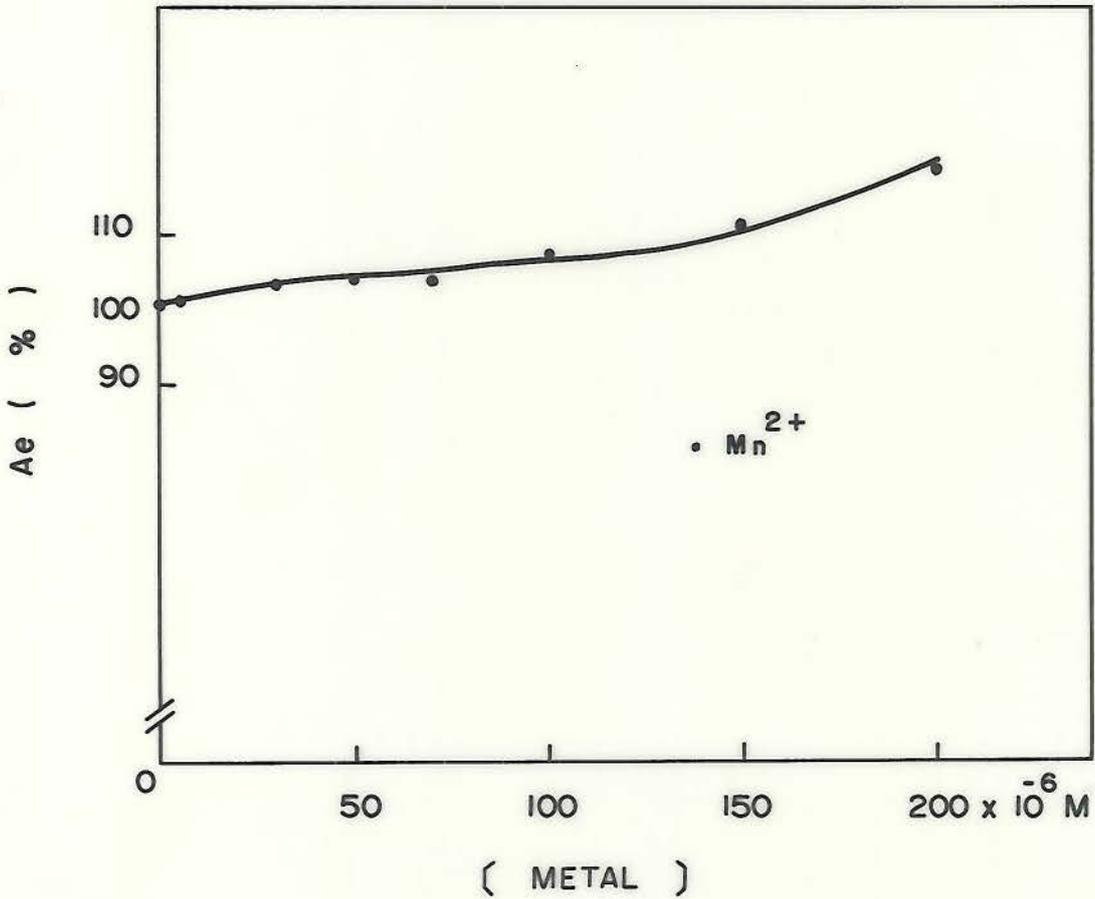


Figura 13 - Efeito da concentração do íon Mn^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)

[enzima] = 0,118 mg proteína

Tempo de incubação = 60 min.

Pré-incubação = 10 min.

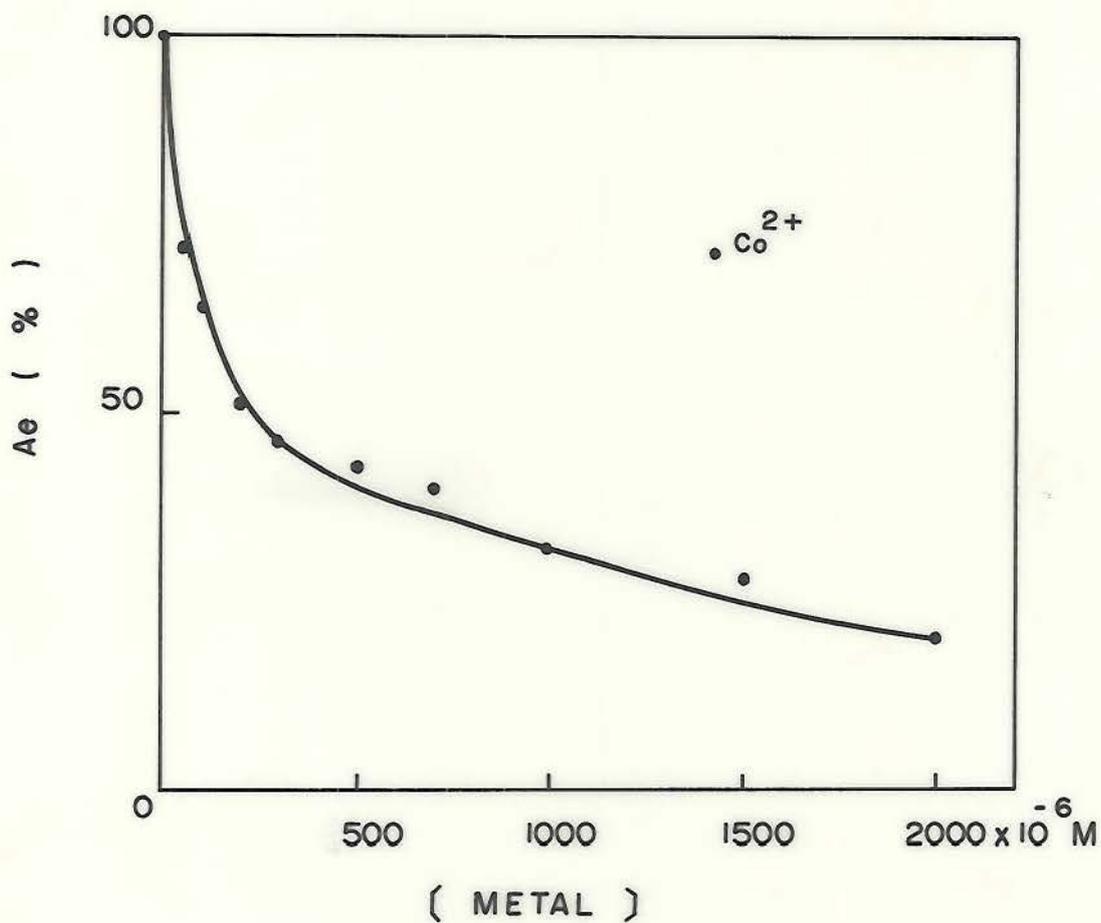


Figura 14 - Efeito da concentração do íon Co^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Atividade específica: nmois/mg PBG/mg proteína/h (37°)

[enzima] = 0,0685 mg proteína

Tempo de incubação = 60 min.

Pré-incubação = 10 min.

gou a alcançar 150% em relação ao controle 100% (Figura 15).

Observou-se que os íons Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} causaram forte inibição enzimática (Figura 16).

As concentrações capazes de causar 50% de inibição da atividade enzimática original (I_{50}) da δ -ALA-D observadas em experiências repetidas, oscilaram em torno de:

Hg^{2+}	$3 \times 10^{-6}\text{M}$
Cu^{2+}	$6 \times 10^{-6}\text{M}$
Cd^{2+}	$18 \times 10^{-6}\text{M}$
Zn^{2+}	$18 \times 10^{-6}\text{M}$
Pb^{2+}	$100 \times 10^{-6}\text{M}$

3.2 - Recuperação da atividade enzimática inibida utilizando agentes quelantes

Depois de verificar que a δ -ALA-D de plâncton era inibida por baixas concentrações dos íons Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} decidiu-se examinar detalhadamente os quelantes que eventualmente pudessem reativar a enzima.

3.2.1 - Recuperação com DTT

Incubou-se a enzima em presença de cada um dos cátions capazes de causar acentuada inibição, com concentrações crescentes de DTT. Observou-se que DTT na concentração de aproximadamente $3 \times 10^{-3}\text{M}$ recupera a atividade da δ -ALA-D. Concentrações superiores a $6 \times 10^{-3}\text{M}$, causaram acentuada inibição da reação (Figuras 17, 18, 19 e 20).

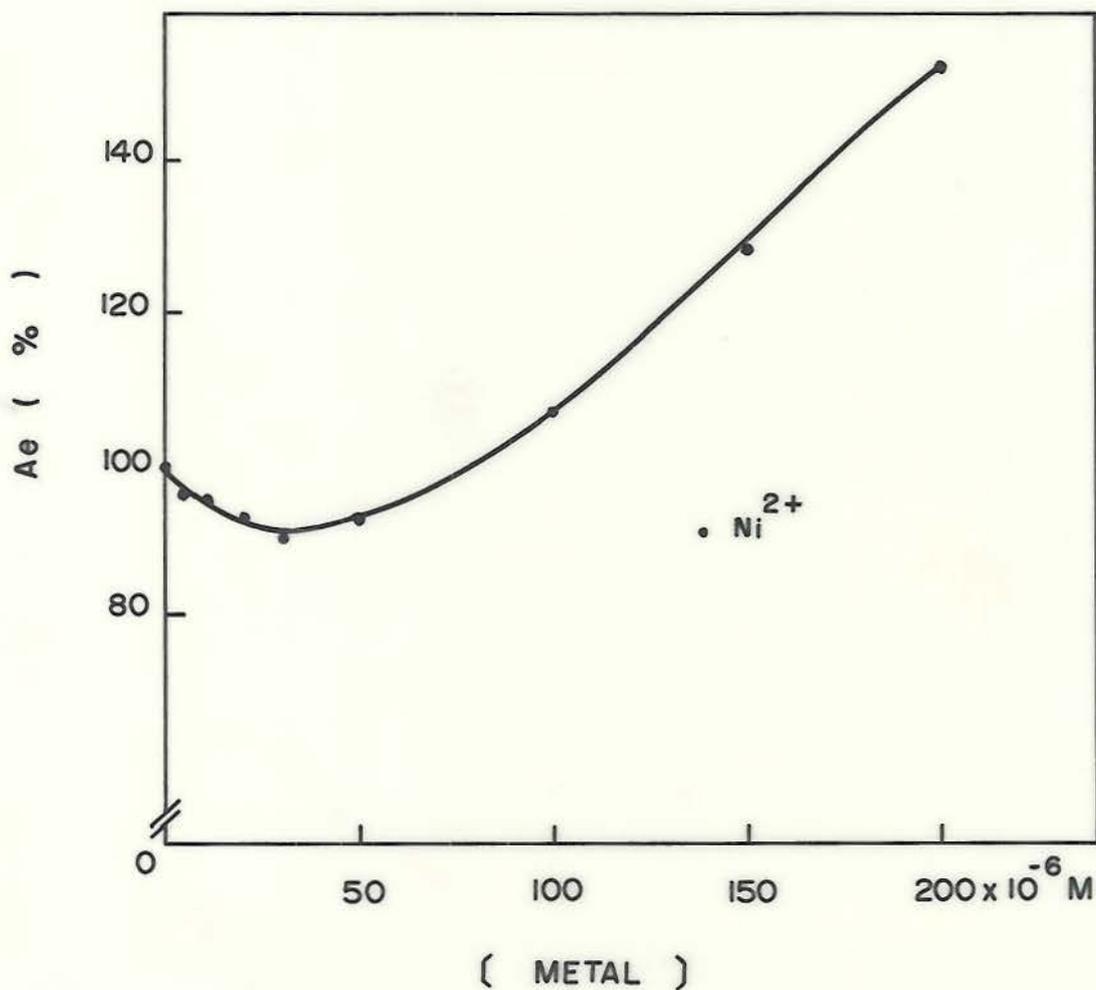


Figura 15 - Efeito da concentração do íon Ni^{2+} sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

[enzima] = 0,084 mg proteína

Tempo de incubação = 60 min.

Pré-incubação = 10 min.

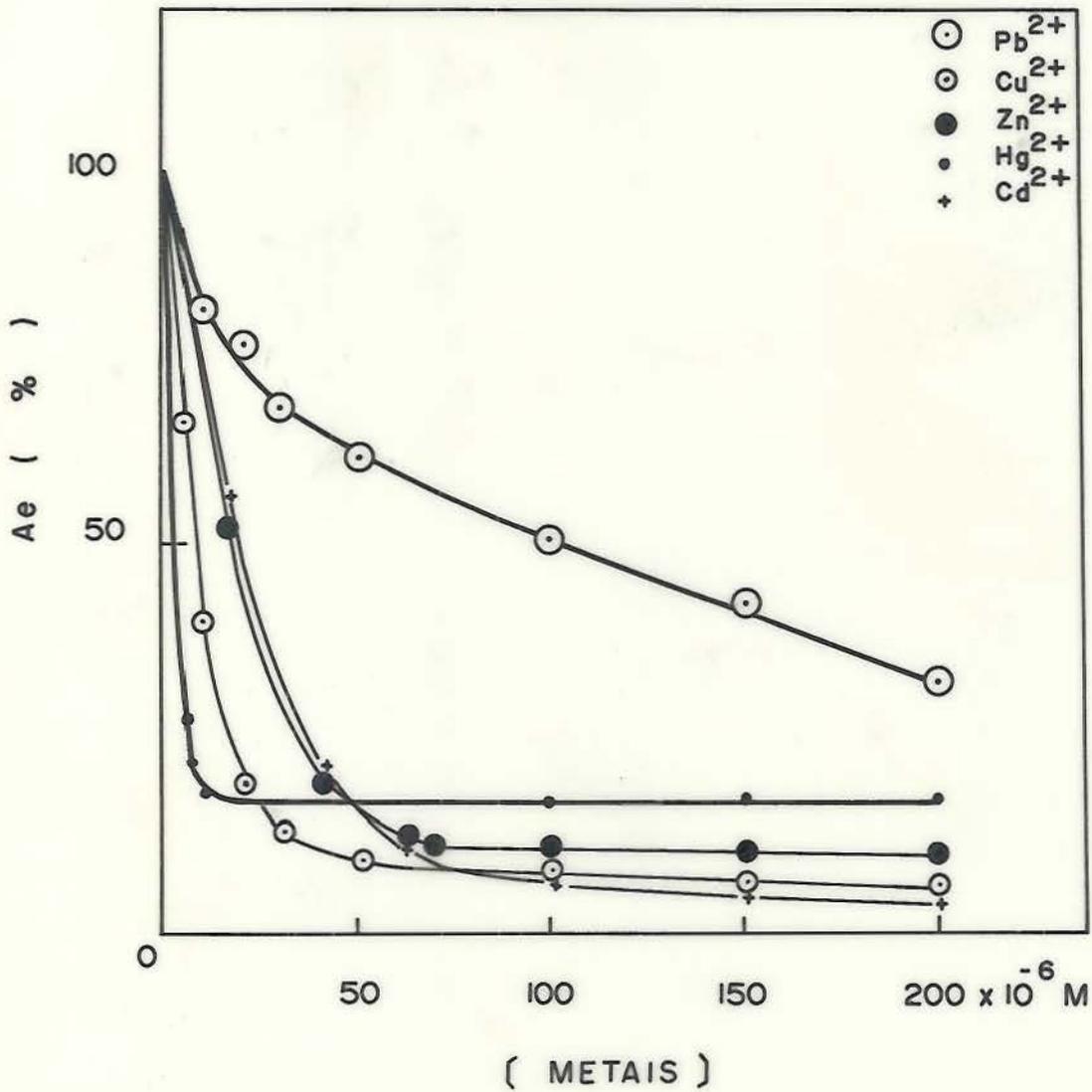


Figura 16 - Efeito das concentrações dos íons Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ e Cd²⁺ sobre a atividade da δ -ALA desidratase em plâncton.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

Tempo de incubação = 60 min.

Pré-incubação = 10 min.

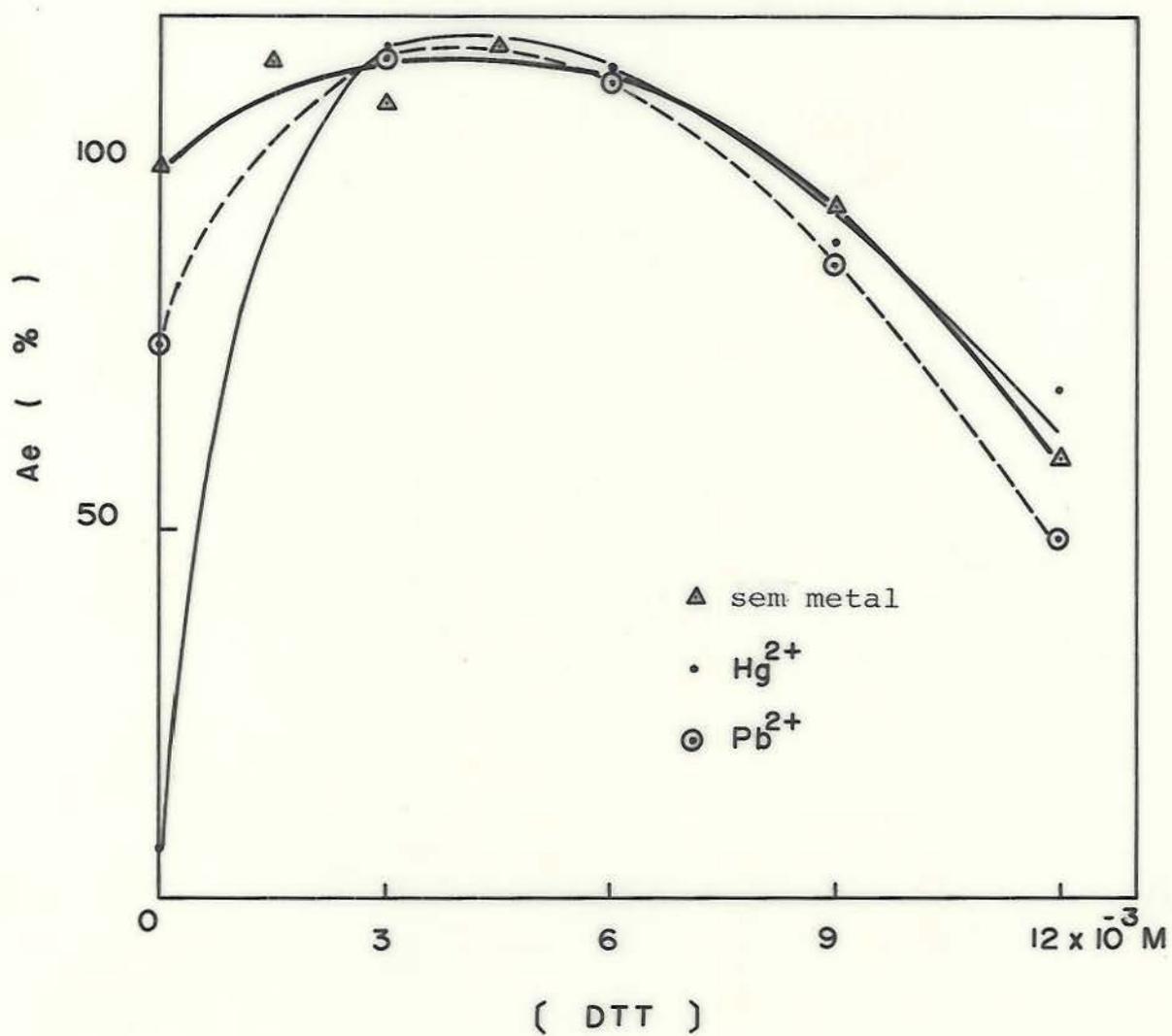


Figura 17 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Hg²⁺ (10×10^{-6} M) e Pb²⁺ (100×10^{-6} M), através do DTT. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

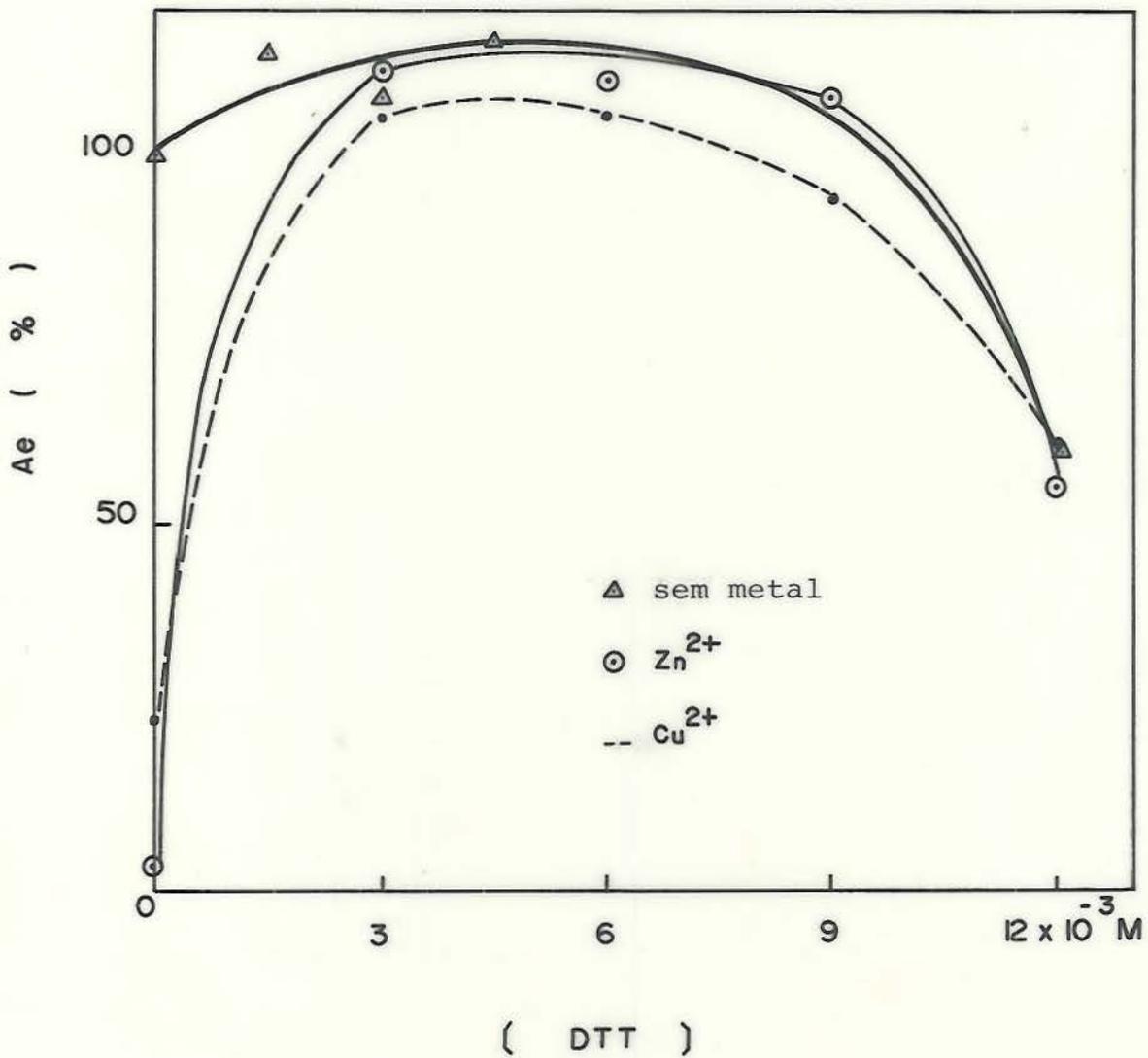


Figura 18 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Zn^{2+} ($50 \times 10^{-6} M$) e Cu^{2+} ($15 \times 10^{-6} M$) através do DTT. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°)

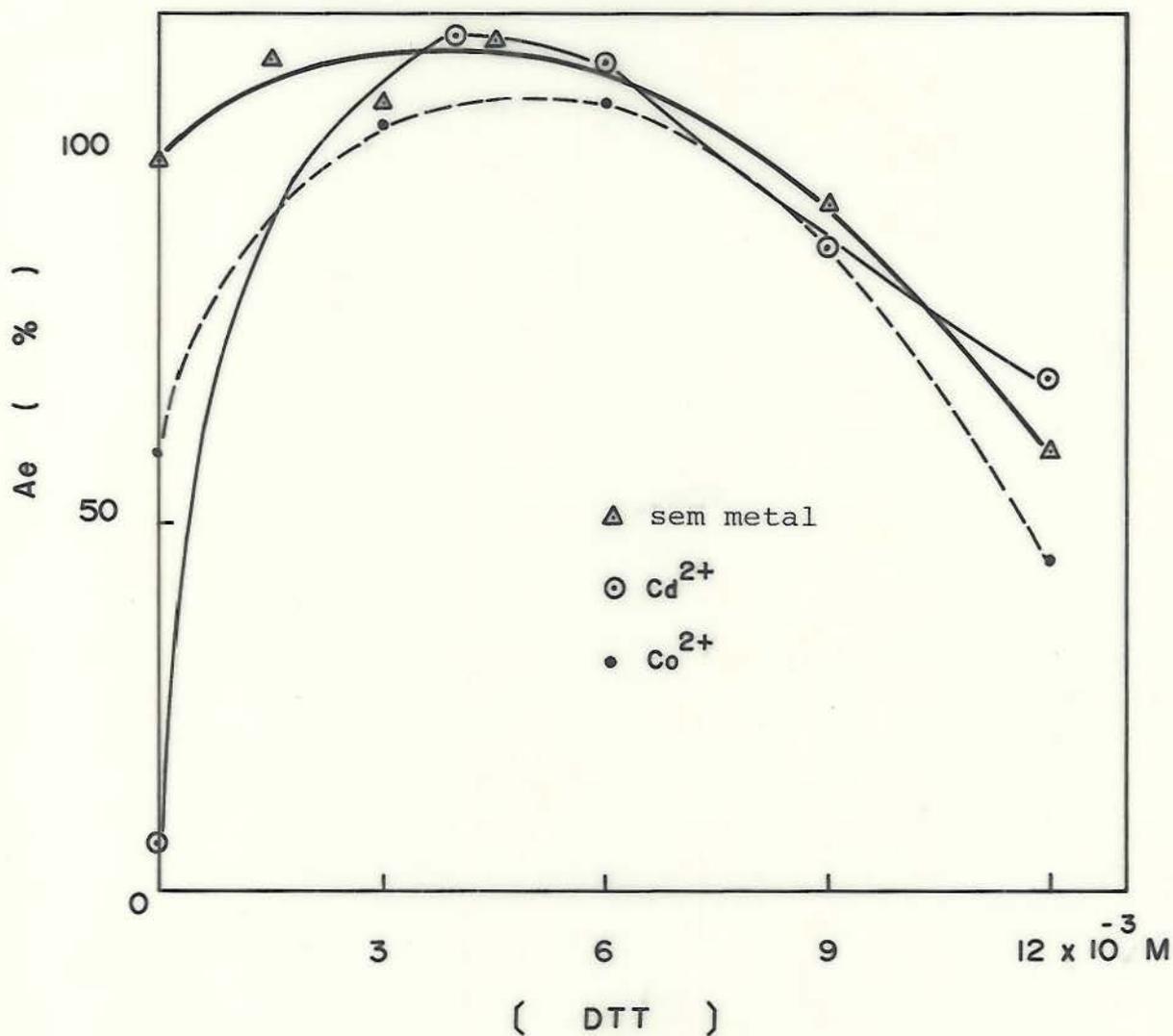


Figura 19 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Cd^{2+} ($50 \times 10^{-6} \text{M}$) e Co^{2+} ($200 \times 10^{-6} \text{M}$), através do DTT. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

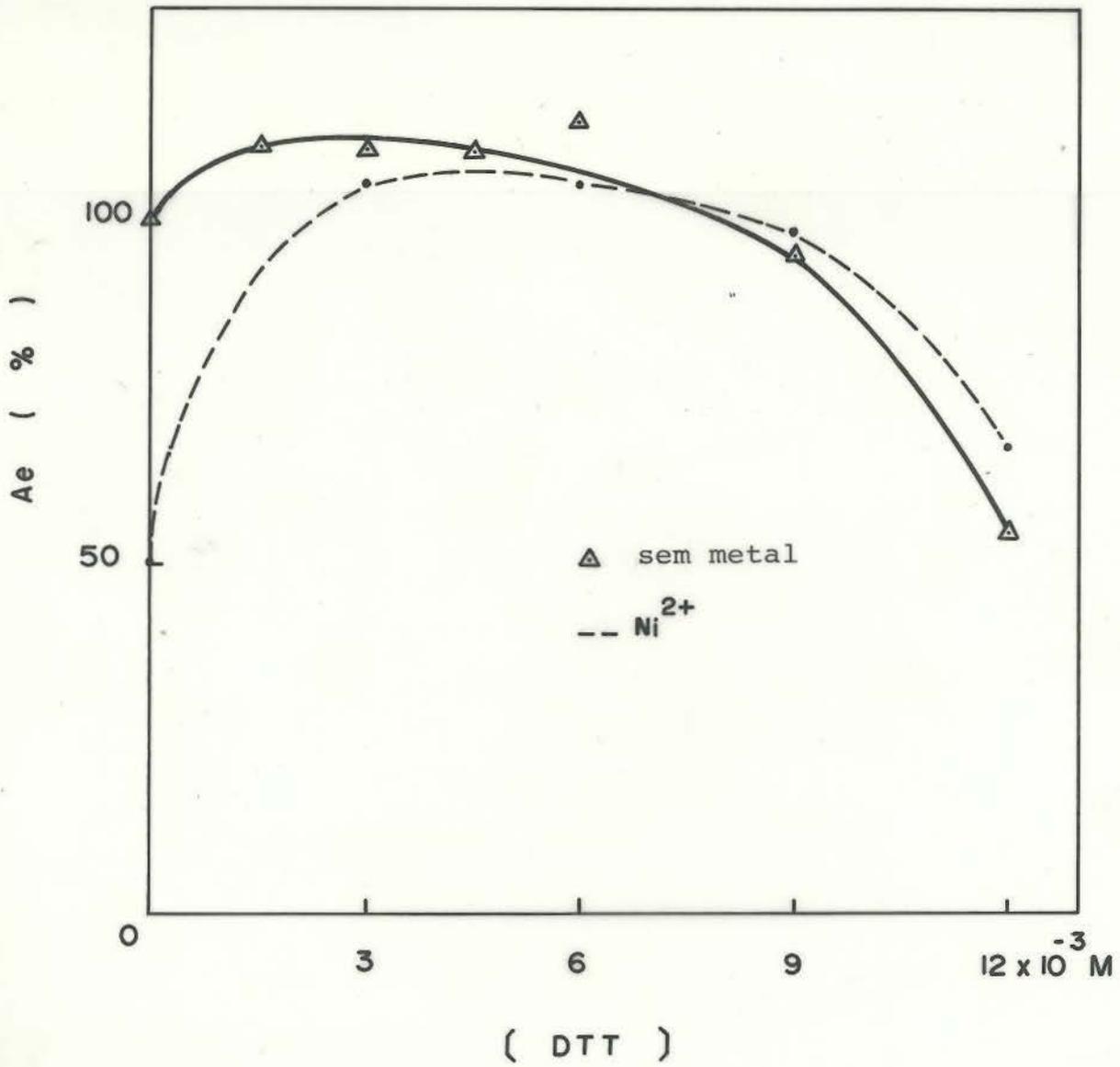


Figura 20 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Ni²⁺ (70×10^{-6} M), através do DTT

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

A concentração dos inibidores utilizada nos ensaios foi:

Cu^{2+}	$(15 \times 10^{-6} \text{M})$
Hg^{2+}	$(10 \times 10^{-6} \text{M})$
Cd^{2+}	$(50 \times 10^{-6} \text{M})$
Zn^{2+}	$(50 \times 10^{-6} \text{M})$
Ni^{2+}	$(70 \times 10^{-6} \text{M})$
Pb^{2+}	$(100 \times 10^{-6} \text{M})$
Co^{2+}	$(200 \times 10^{-6} \text{M})$

O pico de regeneração ocorre em torno de $3 \times 10^{-3} \text{M}$ de DTT, para os cátions testados, acima do qual ocorre inibição.

3.2.2 - Recuperação com EDTA

A semelhança do DTT, incubou-se a enzima com concentrações crescentes de EDTA em presença de cada um dos cátions capazes de inibir a atividade da enzima.

EDTA recuperou a atividade da δ -ALA-D na faixa de 0,03 a $0,09 \times 10^{-3} \text{M}$ no caso dos íons estudados (Figuras 21, 22, 23 e 24) exceto para a Pb^{2+} (Figura 25) que apresentou reativação na concentração de $0,15 \times 10^{-3} \text{M}$ e do Co^{2+} recuperando em torno de $0,21 \times 10^{-3} \text{M}$ (Figura 26).

Observou-se que somente na inibição com Hg^{2+} (Figura 27) a enzima não apresentou plena recuperação nas condições ensaiadas não conseguindo recuperação acima de 46%, com EDTA a $0,09 \times 10^{-3} \text{M}$.

A concentração dos inibidores, utilizado nos experimentos foi:

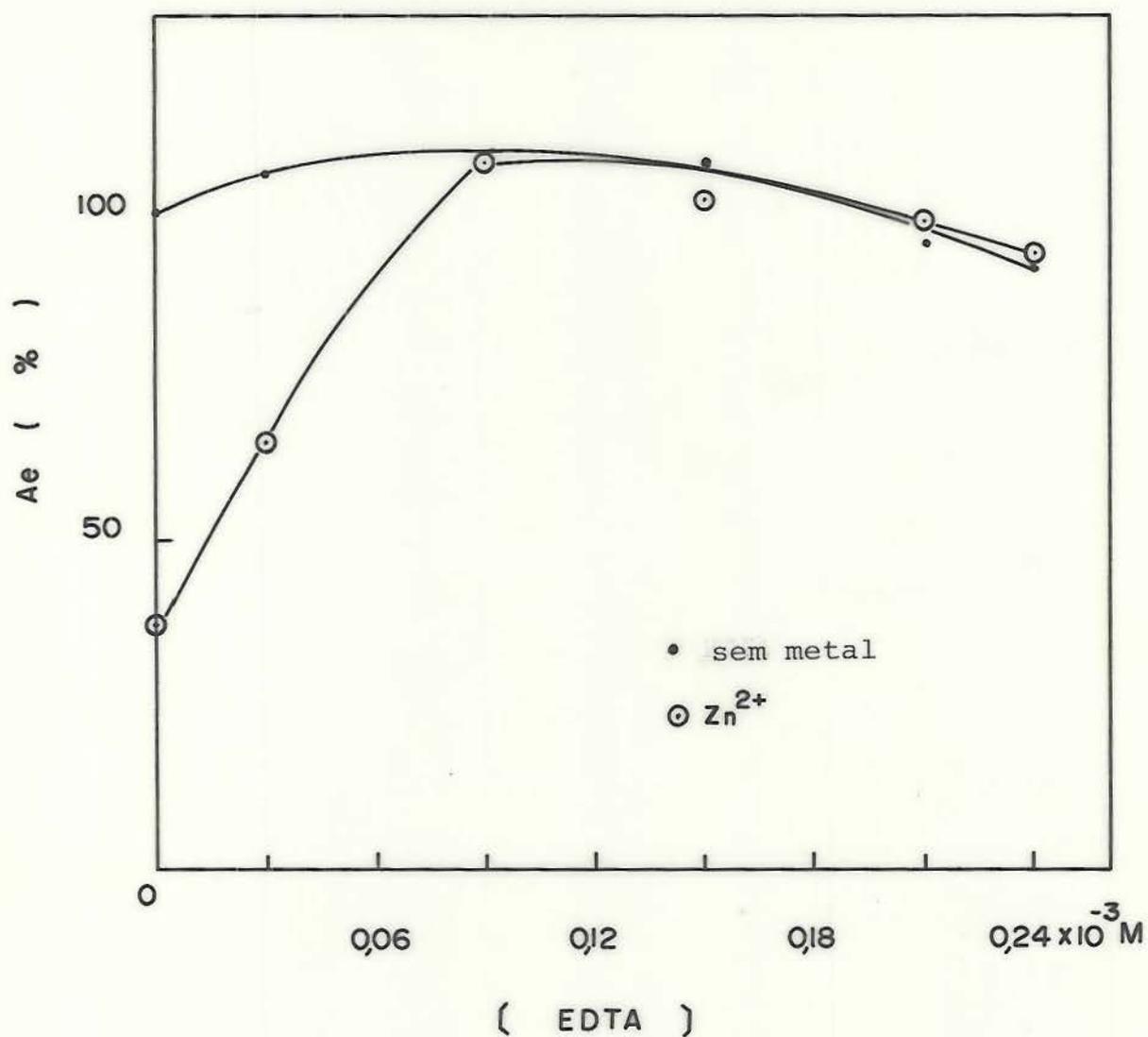


Figura 21 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Zn^{2+} ($50 \times 10^{-6} M$), através de EDTA
 Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
 ($37^{\circ}C$)

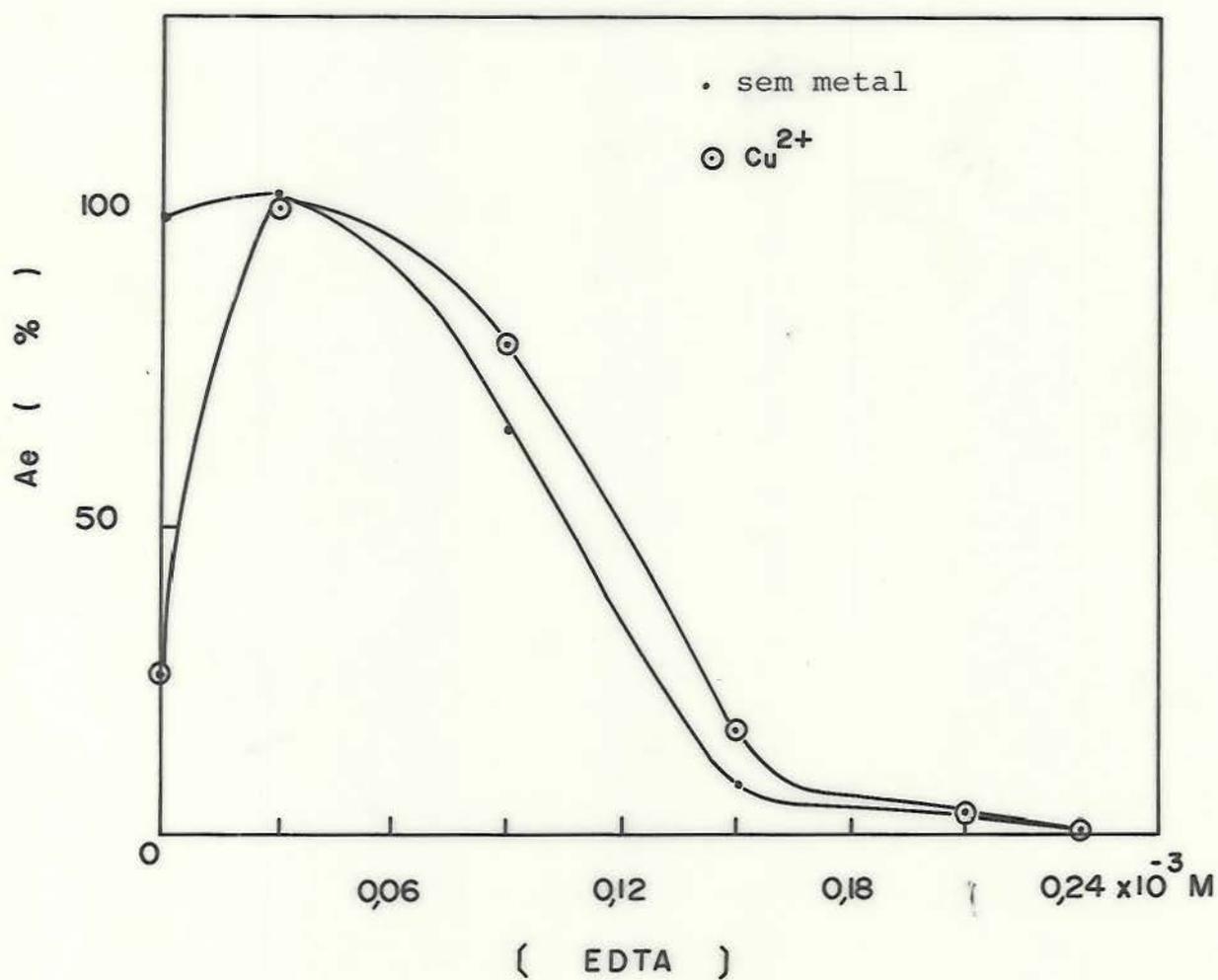


Figura 22 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Cu^{2+} ($20 \times 10^{-6} \text{M}$), através de EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
 (37°C)

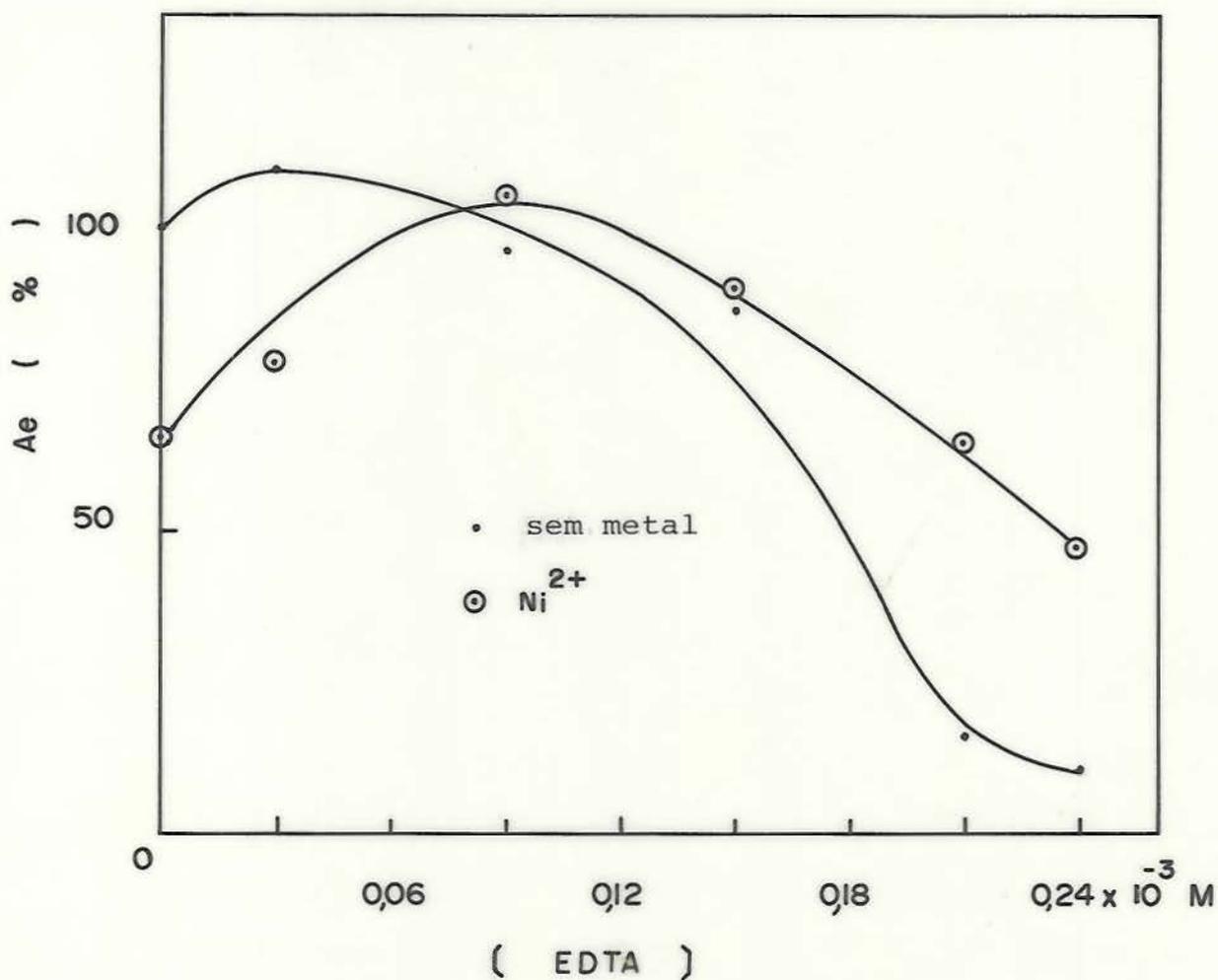


Figura 23 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase em plâncton, inibida por Ni^{2+} ($70 \times 10^{-6} \text{ M}$), através de EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

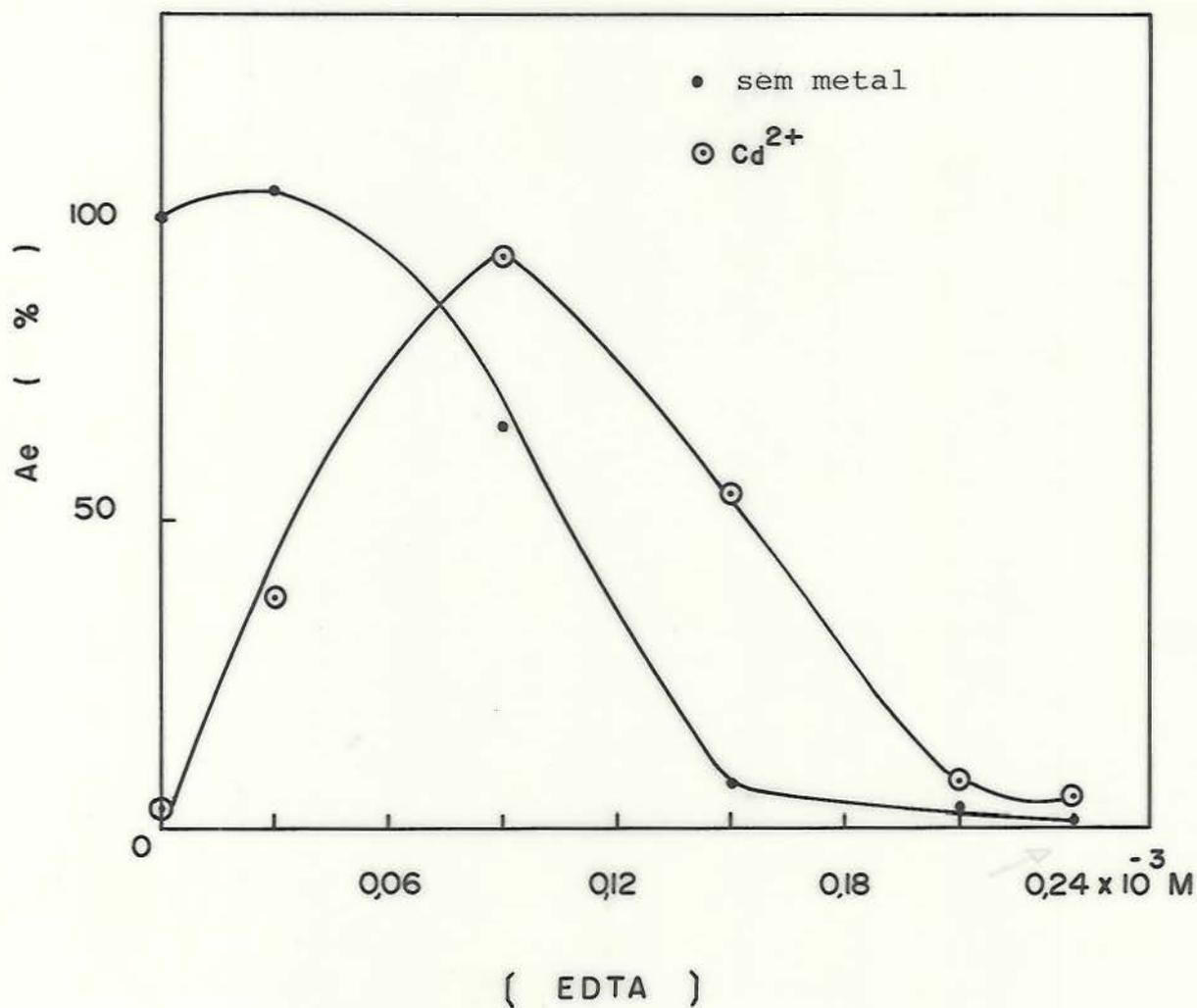


Figura 24 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Cd^{2+} ($50 \times 10^{-6} \text{M}$), através de EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
(37°C)

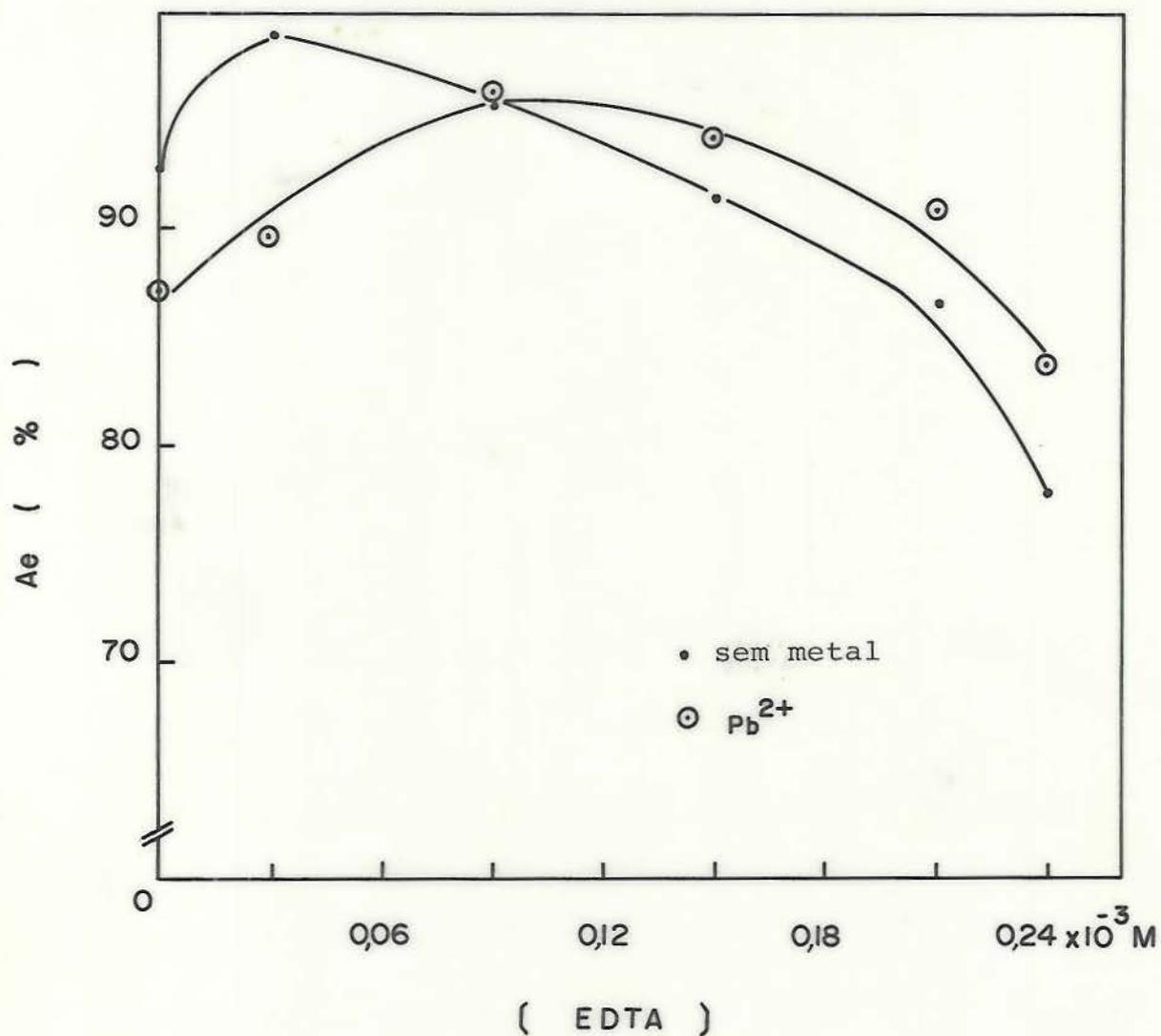


Figura 25 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Pb^{2+} ($100 \times 10^{-6} M$), através de EDTA.
Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)

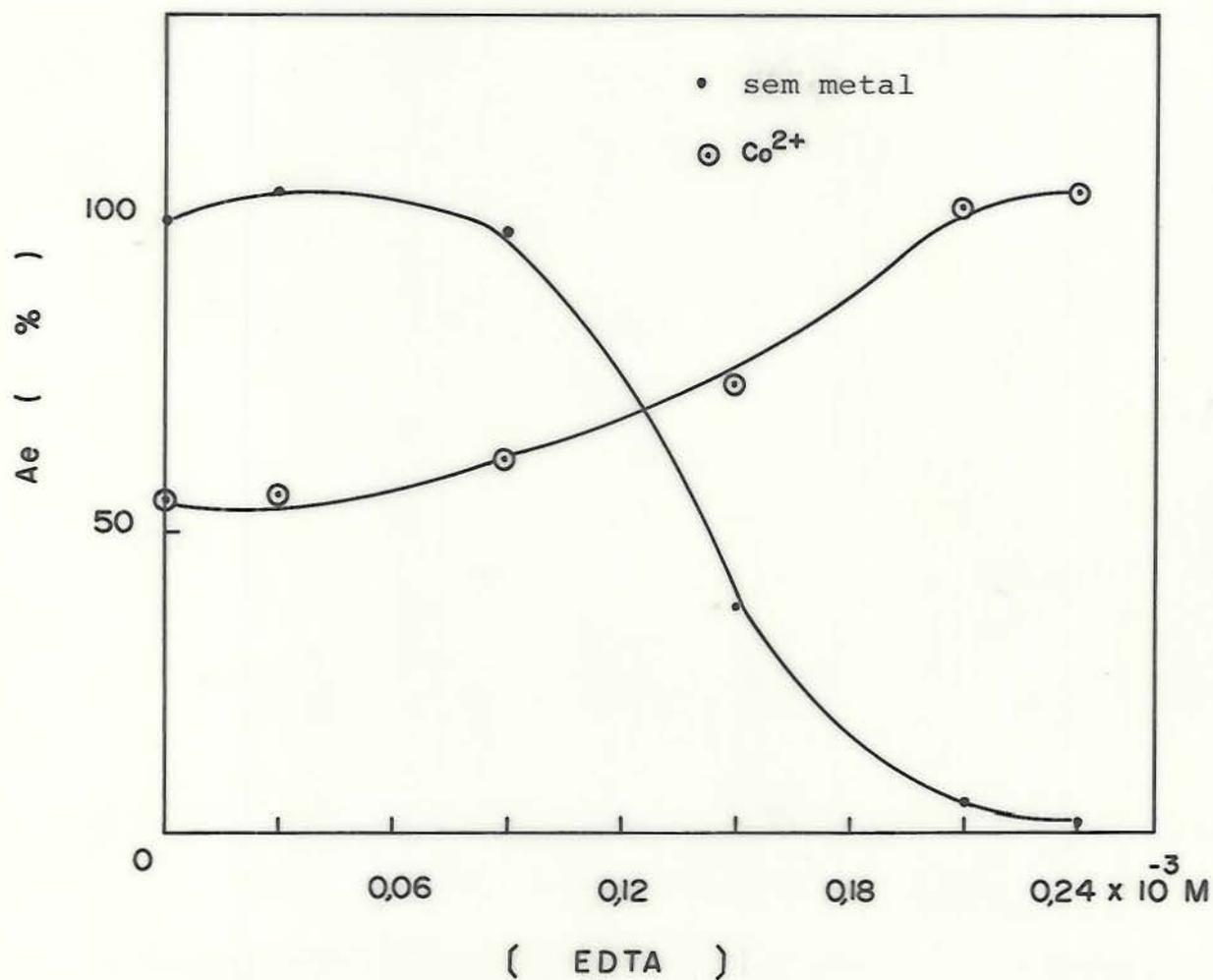


Figura 26 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Co^{2+} ($200 \times 10^{-6} \text{M}$), através de EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
(37°C)

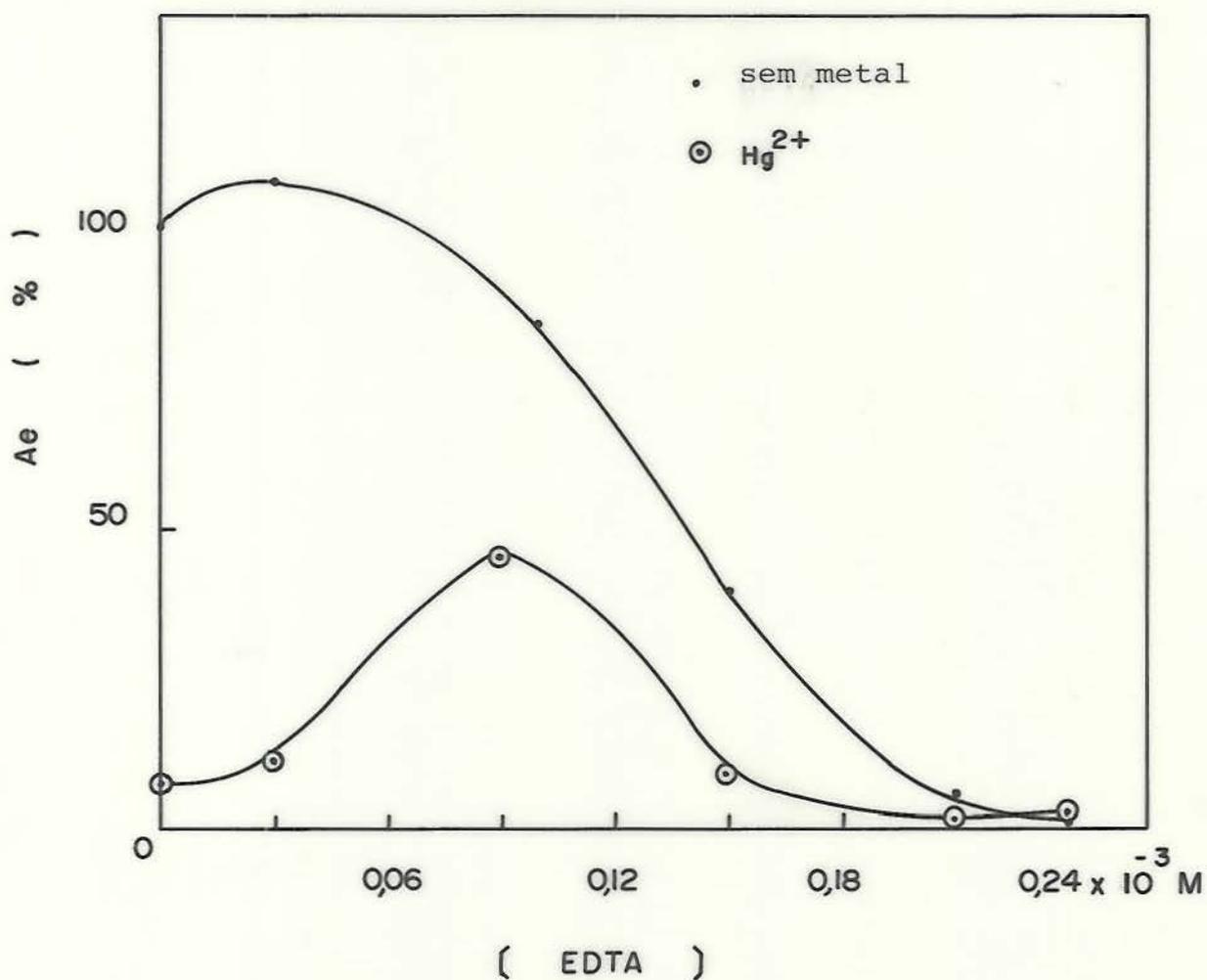


Figura 27 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por Hg^{2+} ($10 \times 10^{-6} \text{ M}$), através de EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h
(37°C)

Hg ²⁺	(10 x 10 ⁻⁶ M)
Cu ²⁺	(20 x 10 ⁻⁶ M)
Cd ²⁺	(50 x 10 ⁻⁶ M)
Zn ²⁺	(50 x 10 ⁻⁶ M)
Ni ²⁺	(70 x 10 ⁻⁶ M)
Pb ²⁺	(100 x 10 ⁻⁶ M)
Co ²⁺	(200 x 10 ⁻⁶ M)

3.2.3 - Recuperação da atividade enzimática inibida com íons metálicos, através de DTT, usando diversas concentrações de enzima

Como a quantidade de enzima usada nos ensaios pudesse diferir de caso a caso, julgou-se necessário verificar se esta variação não se refletiria na eficiência do teste de recuperação.

Os extratos foram previamente inibidos com as seguintes concentrações de metais:

Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺	:	10 x 10 ⁻⁶ M,	20 x 10 ⁻⁶ M,	30 x 10 ⁻⁶ M
Cd ²⁺ , Zn ²⁺	:	10 x 10 ⁻⁶ M,	30 x 10 ⁻⁶ M,	50 x 10 ⁻⁶ M.

Observou-se que com 3 x 10⁻³M de DTT a recuperação da atividade enzimática da δ -ALA-D de plâncton foi total, em todos os ensaios realizados (Figuras 28, 29, 30, 31 e 32).

Os resultados foram obtidos com concentrações de proteína que variaram entre 0,11 mg e 0,67 mg de proteína no meio de incubação.

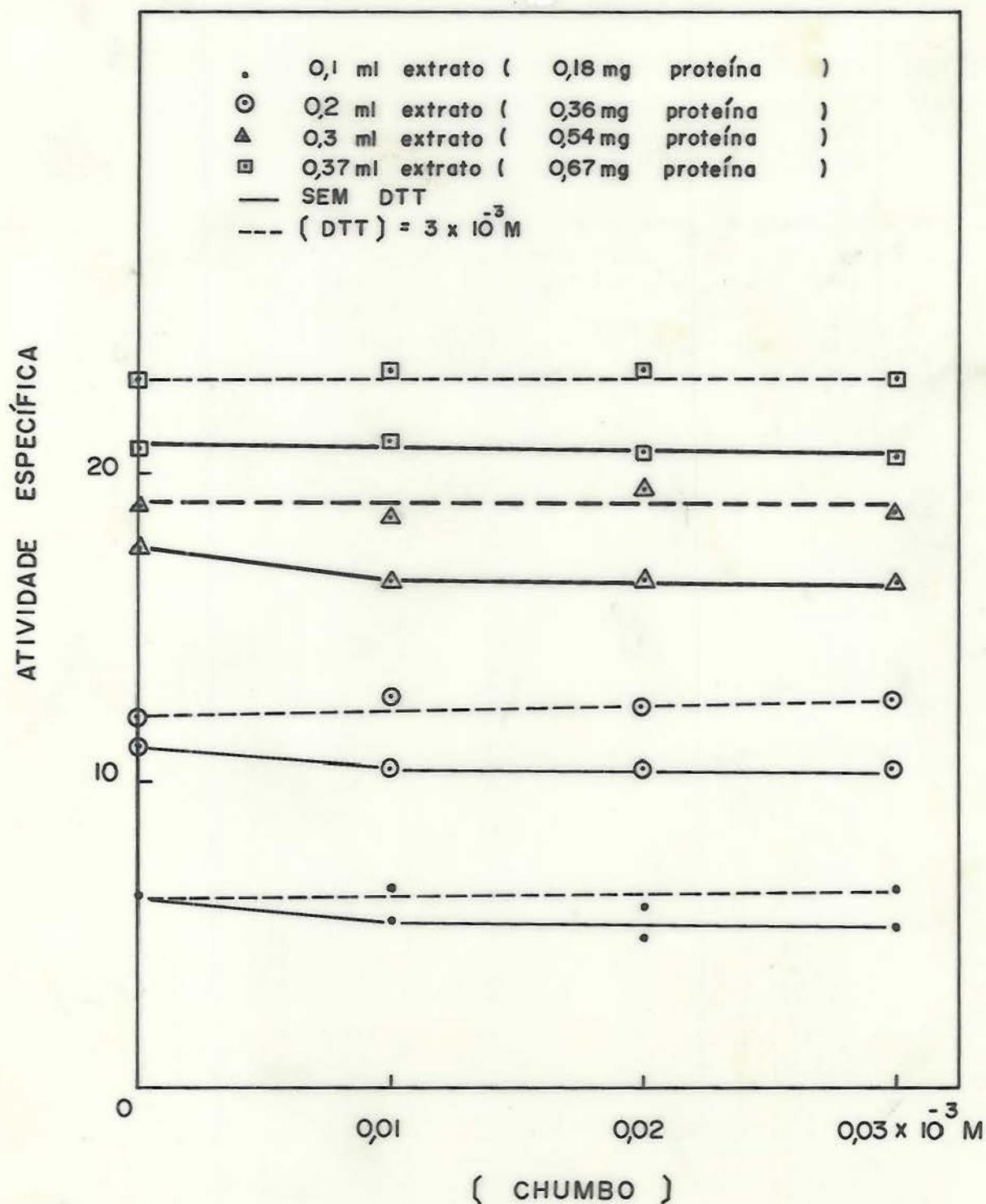


Figura 28 - Inibição com Pb^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

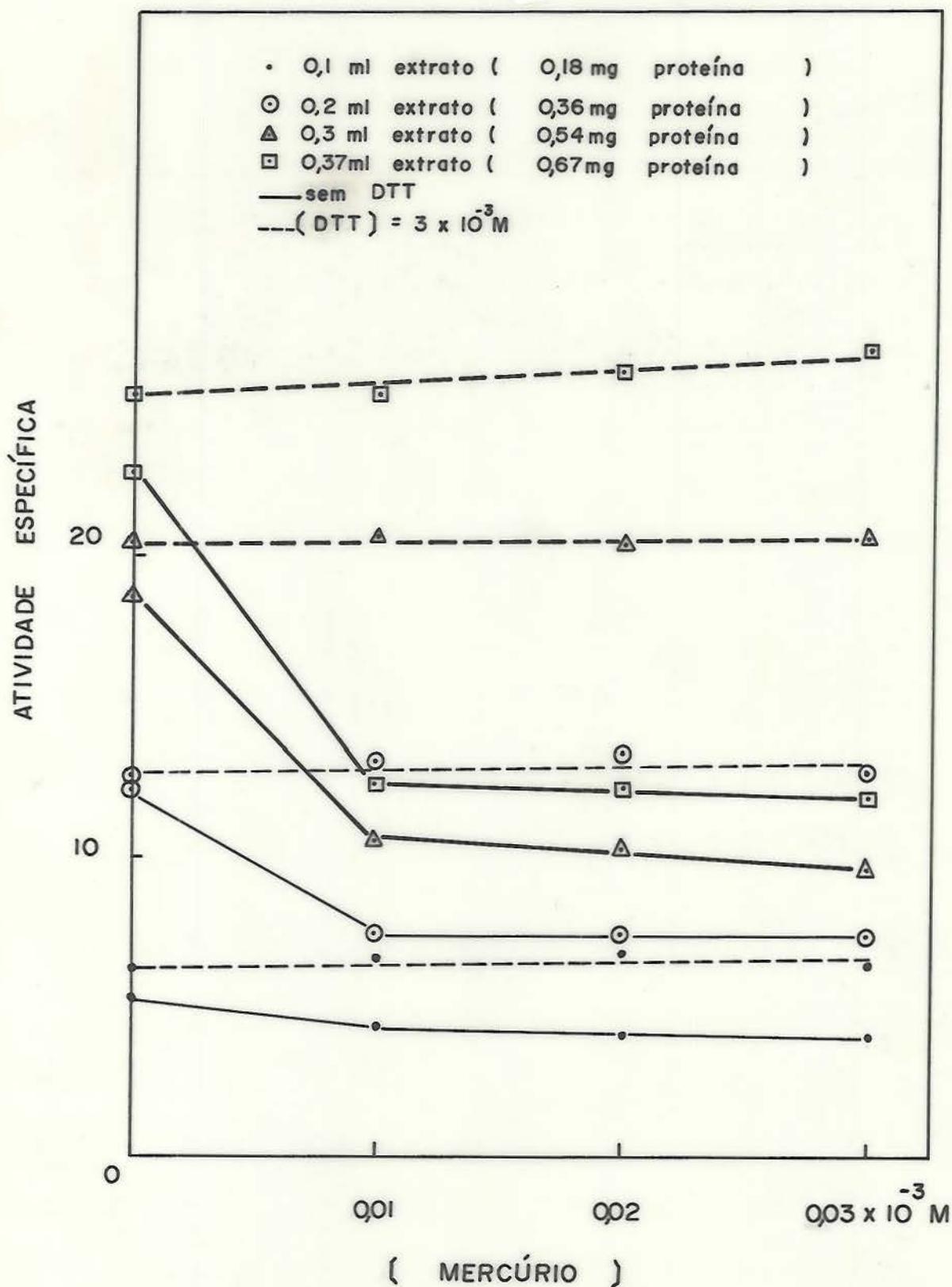


Figura 29 - Inibição com Hg^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

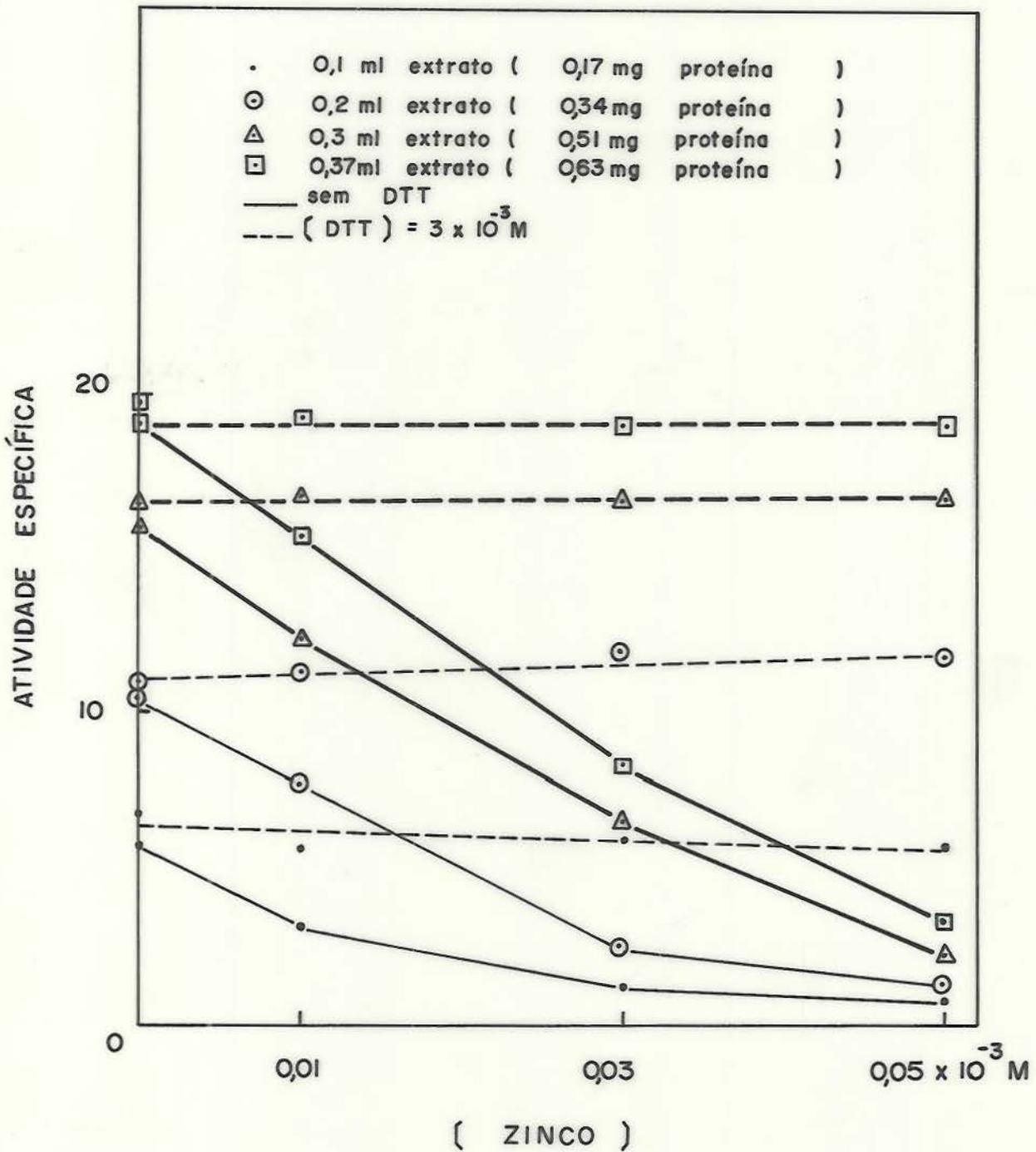


Figura 30 - Inibição com Zn^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT. Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)

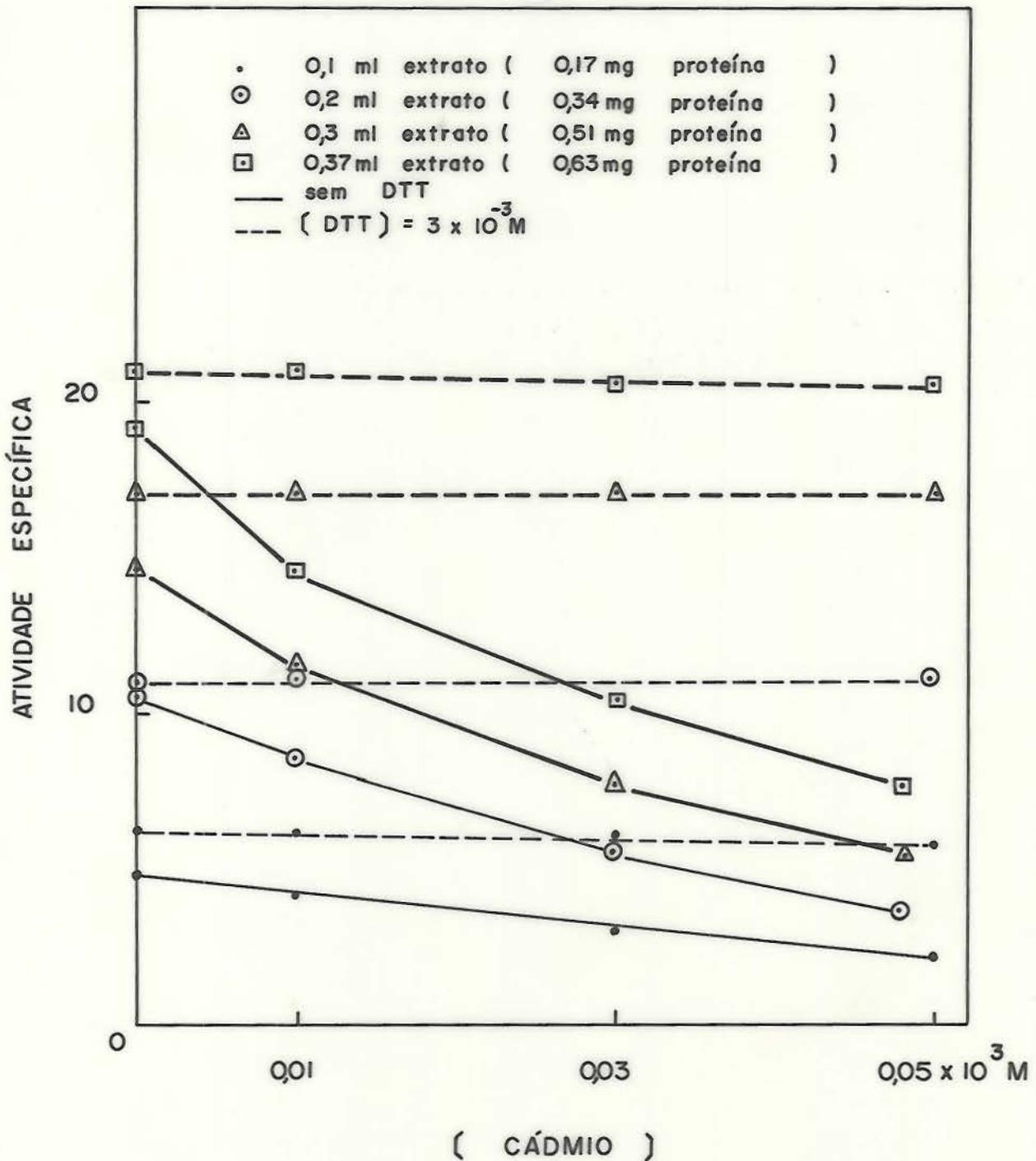


Figura 31 - Inibição com Cd^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

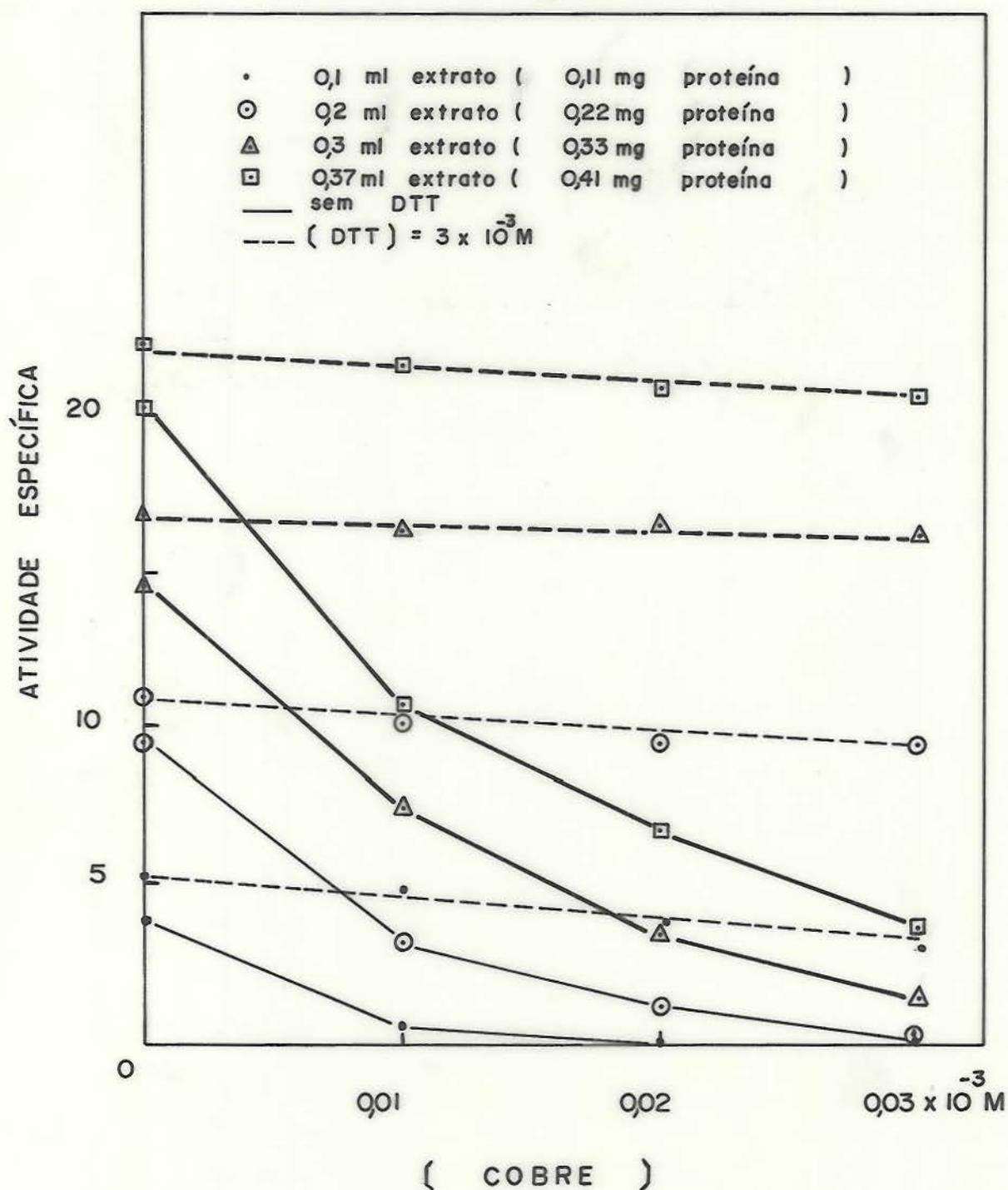


Figura 32 - Inibição com Cu^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com DTT.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

Portanto, independentemente da concentração de δ -ALA-D testada nos ensaios, a concentração de DTT utilizada ($3 \times 10^{-3} M$) consegue recuperar a atividade enzimática quando inibida, separadamente, por íons metálicos.

3.2.4 - Recuperação da atividade enzimática inibida com íons metálicos, através de EDTA, usando diversas concentrações de enzima

Este teste foi realizado com o objetivo de se verificar o comportamento do quelante EDTA, na recuperação da atividade enzimática, em diversas concentrações enzimáticas.

Os extratos foram previamente inibidos com as seguintes concentrações de metais.

Hg ²⁺ , Cu ²⁺	:	10 x 10 ⁻⁶ M, 20 x 10 ⁻⁶ M, 30 x 10 ⁻⁶ M
Zn ²⁺ , Cd ²⁺	:	10 x 10 ⁻⁶ M, 30 x 10 ⁻⁶ M, 50 x 10 ⁻⁶ M
Pb ²⁺	:	10 x 10 ⁻⁶ M, 70 x 10 ⁻⁶ M, 100 x 10 ⁻⁶ M

Observou-se que utilizando-se EDTA na concentração de $0,06 \times 10^{-3} M$ conseguiu-se recuperação da atividade enzimática da δ -ALA-D para o íon Cu²⁺ em todas as concentrações de enzima testadas (Figura 33).

Para os íons Zn²⁺, Cd²⁺ (Figuras 34 e 35) a recuperação foi satisfatória apenas nas maiores concentrações de enzima que são 0,48 e 0,59 mg proteína.

Os íons Pb²⁺ e Hg²⁺ apresentaram comportamento irregular em todas as concentrações de enzima, quando EDTA foi utilizado (Figuras 36 e 37).

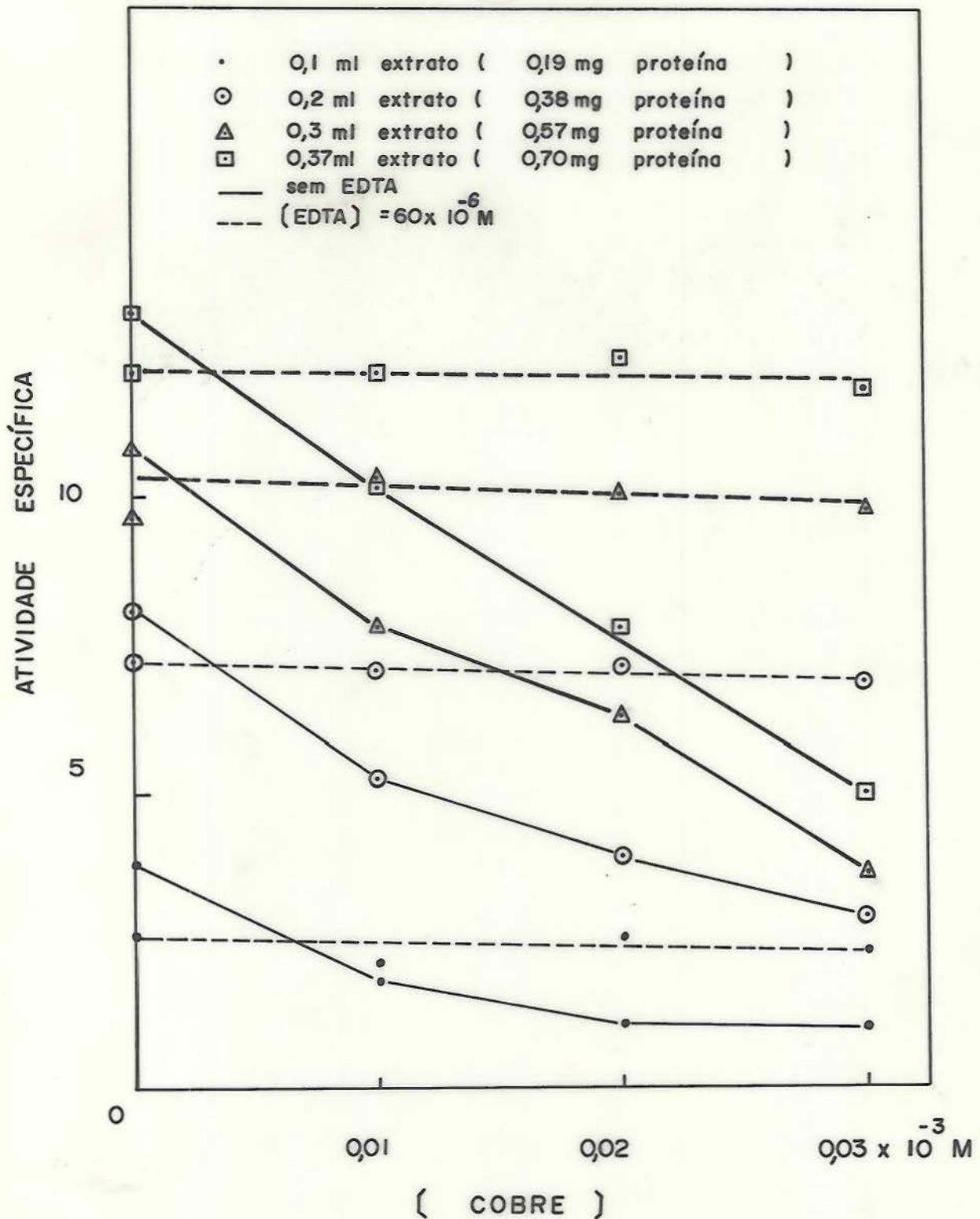


Figura 33 - Inibição com Cu^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína /h (37°C)

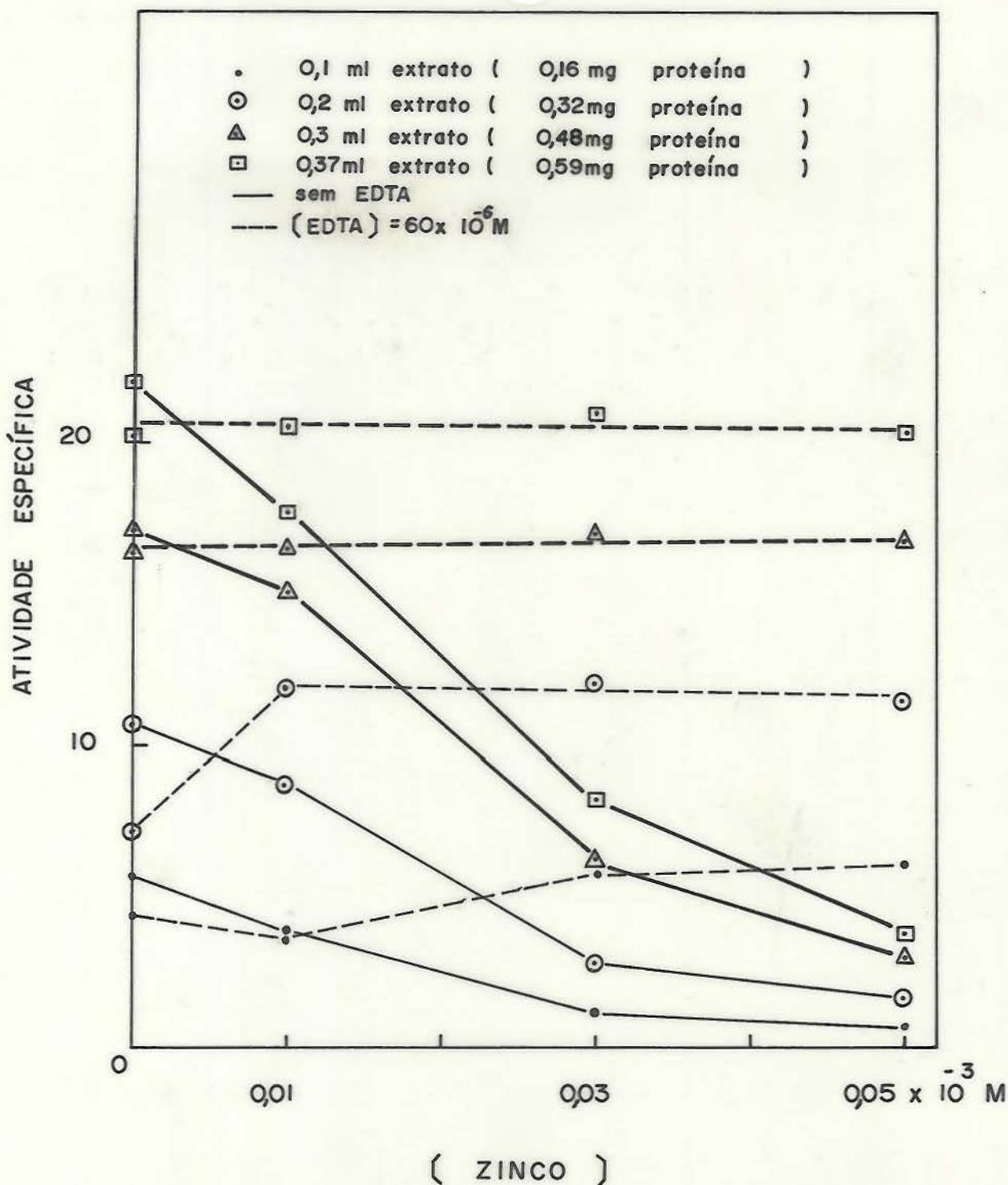


Figura 34 - Inibição com Zn^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)

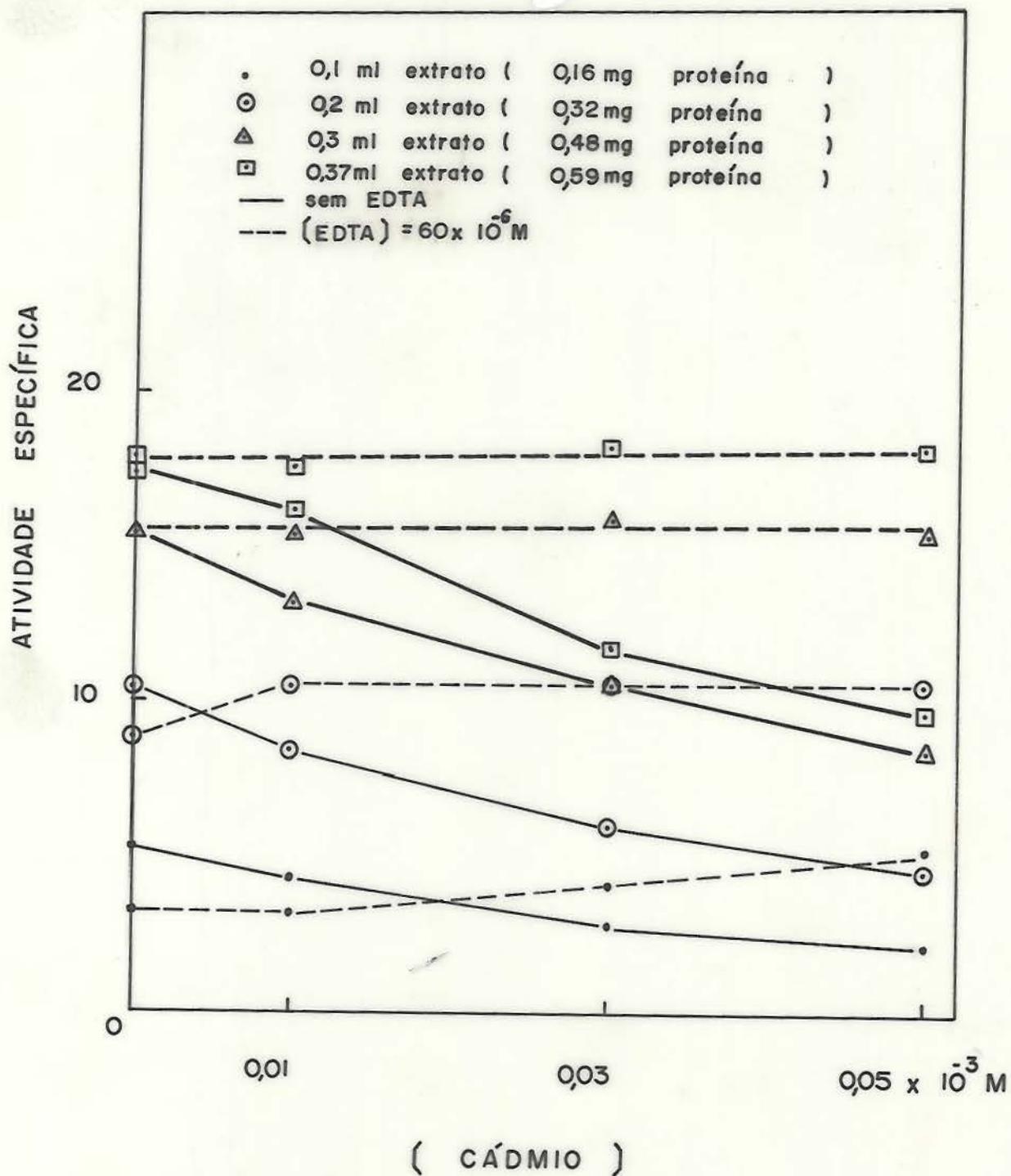


Figura 35 - Inibição com Cd^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

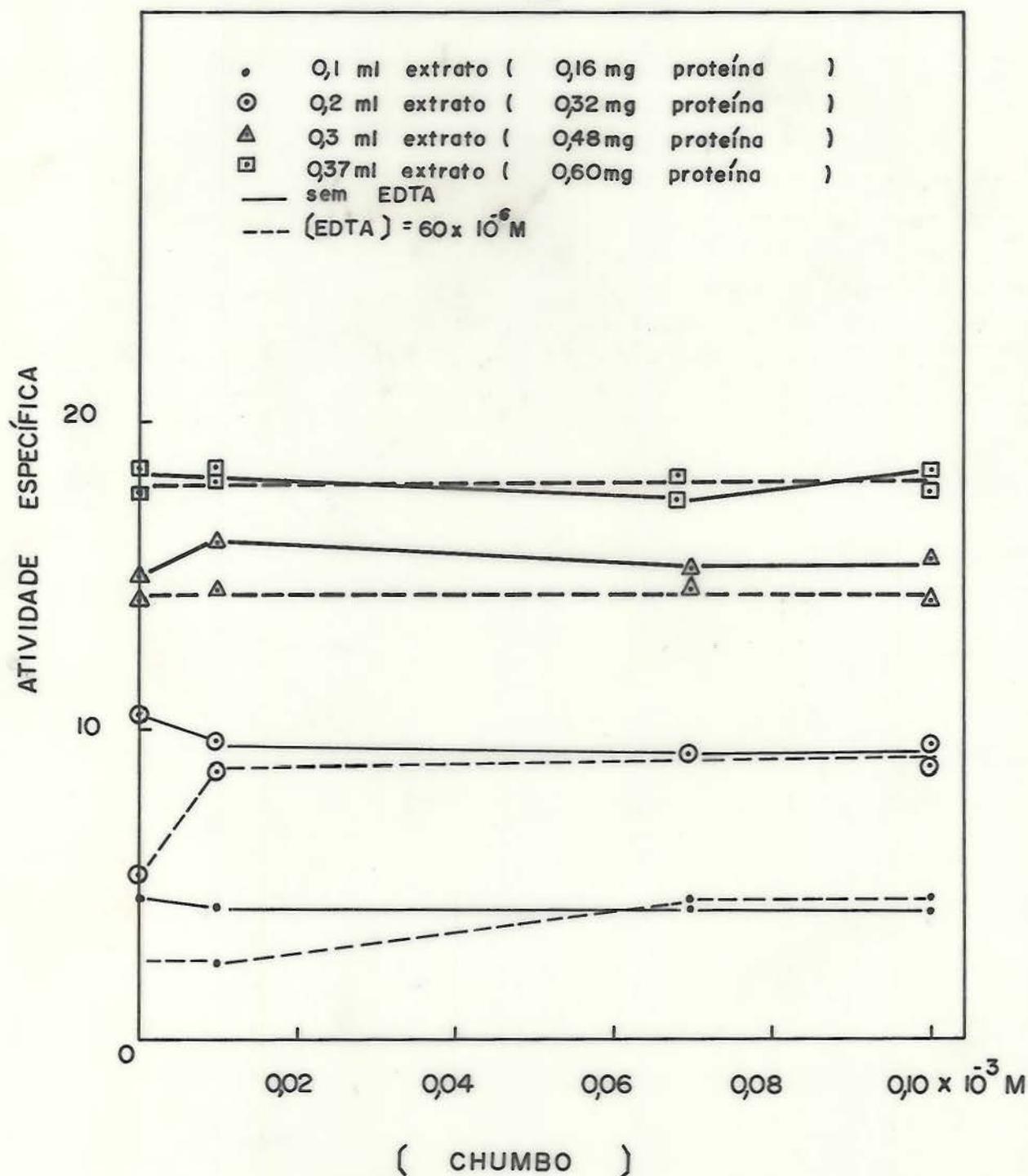


Figura 36 - Inibição com Pb^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA.
 Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h ($37^{\circ}C$)

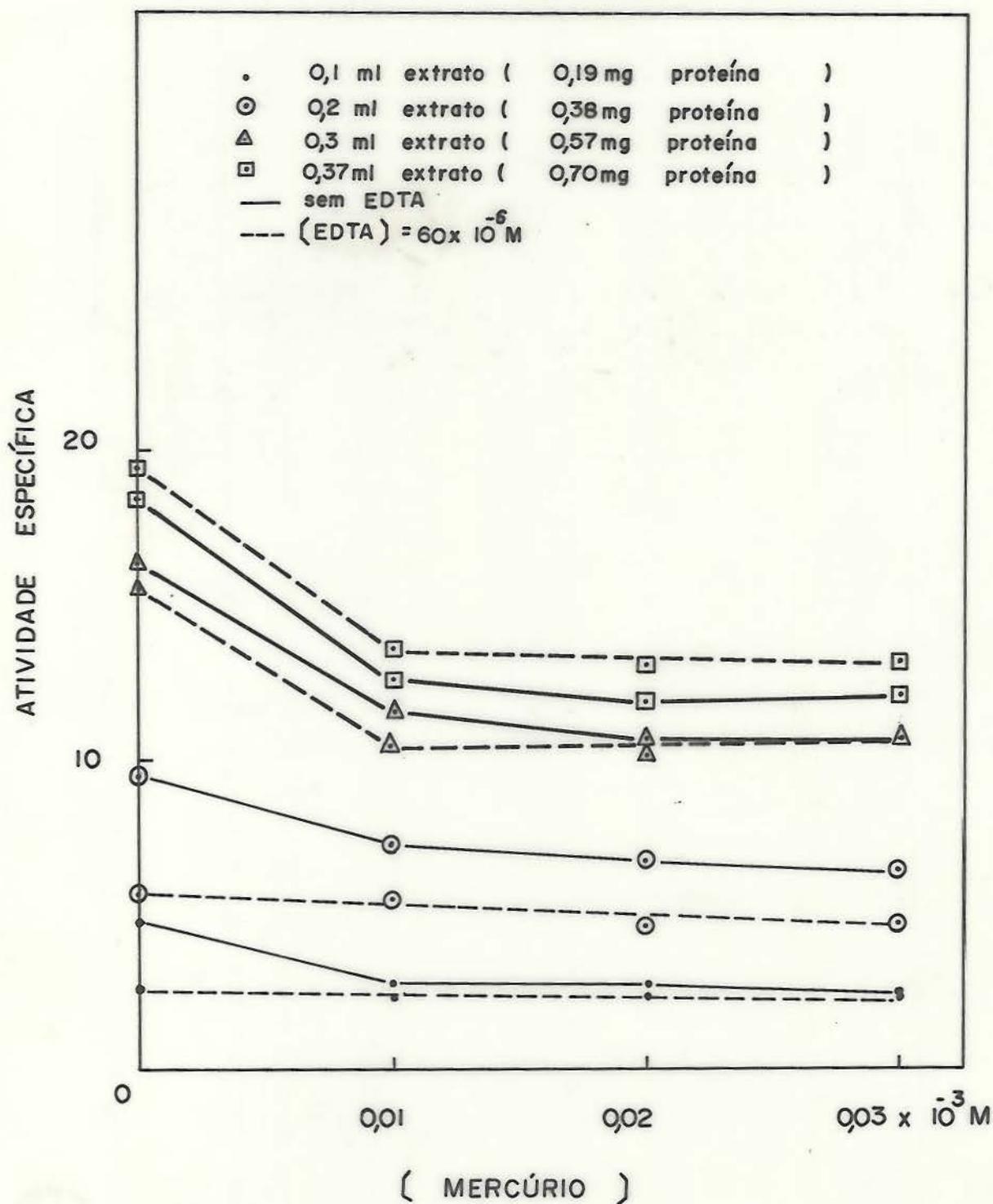


Figura 37 - Inibição com Hg^{2+} em diversas concentrações de extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton e recuperação da atividade com EDTA.

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

3.2.5 - Recuperação da atividade enzimática quando inibida simultaneamente por íons metálicos, através de DTT

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar, "in vitro", o comportamento da enzima estudada de plâncton, quando no meio atuam em conjunto, os principais íons causadores de inibição. Com isto, tentou-se observar possíveis efeitos sinérgicos.

A solução mista 1 foi preparada de modo que cada um dos cinco íons contribuisse com 1/5 de sua toxicidade. Assim, a solução mista tem a seguinte contribuição:

$0,6 \mu\text{M Hg}^{2+}$, $1,2 \mu\text{M Cu}^{2+}$, $3,6 \mu\text{M Cd}^{2+}$, $3,6 \mu\text{M Zn}^{2+}$, $20 \mu\text{M Pb}^{2+}$

Observou-se que os íons, se atuassem nestas concentrações individualmente, não causariam inibição da atividade da enzima de 50%. A Figura 38 mostra o efeito inibidor coletivo e que ficou em torno de 43%. Constatou-se em todas as concentrações testadas a plena recuperação da δ -ALA-D com DTT 3×10^{-3} M.

Para preparar a solução mista 2 utilizou-se cada íon como se ele estivesse agindo individualmente e causando em torno de 50% de inibição. Neste caso, as contribuições foram:

$3 \mu\text{M Hg}^{2+}$, $6 \mu\text{M Cu}^{2+}$, $18 \mu\text{M Co}^{2+}$, $18 \mu\text{M Zn}^{2+}$ e $100 \mu\text{M Pb}^{2+}$

Observou-se que a inibição ocorrida utilizando-se a solução mista 2 foi de 85% (Figura 39). Testando na mesma oportunidade os íons individualmente obteve-se os seguintes resultados:

Hg^{2+} : 53%

Cu^{2+} : 40%

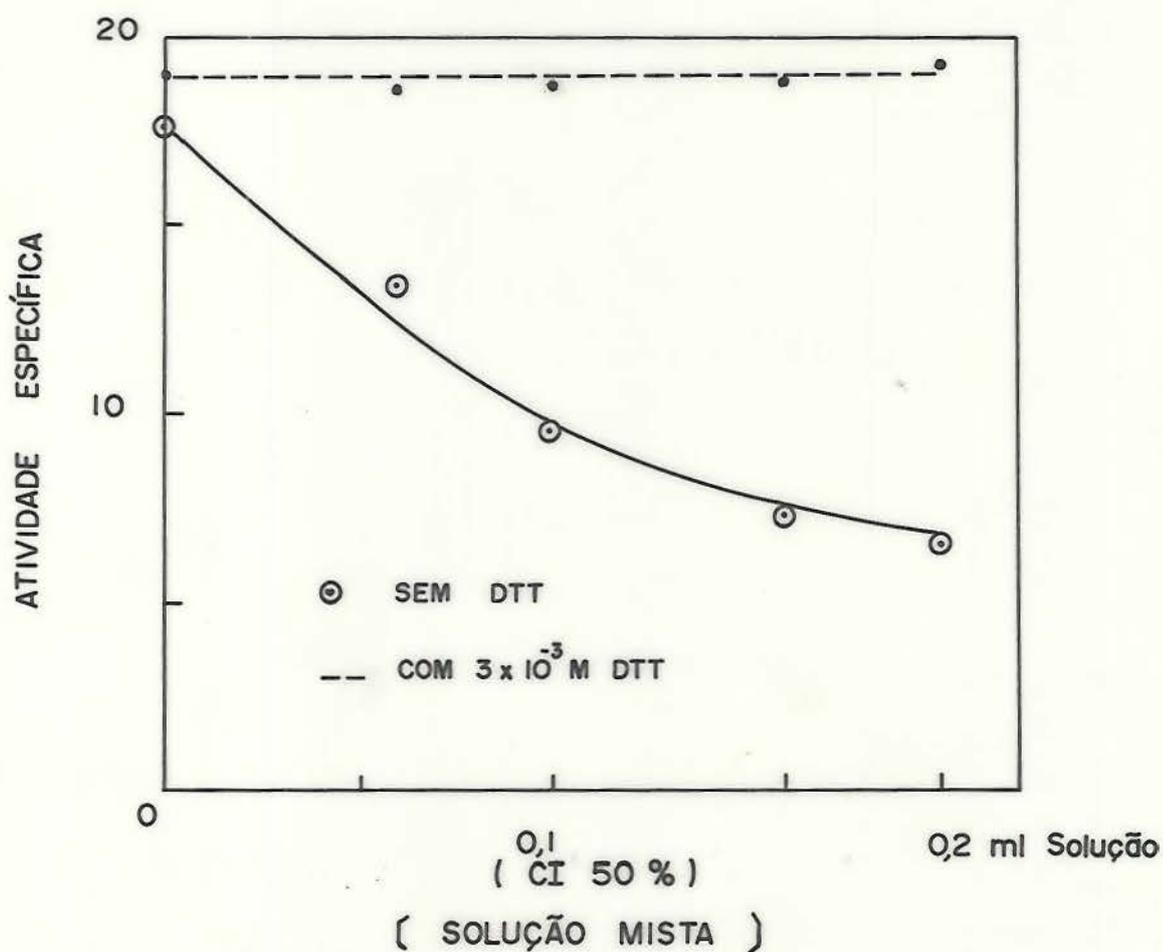


Figura 38 - Inibição metálica do extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton com Solução Mista 1 contendo Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} .

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

Recuperação da atividade enzimática com DTT.

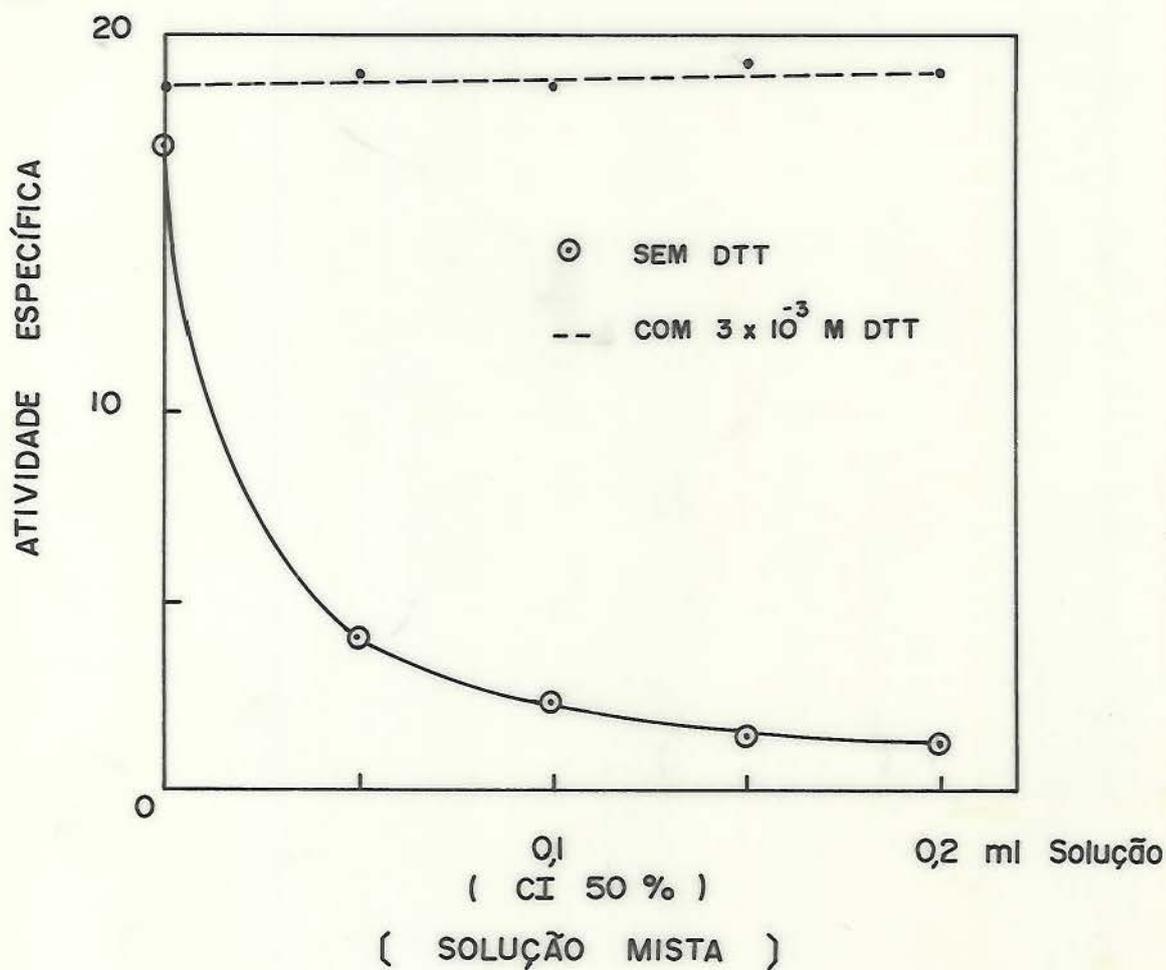


Figura 39 - Inibição metálica do extrato enzimático de δ -ALA desidratase de plâncton com Solução Mista 2 de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} .
 Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)
 Recuperação da atividade enzimática com DTT.

Cd ²⁺ :	55%
Zn ²⁺ :	58%
Pb ²⁺ :	58%

3.3 - Identificação de cofatores metálicos

A inibição causada pelo EDTA e pelo DTT indicou que, possivelmente, a enzima requer um cofator metálico. Se o EDTA em excesso causou inibição enzimática ao sequestrar o cofator, seria de se esperar que a adição do cofator, restaurasse novamente a atividade da enzima, desde que em quantidade suficiente para suspender a ação do quelante.

Se o extrato enzimático da δ -ALA desidratase de plâncton for inibido, por exemplo, a 95% com $0,45 \times 10^{-3} \text{M}$ de EDTA em relação a um controle de 100%, sem EDTA, esta inativação conseguiu ser recuperada pela adição de Zn²⁺, Cd²⁺ e Ni²⁺ (Figura 40).

Na concentração de aproximadamente $4 \times 10^{-4} \text{M}$ de Zn²⁺, Cd²⁺ e Ni²⁺, obteve-se regeneração total da atividade enzimática, seguida de brusca queda, indicando que a partir desta concentração o metal agiria de maneira tóxica.

3.4 - Teste de exposição de amostras de plâncton a Cd²⁺, variando o tempo de exposição e a concentração de plâncton

Antes de efetuar o teste de exposição em campo, julgou-se necessário examinar, em laboratório, algumas variáveis que pudessem afetar o teste.

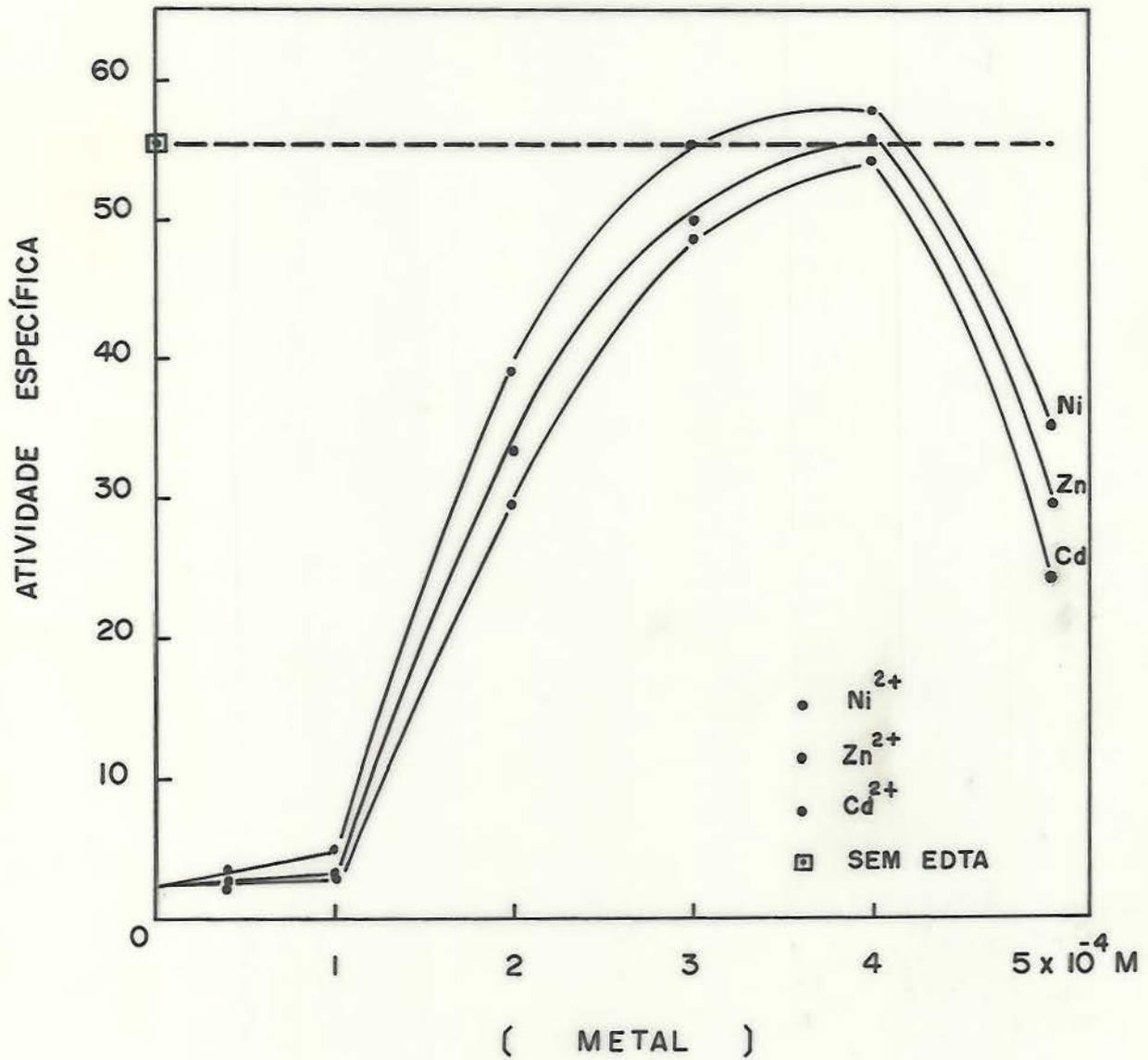


Figura 40 - Recuperação da atividade da δ -ALA desidratase de plâncton, inibida por EDTA ($0,45 \times 10^{-3} \text{ M}$), através de concentrações crescentes de Ni^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} .

Atividade específica: nmois PBG/mg proteína/h (37°C)

Além do efeito do tempo de exposição sobre a incorporação do metal e sua ação sobre a atividade de δ -ALA-D, a concentração de plâncton do meio de exposição poderia ter alguma influência.

Usando condições controladas foram executados ensaios examinando-se estes dois parâmetros.

3.4.1 - Tempo de exposição

O ensaio foi realizado para verificar-se qual seria a incorporação do metal Cd^{2+} no plâncton, ao longo do tempo de exposição.

O material planctônico coletado entre as redes de malhas de $25\mu m$ e $112\mu m$ era levado ao laboratório, lavado com água deionizada por três vezes para solubilizar substâncias que pudessem estar absorvidas no plâncton e após era centrifugado à baixa rotação (480 g) para fazer flotar materiais mais leves que o plâncton.

Escolhida a diluição de 2/9 para o plâncton foram expostos à solução de Cd^{2+} de 10 ppb, 10 ml de suspensão de plâncton diluídas até o volume final de 45 ml pelos tempos de 5 seg, 20 seg, 40 seg, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h. Filtrou-se em filtros de membrana (KHUMMONGKNOL et al, 1982) recolhendo o material planctônico, que era armazenado para posterior determinação do metal incorporado. A solução aquosa filtrada também era submetida à dosagem do metal.

Pela Figura 41, observa-se uma rápida fixação do metal no plâncton até aproximadamente 1 min, mantendo-se constante a concentração de metal no plâncton pelo tempo restante, até 5 h.

Na solução filtrada observou-se o decréscimo da concentração de metal na solução ao mesmo tempo que ocorre a fixação pelo plâncton. Este decréscimo prolonga-se até 15 min podendo indicar que além do plâncton, o recipiente de vidro também fixaria o metal.

3.4.2 - Efeito da concentração de plâncton

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar-se a influência da concentração de plâncton no meio estando presente, neste caso, um único íon metálico (Cd^{2+}), (Figura 42).

O material planctônico utilizado no ensaio foi o coletado entre as redes de malhas de $25\ \mu\text{m}$ e $112\ \mu\text{m}$, conforme procedimento descrito no item 2.2.1.

Paralelamente ao teste realizado, trabalhou-se com um conjunto de amostras controle para se poder avaliar a quantidade de metal intrínseco no plâncton e a quantidade de metal que adicionalmente seria retido pelos microorganismos.

As amostras de plâncton chegavam ao laboratório e eram lavadas com água deionizada para retirar metais ou substâncias que pudessem ser solubilizadas. Após eram centrifugadas à baixa rotação de 480 g.

Este procedimento era repetido por três vezes, sendo que

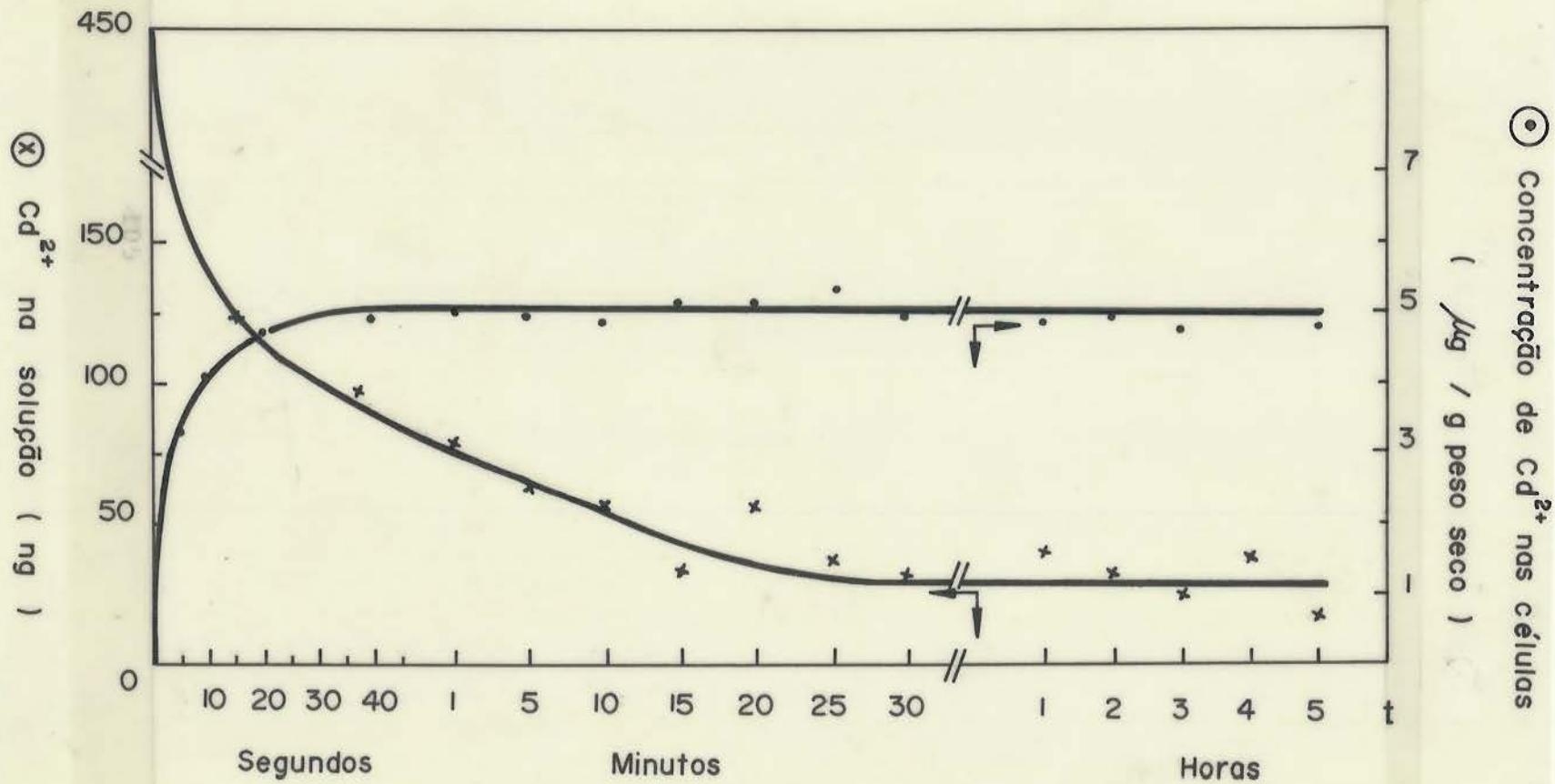


Figura 41- Incorporação do metal Cd²⁺, em plâncton, ao longo do tempo de exposição.

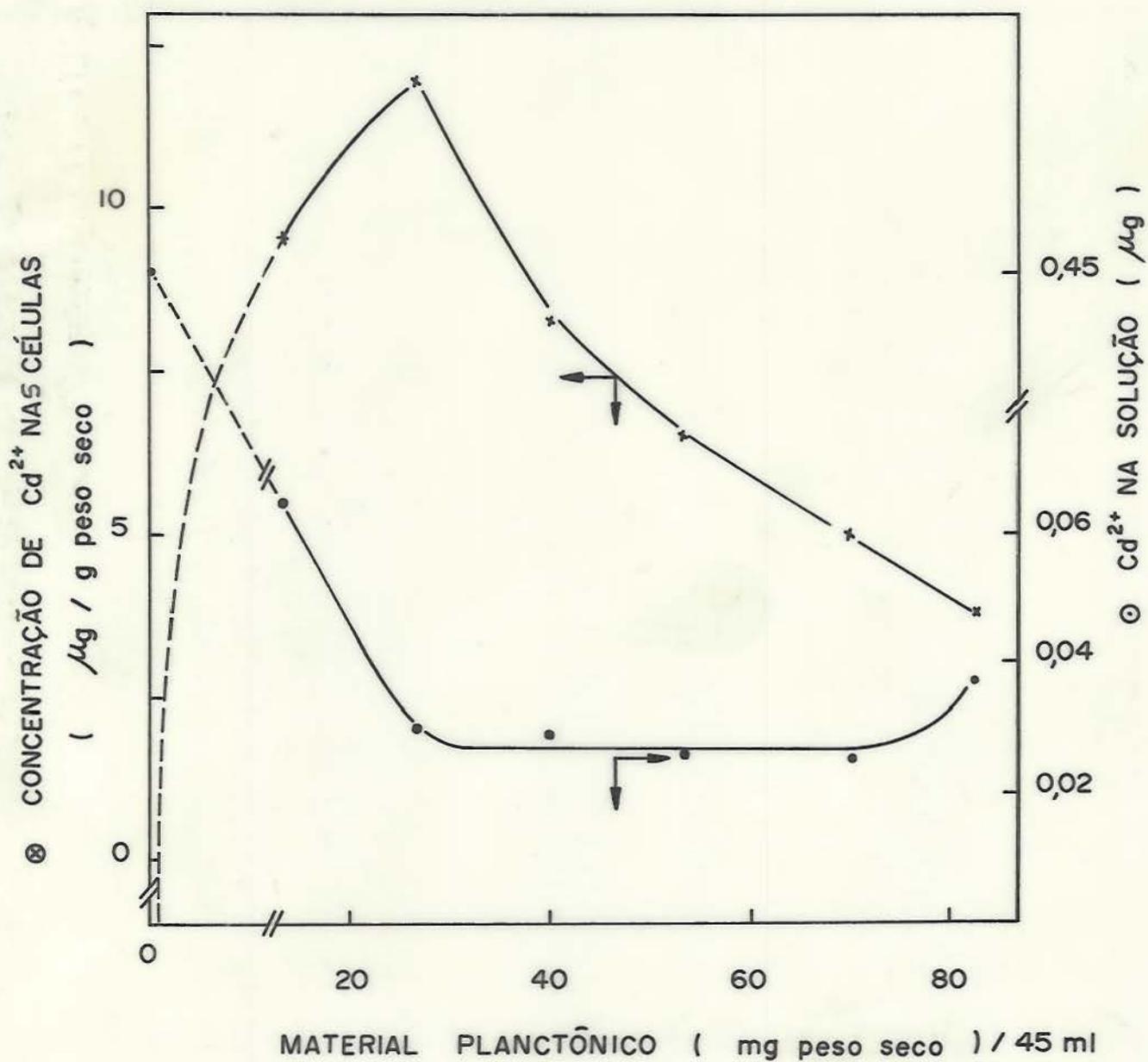


Figura 42 - Incorporação do metal Cd^{2+} , em diferentes concentrações de plâncton.

ao final eram pipetados diferentes volumes de amostra em copos completando-se seu volume até 45 ml com água deionizada (controle) ou com solução do íon Cd^{2+} a 10 ppb finais (ensaio propriamente dito). O tempo de exposição foi fixado em 5 minutos, quando já se atingiu uma incorporação constante do íon (vide 3.4.1) como mostra a Figura 41.

3.5 - Teste piloto numa amostragem em campo

Dos testes realizados em laboratório observou-se que a enzima δ -ALA-D respondeu suficientemente bem a inibições e reativações "in vitro", mostrando-se desta forma, indicada para o estudo que se pretendia realizar.

O objetivo do teste piloto era verificar, em campo, a possibilidade de utilizar a δ -ALA-D de plâncton como indicadora da presença de metais pesados na água.

Para isto foi definido o parâmetro Δ % (atividade diferencial). Considerando como 100% a atividade da enzima com adição do quelante (DTT), a diferença percentual entre esta atividade e a obtida conforme a técnica padrão (sem quelante), representaria este parâmetro Δ %.

A presença de metais pesados poluentes, poderia, então, ser avaliada por um teste enzimático, quantificando-se esta presença pelo Δ %, calculado através da porção da atividade da δ -ALA-D de plâncton recuperável por quelante.

3.5.1 - Coleta e análise de amostras

Para a efetivação deste teste piloto foram coletadas a-

mostras de plâncton entre as redes de $25\mu\text{m}$ e $112\mu\text{m}$ conforme descrito em 2.2.1, de lagos situados na cidade de Porto Alegre e lagoas de estabilização situadas em municípios vizinhos, totalizando 15 locais de amostragens. Destes mesmos locais foram recolhidas amostras da água, anotando-se dados de pH da água, data da coleta e temperaturas do ar e da água.

As amostras coletadas de cada local eram conservadas em isopor com gelo e trazidas no prazo máximo de 2 h para o laboratório. A seguir, anotava-se o volume trazido e retirava-se uma amostra para determinação do peso seco (24-48h em estufa a $60-65^{\circ}\text{C}$ até peso constante). O material restante era então processado mediante metodologia já descrita (ver item 2.2.2) sendo retiradas, em cada etapa, amostras para posterior determinação de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} . O fluxograma de obtenção das amostras encontra-se na Figura 7, item 2.3.

As amostras e águas coletadas eram fixadas com ácido nítrico p.a, congeladas, sendo posteriormente submetidas à digestão e determinação dos metais em espectrofotometria de absorção atômica.

Hg^{2+} não foi determinado devido à dificuldade na obtenção da quantidade de amostra necessária para atingir o limite de detecção do metal no espectrofotômetro.

A seguir, com o teste enzimático verificava-se a atividade da enzima δ -ALA-D de plâncton com e sem a adição de quelante. A escolha de DTT em detrimento ao EDTA como agente sequestrante deveu-se ao fato de sua eficiente atuação na recuperação das atividades enzimáticas quando inibido em laboratório.

É importante recordar que a diferença entre estas atividades expressa pelo $\Delta\%$ pode espelhar tanto o efeito isolado de cada metal como o efeito somado dos diversos metais porventura presentes no meio.

3.5.2 - Aplicação do teste estatístico não paramétrico de Spearman

Para cada local amostrado foram determinadas as concentrações de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} nas diversas frações, bem como a atividade específica e o $\Delta\%$ (Tabela 1).

Na tentativa de avaliar a significância dos resultados efetuou-se vários testes de correlação com o objetivo de obter-se o coeficiente de Spearman (r_s), (SIEGEL, 1975).

Para efeito de estudo os metais foram expressos em concentrações molares examinando-os individualmente e em conjunto. Na análise conjunta procedeu-se de duas maneiras: primeiramente, fez-se o simples somatório das concentrações molares dos metais a fim de verificar a significância de sua atuação conjunta (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Em segundo lugar procurou-se equiparar os metais entre si quanto ao seu poder relativo de inibição enzimático. A intensidade do efeito inibitório de metais varia de metal para metal e é expresso quantitativamente pelos respectivos I_{50} (ver item 3.1.10). Desta forma, tomou-se o I_{50} de um dos metais, por exemplo, o Cu^{2+} como referência (1,0), calculou-se a proporção relativa de efeito inibitório em cada caso $\left(\frac{I_{50} \text{ referência}}{I_{50} \text{ metal}}\right)$ e com este coeficiente a concentração molar do respectivo metal.

Assim as concentrações corrigidas eram tomadas, quanto ao seu efeito, como se fossem do metal referência (Tabelas 8, 9, 10, 11 12 e 13).

Os Quadros 2, 3 e 4 mostram as correlações obtidas entre as diversas frações bem como os respectivos coeficientes de Spearman (r_s).

No Quadro 2 calculou-se as correlações existentes, utilizando-se as concentrações molares dos metais individuais. Para os metais Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} a relação entre A_I e $\Delta\%$ indica que a presença dos metais na água está relacionada com a percentagem de recuperação da δ -ALA-D com o quelante ($\Delta\%$).

As correlações existentes entre $A_F - \text{SED}_1$, $A_F - \text{SED}_2$ e $\text{SED}_1 - \text{SED}_2$, para os quatro metais, eram esperadas uma vez que havendo ocorrência do metal na amostra filtrada este deve se distribuir entre as frações subsequentes.

As correlações observadas nos Quadros 3 e 4, onde são analisados o somatório das concentrações molares dos metais e o somatório das concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição - I_{50} , respectivamente, mostram as relações existentes entre $A_I - \Delta\%$ e $A_F - \Delta\%$, indicando que a percentagem de recuperação enzimática está relacionada com a presença dos metais em A_I e A_F . Observa-se também a relação entre a presença de metais no SED_1 e no SED_2 indicando a fixação particulada dos metais.

3.5.3 - Caracterização dos pontos de amostragem e dos elementos

Os locais selecionados para a amostragem foram designados por números a fim de manter o sigilo industrial necessário à realização do experimento. Contudo, os lagos de Porto Alegre podem ser discriminados.

Os números dos lagos e lagoas amostradas (Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) referem-se à:

L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 - Lagoas industriais; L12, L13, L14, L15 - lagos de Porto Alegre (Redenção, Redenção, Viaduto dos Açorianos e Redenção, respectivamente).

Os metais estudados, chamados de elementos, também foram designados por números (Tabela 1) e representam:

- 01 - Zn
- 02 - Cd
- 03 - Pb
- 04 - Cu
- 05 - Ni
- 06 - Hg

O tratamento estatístico envolveu somente os elementos Zn, Cd, Pb e Cu (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Tabela 1

Concentração dos metais Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas diversas amostras obtidas pelo fracionamento do material planctônico dos 15 pontos de amostragens, bem como a atividade específica da δ -ALA-D em cada ponto e seu Δ %.

(continua)

Nro. da lagoa	Nro. do elem.	AI ($\mu\text{g}/1$)	Ai 200 l (μg)	AF ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	CENTRIFUGADO		HOMOGENEIZADO		Ae		Δ %
					SN ₁ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	SED ₁ ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	SN ₂ ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)	SED ₂ ($\mu\text{g}/5\text{ml}$)	-DTT	+DTT	
01	01	250,00	50000	260,000	80,0000	98,0000	175,6000	4,4200	28,61	31,25	8,45
	02	0,65	130	0,444	0,0440	0,1140	0,0956	0,0484			
	03	14,30	2860	8,200	2,2400	2,8600	3,4700	1,0690			
	04	18,30	3660	41,920	8,4200	11,5800	14,1500	0,8000			
	05	5,10	1020	26,840	4,8800	15,4600	2,3200	0,5890			
	06	5,00	1000								
02	01	80,00	16000	92,000	40,0000	50,0000	64,3100	2,2300	13,26	14,83	10,59
	02	0,30	60	0,612	0,1620	0,1120	0,0816	0,0372			
	03	10,40	2080	7,020	1,9200	3,9200	6,1100	0,7250			
	04	8,90	1780	12,280	6,4700	7,1200	8,6400	0,5860			
	05	4,70	940	87,280	10,410	24,9600	1,2100	1,6370			
	06	5,10	1020								

(continua)

Nro. da lagoa	Nro. do elem.	AI ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Ai 200 l(μg)	AF ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	CENTRIFUGADO		HOMOGENEIZADO		Ae		Δ %
					SN ₁ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	SED ₁ ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	SN ₂ ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)	SED ₂ (g/5ml)	-DTT	+DTT	
03	01	40,00	8000	62,000	5,0000	44,0000	57,2500	2,1300	18,76	18,76	0,00
	02	0,29	58	0,290	0,0300	0,0525	0,0470	0,0150			
	03	9,42	1884	3,830	0,6400	1,6700	1,7600	0,1130			
	04	9,10	1820	13,340	1,3100	6,7700	5,1000	2,5100			
	05	8,00	1600	5,340	1,0000	7,6700	1,2100	0,0502			
	06	11,00	2200								
04	01	40,00	8000	40,000	6,0000	17,0000	21,9600	0,9770	15,49	16,09	3,73
	02	0,22	44	0,218	0,0040	0,0410	0,0180	0,0098			
	03	9,10	1820	4,480	0,3790	2,1300	2,6700	0,0969			
	04	7,30	1460	5,980	1,0500	3,7300	4,9500	0,2400			
	05	1,50	300	14,820	0,6600	3,9800	1,4300	0,0249			
	06	5,60	1120								
05	01	60,00	12000	36,000	9,0000	21,0000	34,4800	2,6100	8,32	9,20	9,56
	02	5,39	1078	0,177	0,0020	0,0370	0,0283	0,0081			
	03	19,20	3840	1,830	0,3490	0,8800	0,9100	0,1350			
	04	10,87	2174	4,320	1,3800	2,8900	3,1200	0,2460			
	05	23,30	4660	3,200	0,5790	0,3800	1,2600	0,5070			
	06	6,00	1200								

(continua)

Nro. da lagoa	Nro. do elem.	AI ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Ai 200 l (μg)	AF ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	CENTRIFUGADO		HOMOGENEIZADO		Ae		Δ %
					SN ₁ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	SED ₁ ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	SN ₂ ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)	SED ₂ ($\mu\text{g}/5\text{ml}$)	-DTT	+DTT	
06	01	310,00	62000	32,000	6,0000	13,0000	23,2000	3,8400	3,68	3,89	5,40
	02	0,21	42	0,058	0,0010	0,0110	0,0200	0,0074			
	03	8,00	1600	2,612	0,1600	1,3700	1,7000	0,1328			
	04	11,37	2274	5,160	0,7090	1,3800	2,8900	0,2320			
	05	11,10	2220	14,520	0,2200	0,1300	0,7120	0,7400			
	06	7,50	1500								
07	01	80,00	16000	26,000	10,0000	18,0000	27,5400	2,6400	15,48	17,14	9,68
	02	0,27	54	0,124	0,0010	0,0940	0,0197	0,0060			
	03	7,10	1420	1,690	0,1600	1,2300	1,1370	0,1136			
	04	8,53	1706	3,040	1,3400	2,4300	3,7510	0,3120			
	05	10,20	2040	9,940	0,7300	2,4900	0,9970	0,1520			
	06	2,80	560								
08	01	70,00	14000	20,400	7,0000	15,0000	23,6600	1,0000	3,55	3,98	10,81
	02	0,19	38	0,159	0,0020	0,0530	0,0338	0,0068			
	03	6,80	1360	2,720	0,1590	1,7700	1,6900	0,1360			
	04	8,29	1658	3,960	0,7090	2,3600	2,6500	0,1632			
	05	19,00	3800	2,500	0,8500	1,4000	0,9460	0,0944			
	06	3,10	620								

(continua)

Nro. da lagoa	Nro. do elem.	AI ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Ai 200 l (μg)	AF ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	CENTRIFUGADO		HOMOGENEIZADO		Ae		Δ %
					SN ₁ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	SED ₁ ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	SN ₂ ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)	SED ₂ ($\mu\text{g}/5\text{ml}$)	-DTT	+DTT	
09	01	15500,00	3100000	12000,000	504,6000		212,7300	9394,0000			
	02	11,70	2340	14,700	0,4350		0,1780	14,6700			
	03	130,59	26118	1864,600	2,7900		17,8000	667,5000	1,22	6,83	82,14
	04	21620,00	4324000	29564,000	613,0000		4618,2000	17357,6000			
	05	29300,00	5860000	18266,000	1600,0000		292,7300	12873,0000			
	06	1,70	340		0,5800						
10	01	160,00	32000	119,500	16,8700	121,3000	7,0000	44,3600			
	02	0,91	182	0,083	0,1070	0,0314	0,0070	0,0100			
	03	28,73	5746	5,806	2,7900	5,7900	0,3540	2,0650	18,95	20,31	6,70
	04	17,00	3400	26,000	2,0000	15,5000	4,6000	10,4900			
	05	19,00	3800	6,530	2,6100	7,3100	0,8400	2,6700			
	06	5,20	1040		0,2890						
11	03	30,87	6174	4,000	2,9300	2,8900	0,2050	1,1780			
	04	9,40	1880	14,670	2,2400	14,4500	1,0000	5,3200	4,98	5,56	10,43
	05	17,70	3540	6,200	0,5460	5,7300	1,3700	2,3300			
	06	6,30	1260		0,4500						

(conclusão)

Nro. da lagoa	Nro. do elem.	AI ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Ai 200 l (μg)	AF ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	CENTRIFUGADO		HOMOGENEIZADO		Ae		Δ %
					SN ₁ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	SED ₁ ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)	SN ₂ ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)	SED ₂ ($\mu\text{g}/5\text{ml}$)	-DTT	+DTT	
12	01	30,00	6000	812,500	37,5000	375,0000	56,2500	206,2500			
	02	0,11	22	0,375	0,0010	0,2344	0,0375	0,5718	17,00	17,18	1,04
	03	1,60	320	26,875	2,0000	10,2187	0,7500	5,3437			
	04	2,40	480	235,000	3,2500	48,8437	7,0000	25,7812			
13	01	30,00	6000	130,000	6,0000	154,5000	22,0000	142,5000			
	02	0,00	0,2	1,790	0,0002	0,4815	0,0290	0,4790	31,83	34,04	6,49
	03	2,00	400	32,100	1800	34,0500	0,8900	27,1000			
	04	2,60	520	32,700	5200	38,5050	2,1500	14,0600			
14	01	20,00	4000	280,000	8,0000	225,0000	11,0000	130,0000			
	02	0,00	0,2	0,370	0,0002	0,3300	0,0050	0,1825	6,68	6,94	3,74
	03	3,80	760	31,700	0,9400	50,1000	0,5400	22,3000			
	04	3,90	780	35,600	0,9200	31,5750	1,5800	13,9900			
15	01	20,00	4000	100,000	6,0000	124,5000	8,0000	50,0000			
	02	4,22	844	3,720	0,4380	0,6600	0,2300	0,1885	18,47	18,92	2,38
	03	1,60	320	20,700	0,1200	14,8350	0,4900	6,3500			
	04	2,60	520	15,200	0,9200	15,9450	0,8200	7,1600			

Tabela 2

Concentração molar de metais [Me] da fração A_1 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$3,82 \times 10^{-6}$	$1,22 \times 10^{-6}$	$6,12 \times 10^{-7}$	$6,11 \times 10^{-7}$	$9,18 \times 10^{-7}$
Cd	$5,78 \times 10^{-9}$	$2,67 \times 10^{-9}$	$2,58 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-9}$	$4,79 \times 10^{-8}$
Pb	$6,90 \times 10^{-8}$	$5,02 \times 10^{-8}$	$4,55 \times 10^{-8}$	$4,39 \times 10^{-8}$	$9,27 \times 10^{-8}$
Cu	$2,88 \times 10^{-7}$	$1,40 \times 10^{-7}$	$1,43 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-7}$	$1,71 \times 10^{-7}$
Σ	$4,18 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-6}$	$8,03 \times 10^{-7}$	$7,72 \times 10^{-7}$	$1,23 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$4,74 \times 10^{-6}$	$1,22 \times 10^{-6}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$2,37 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-6}$
Cd	$1,87 \times 10^{-9}$	$2,40 \times 10^{-9}$	$1,69 \times 10^{-9}$	$1,04 \times 10^{-7}$	$8,09 \times 10^{-9}$
Pb	$3,86 \times 10^{-8}$	$3,43 \times 10^{-8}$	$3,28 \times 10^{-8}$	$6,30 \times 10^{-7}$	$1,39 \times 10^{-7}$
Cu	$1,79 \times 10^{-7}$	$1,34 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-7}$	$3,40 \times 10^{-4}$	$2,67 \times 10^{-7}$
Σ	$4,96 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-6}$	$5,78 \times 10^{-4}$	$2,86 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$9,18 \times 10^{-7}$	$4,59 \times 10^{-7}$	$4,59 \times 10^{-7}$	$3,06 \times 10^{-7}$	$3,06 \times 10^{-7}$
Cd	$7,17 \times 10^{-9}$	$9,78 \times 10^{-10}$	0,0	0,0	$3,75 \times 10^{-8}$
Pb	$1,49 \times 10^{-7}$	$7,72 \times 10^{-9}$	$9,65 \times 10^{-9}$	$1,83 \times 10^{-8}$	$7,72 \times 10^{-9}$
Cu	$1,48 \times 10^{-7}$	$3,78 \times 10^{-8}$	$4,09 \times 10^{-8}$	$6,14 \times 10^{-8}$	$4,09 \times 10^{-8}$
Σ	$1,22 \times 10^{-6}$	$5,05 \times 10^{-7}$	$5,09 \times 10^{-7}$	$3,86 \times 10^{-7}$	$3,92 \times 10^{-7}$

Tabela 3

Concentração molar de metais [Me] da fração AF, das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$3,98 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-5}$	$9,48 \times 10^{-6}$	$6,12 \times 10^{-6}$	$5,51 \times 10^{-6}$
Cd	$3,91 \times 10^{-0}$	$5,44 \times 10^{-8}$	$2,58 \times 10^{-8}$	$1,94 \times 10^{-8}$	$1,57 \times 10^{-8}$
Pb	$3,96 \times 10^{-7}$	$3,39 \times 10^{-7}$	$1,85 \times 10^{-7}$	$2,16 \times 10^{-7}$	$8,83 \times 10^{-8}$
Cu	$6,6 \times 10^{-6}$	$1,93 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$9,41 \times 10^{-7}$	$6,80 \times 10^{-7}$
Σ	$4,68 \times 10^{-5}$	$1,64 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-5}$	$7,30 \times 10^{-6}$	$6,30 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$4,89 \times 10^{-6}$	$3,98 \times 10^{-6}$	$3,12 \times 10^{-6}$	$1,83 \times 10^{-3}$	$1,83 \times 10^{-5}$
Cd	$5,16 \times 10^{-9}$	$1,10 \times 10^{-8}$	$1,41 \times 10^{-8}$	$1,31 \times 10^{-6}$	$7,38 \times 10^{-9}$
Pb	$1,26 \times 10^{-7}$	$8,16 \times 10^{-8}$	$1,31 \times 10^{-7}$	$9,00 \times 10^{-5}$	$2,80 \times 10^{-7}$
Cu	$8,12 \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-7}$	$6,23 \times 10^{-7}$	$4,65 \times 10^{-3}$	$4,10 \times 10^{-6}$
Σ	$5,83 \times 10^{-6}$	$4,55 \times 10^{-6}$	$3,9 \times 10^{-6}$	$6,57 \times 10^{-3}$	$2,27 \times 10^{-5}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$9,15 \times 10^{-6}$	$1,24 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-5}$	$4,28 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-5}$
Cd	$5,25 \times 10^{-9}$	$3,34 \times 10^{-8}$	$1,59 \times 10^{-7}$	$3,29 \times 10^{-8}$	$3,31 \times 10^{-7}$
Pb	$1,93 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-6}$	$1,55 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$9,99 \times 10^{-7}$
Cu	$2,31 \times 10^{-6}$	$3,70 \times 10^{-5}$	$5,14 \times 10^{-6}$	$5,60 \times 10^{-6}$	$2,39 \times 10^{-6}$
Σ	$1,16 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-4}$	$2,67 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-5}$

Tabela 4

Concentração molar de metais [Me] da fração SN_1 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$1,22 \times 10^{-5}$	$6,12 \times 10^{-6}$	$7,65 \times 10^{-7}$	$9,18 \times 10^{-7}$	$1,38 \times 10^{-6}$
Cd	$3,91 \times 10^{-9}$	$1,44 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-9}$	$3,56 \times 10^{-10}$	$1,78 \times 10^{-10}$
Pb	$1,08 \times 10^{-7}$	$9,27 \times 10^{-8}$	$3,09 \times 10^{-8}$	$1,83 \times 10^{-8}$	$1,68 \times 10^{-8}$
Cu	$1,32 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-7}$	$1,65 \times 10^{-7}$	$2,17 \times 10^{-7}$
Σ	$1,36 \times 10^{-5}$	$7,25 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-6}$	$1,61 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$9,18 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$7,72 \times 10^{-5}$	$2,58 \times 10^{-6}$
Cd	$8,90 \times 10^{-11}$	$8,9 \times 10^{-11}$	$1,78 \times 10^{-11}$	$3,87 \times 10^{-8}$	$9,52 \times 10^{-9}$
Pb	$7,72 \times 10^{-9}$	$7,72 \times 10^{-9}$	$7,67 \times 10^{-9}$	$1,35 \times 10^{-7}$	$1,35 \times 10^{-7}$
Cu	$1,11 \times 10^{-7}$	$2,11 \times 10^{-7}$	$1,11 \times 10^{-7}$	$9,65 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-7}$
Σ	$1,04 \times 10^{-6}$	$1,75 \times 10^{-6}$	$1,19 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-4}$	$3,04 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$1,06 \times 10^{-6}$	$5,73 \times 10^{-6}$	$9,18 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-6}$	$9,44 \times 10^{-7}$
Cd	$5,60 \times 10^{-9}$	$8,9 \times 10^{-11}$	$1,78 \times 10^{-11}$	$1,78 \times 10^{-11}$	$3,90 \times 10^{-8}$
Pb	$4,48 \times 10^{-7}$	$9,65 \times 10^{-8}$	$8,69 \times 10^{-9}$	$4,54 \times 10^{-8}$	$5,79 \times 10^{-9}$
Cu	$3,52 \times 10^{-7}$	$5,11 \times 10^{-7}$	$8,18 \times 10^{-8}$	$1,45 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{-7}$
Σ	$1,86 \times 10^{-6}$	$6,33 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-6}$

Tabela 5

Concentração molar de metais [Me] da fração SED_1 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$1,0 \times 10^{-4}$	$5,12 \times 10^{-5}$	$4,51 \times 10^{-5}$	$1,74 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-5}$
Cd	$6,79 \times 10^{-8}$	$6,67 \times 10^{-8}$	$3,13 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-8}$	$2,20 \times 10^{-8}$
Pb	$9,25 \times 10^{-7}$	$1,27 \times 10^{-6}$	$5,40 \times 10^{-7}$	$6,89 \times 10^{-7}$	$2,84 \times 10^{-7}$
Cu	$1,22 \times 10^{-5}$	$7,51 \times 10^{-6}$	$7,14 \times 10^{-6}$	$3,93 \times 10^{-6}$	$3,05 \times 10^{-6}$
Σ	$1,13 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-5}$	$5,28 \times 10^{-5}$	$2,20 \times 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,84 \times 10^{-5}$	$1,54 \times 10^{-5}$		$1,24 \times 10^{-4}$
Cd	$6,56 \times 10^{-9}$	$5,60 \times 10^{-8}$	$3,16 \times 10^{-8}$		$1,87 \times 10^{-8}$
Pb	$4,43 \times 10^{-7}$	$3,98 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$		$1,87 \times 10^{-6}$
Cu	$1,45 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-6}$		$1,63 \times 10^{-5}$
Σ	$1,52 \times 10^{-5}$	$2,14 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^{-5}$		$1,42 \times 10^{-4}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$7,11 \times 10^{-6}$	$3,84 \times 10^{-4}$	$1,58 \times 10^{-4}$	$2,31 \times 10^{-4}$	$1,28 \times 10^{-4}$
Cd	$3,75 \times 10^{-8}$	$1,40 \times 10^{-7}$	$2,87 \times 10^{-7}$	$1,97 \times 10^{-7}$	$3,93 \times 10^{-7}$
Pb	$9,33 \times 10^{-7}$	$3,30 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-5}$	$4,79 \times 10^{-6}$
Cu	$1,52 \times 10^{-5}$	$5,15 \times 10^{-5}$	$4,06 \times 10^{-5}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$
Σ	$2,33 \times 10^{-5}$	$4,39 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$2,81 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$

Tabela 6

Concentração molar de metais [Me] da fração SN_2 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$2,68 \times 10^{-4}$	$9,84 \times 10^{-5}$	$8,76 \times 10^{-5}$	$3,36 \times 10^{-5}$	$5,27 \times 10^{-5}$
Cd	$8,50 \times 10^{-8}$	$7,26 \times 10^{-8}$	$4,18 \times 10^{-8}$	$1,60 \times 10^{-8}$	$2,52 \times 10^{-8}$
Pb	$1,67 \times 10^{-6}$	$2,95 \times 10^{-6}$	$8,49 \times 10^{-7}$	$1,29 \times 10^{-6}$	$4,39 \times 10^{-7}$
Cu	$2,23 \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-5}$	$8,02 \times 10^{-6}$	$7,79 \times 10^{-6}$	$4,91 \times 10^{-6}$
Σ	$2,92 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-4}$	$9,65 \times 10^{-5}$	$4,27 \times 10^{-5}$	$5,81 \times 10^{-5}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$3,55 \times 10^{-5}$	$4,21 \times 10^{-5}$	$3,62 \times 10^{-5}$	$3,25 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-5}$
Cd	$1,78 \times 10^{-8}$	$1,75 \times 10^{-8}$	$3,01 \times 10^{-8}$	$1,58 \times 10^{-7}$	$6,23 \times 10^{-9}$
Pb	$8,20 \times 10^{-7}$	$5,49 \times 10^{-7}$	$8,16 \times 10^{-7}$	$8,60 \times 10^{-6}$	$1,71 \times 10^{-7}$
Cu	$4,55 \times 10^{-6}$	$5,90 \times 10^{-6}$	$4,17 \times 10^{-6}$	$7,27 \times 10^{-3}$	$7,24 \times 10^{-6}$
Σ	$4,09 \times 10^{-5}$	$4,86 \times 10^{-5}$	$4,12 \times 10^{-5}$	$7,60 \times 10^{-3}$	$1,81 \times 10^{-5}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$3,06 \times 10^{-6}$	$8,6 \times 10^{-5}$	$3,36 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$	$1,22 \times 10^{-5}$
Cd	$1,78 \times 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-8}$	$2,58 \times 10^{-8}$	$4,45 \times 10^{-8}$	$2,05 \times 10^{-7}$
Pb	$9,89 \times 10^{-8}$	$3,62 \times 10^{-7}$	$4,29 \times 10^{-7}$	$2,61 \times 10^{-7}$	$2,36 \times 10^{-7}$
Cu	$1,57 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-5}$	$3,38 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-6}$
Σ	$4,75 \times 10^{-6}$	$9,74 \times 10^{-5}$	$3,74 \times 10^{-5}$	$1,96 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-5}$

Tabela 7

Concentração molar de metais [Me] da fração SED_2 , das diversas amostragens. Concentração em mol/litro. Σ - somatório simples das concentrações molares.

lagoa elem.	L1	L2	L3	L4	L5
Zn	$1,35 \times 10^{-5}$	$6,82 \times 10^{-6}$	$6,52 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-6}$	$7,99 \times 10^{-6}$
Cd	$8,61 \times 10^{-8}$	$6,62 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-8}$	$1,44 \times 10^{-8}$
Pb	$1,03 \times 10^{-6}$	$7,00 \times 10^{-7}$	$1,09 \times 10^{-7}$	$9,35 \times 10^{-8}$	$1,30 \times 10^{-7}$
Cu	$2,52 \times 10^{-6}$	$1,84 \times 10^{-6}$	$7,91 \times 10^{-6}$	$7,56 \times 10^{-7}$	$7,75 \times 10^{-7}$
Σ	$1,71 \times 10^{-5}$	$9,43 \times 10^{-6}$	$1,46 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-6}$	$8,91 \times 10^{-6}$

lagoa elem.	L6	L7	L8	L9	L10
Zn	$1,17 \times 10^{-5}$	$8,08 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$	$2,87 \times 10^{-6}$	$1,36 \times 10^{-4}$
Cd	$1,32 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-8}$	$2,61 \times 10^{-5}$	$1,78 \times 10^{-8}$
Pb	$1,28 \times 10^{-7}$	$1,10 \times 10^{-7}$	$1,31 \times 10^{-7}$	$6,44 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-6}$
Cu	$7,31 \times 10^{-7}$	$9,83 \times 10^{-7}$	$5,14 \times 10^{-7}$	$5,47 \times 10^{-2}$	$3,30 \times 10^{-5}$
Σ	$1,26 \times 10^{-5}$	$9,18 \times 10^{-6}$	$3,72 \times 10^{-6}$	$8,41 \times 10^{-2}$	$1,71 \times 10^{-4}$

lagoa elem.	L11	L12	L13	L14	L15
Zn	$6,9 \times 10^{-5}$	$6,31 \times 10^{-4}$	$4,36 \times 10^{-4}$	$3,98 \times 10^{-4}$	$1,53 \times 10^{-4}$
Cd	$2,85 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-6}$	$8,52 \times 10^{-7}$	$3,25 \times 10^{-7}$	$3,35 \times 10^{-7}$
Pb	$1,14 \times 10^{-6}$	$5,16 \times 10^{-6}$	$2,61 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-5}$	$6,13 \times 10^{-6}$
Cu	$1,67 \times 10^{-5}$	$8,12 \times 10^{-5}$	$4,43 \times 10^{-5}$	$4,41 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$
Σ	$8,69 \times 10^{-5}$	$7,18 \times 10^{-4}$	$5,07 \times 10^{-4}$	$4,64 \times 10^{-4}$	$1,82 \times 10^{-4}$

Tabela 8

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração A_T , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$1,91 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-7}$	$3,06 \times 10^{-7}$	$3,05 \times 10^{-7}$	$4,59 \times 10^{-7}$
0,5	$2,89 \times 10^{-9}$	$1,33 \times 10^{-9}$	$1,29 \times 10^{-9}$	$9,78 \times 10^{-10}$	$2,40 \times 10^{-8}$
0,1	$6,90 \times 10^{-9}$	$5,02 \times 10^{-9}$	$4,55 \times 10^{-9}$	$4,39 \times 10^{-9}$	$9,27 \times 10^{-9}$
1	$2,89 \times 10^{-7}$	$1,40 \times 10^{-7}$	$1,43 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-7}$	$1,71 \times 10^{-7}$
Σ	$2,21 \times 10^{-6}$	$7,56 \times 10^{-7}$	$4,55 \times 10^{-7}$	$4,22 \times 10^{-7}$	$6,63 \times 10^{-7}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$2,37 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-7}$	$5,35 \times 10^{-7}$	$1,18 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-6}$
0,5	$9,34 \times 10^{-10}$	$1,20 \times 10^{-9}$	$8,45 \times 10^{-10}$	$5,20 \times 10^{-8}$	$4,05 \times 10^{-9}$
0,1	$3,86 \times 10^{-9}$	$3,43 \times 10^{-9}$	$3,28 \times 10^{-9}$	$6,30 \times 10^{-8}$	$1,39 \times 10^{-8}$
1	$1,79 \times 10^{-7}$	$1,34 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-7}$	$3,40 \times 10^{-4}$	$2,67 \times 10^{-7}$
Σ	$2,55 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-7}$	$6,70 \times 10^{-7}$	$4,58 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-6}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$4,59 \times 10^{-7}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-7}$
0,5	$3,56 \times 10^{-9}$	$4,89 \times 10^{-10}$	0,0	0,0	$1,88 \times 10^{-8}$
0,1	$1,49 \times 10^{-8}$	$7,72 \times 10^{-10}$	$9,65 \times 10^{-10}$	$1,83 \times 10^{-9}$	$7,72 \times 10^{-10}$
1	$1,48 \times 10^{-7}$	$3,78 \times 10^{-8}$	$4,09 \times 10^{-8}$	$6,14 \times 10^{-8}$	$4,09 \times 10^{-8}$
Σ	$6,25 \times 10^{-7}$	$2,68 \times 10^{-7}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$2,16 \times 10^{-7}$	$2,13 \times 10^{-7}$

Tabela 9

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} referido a $Cu^{2+}=1$, da fração AF, das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$1,99 \times 10^{-5}$	$7,03 \times 10^{-6}$	$4,74 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$	$2,75 \times 10^{-6}$
0,5	$1,96 \times 10^{-8}$	$2,72 \times 10^{-8}$	$1,29 \times 10^{-8}$	$9,7 \times 10^{-9}$	$7,87 \times 10^{-9}$
0,1	$3,96 \times 10^{-8}$	$3,39 \times 10^{-8}$	$1,85 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$	$8,83 \times 10^{-9}$
1	$6,6 \times 10^{-6}$	$1,93 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$9,41 \times 10^{-7}$	$6,8 \times 10^{-7}$
Σ	$2,65 \times 10^{-5}$	$9,02 \times 10^{-6}$	$6,87 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	$3,44 \times 10^{-6}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$2,45 \times 10^{-6}$	$1,99 \times 10^{-6}$	$1,56 \times 10^{-6}$	$9,18 \times 10^{-4}$	$9,14 \times 10^{-6}$
0,5	$2,58 \times 10^{-9}$	$5,51 \times 10^{-9}$	$7,07 \times 10^{-9}$	$6,54 \times 10^{-7}$	$3,69 \times 10^{-9}$
0,1	$1,26 \times 10^{-8}$	$8,16 \times 10^{-9}$	$1,31 \times 10^{-8}$	$9,00 \times 10^{-6}$	$2,80 \times 10^{-8}$
1	$8,12 \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-7}$	$6,23 \times 10^{-7}$	$4,65 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-6}$
Σ	$3,28 \times 10^{-6}$	$2,48 \times 10^{-6}$	$2,20 \times 10^{-6}$	$5,60 \times 10^{-3}$	$1,32 \times 10^{-5}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$4,57 \times 10^{-6}$	$6,21 \times 10^{-5}$	$9,04 \times 10^{-6}$	$2,14 \times 10^{-5}$	$7,65 \times 10^{-6}$
0,5	$2,62 \times 10^{-9}$	$1,67 \times 10^{-8}$	$7,96 \times 10^{-8}$	$1,64 \times 10^{-8}$	$1,65 \times 10^{-7}$
0,1	$1,93 \times 10^{-8}$	$1,30 \times 10^{-7}$	$1,55 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-7}$	$9,99 \times 10^{-8}$
1	$2,31 \times 10^{-6}$	$3,70 \times 10^{-5}$	$5,14 \times 10^{-6}$	$5,60 \times 10^{-6}$	$2,39 \times 10^{-6}$
Σ	$6,9 \times 10^{-6}$	$9,90 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-5}$	$2,72 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-5}$

Tabela 10

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SN_1 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$6,10 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$	$3,82 \times 10^{-7}$	$4,59 \times 10^{-7}$	$6,88 \times 10^{-7}$
0,5	$1,95 \times 10^{-9}$	$7,2 \times 10^{-9}$	$1,33 \times 10^{-9}$	$1,78 \times 10^{-10}$	$8,89 \times 10^{-11}$
0,1	$1,08 \times 10^{-8}$	$9,27 \times 10^{-9}$	$3,09 \times 10^{-9}$	$1,83 \times 10^{-9}$	$1,68 \times 10^{-9}$
1	$1,32 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-7}$	$1,65 \times 10^{-7}$	$2,17 \times 10^{-7}$
Σ	$7,43 \times 10^{-6}$	$4,09 \times 10^{-6}$	$5,92 \times 10^{-7}$	$6,26 \times 10^{-7}$	$9,07 \times 10^{-7}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$4,59 \times 10^{-7}$	$7,65 \times 10^{-7}$	$5,35 \times 10^{-7}$	$3,86 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-6}$
0,5	$4,45 \times 10^{-11}$	$4,45 \times 10^{-11}$	$8,90 \times 10^{-11}$	$1,93 \times 10^{-8}$	$4,76 \times 10^{-9}$
0,1	$7,72 \times 10^{-10}$	$7,72 \times 10^{-10}$	$7,67 \times 10^{-11}$	$1,35 \times 10^{-8}$	$1,35 \times 10^{-8}$
1	$1,11 \times 10^{-7}$	$2,11 \times 10^{-7}$	$1,11 \times 10^{-7}$	$9,65 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-7}$
Σ	$5,71 \times 10^{-7}$	$9,77 \times 10^{-7}$	$6,47 \times 10^{-7}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-6}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$5,31 \times 10^{-7}$	$2,87 \times 10^{-6}$	$4,59 \times 10^{-7}$	$6,11 \times 10^{-7}$	$4,72 \times 10^{-7}$
0,5	$2,80 \times 10^{-9}$	$4,45 \times 10^{-11}$	$8,90 \times 10^{-12}$	$8,9 \times 10^{-12}$	$1,95 \times 10^{-8}$
0,1	$4,48 \times 10^{-8}$	$9,65 \times 10^{-9}$	$8,69 \times 10^{-9}$	$4,54 \times 10^{-9}$	$5,79 \times 10^{-10}$
1	$3,52 \times 10^{-7}$	$5,11 \times 10^{-7}$	$8,18 \times 10^{-8}$	$1,45 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{-7}$
Σ	$9,31 \times 10^{-7}$	$3,39 \times 10^{-6}$	$5,42 \times 10^{-7}$	$7,60 \times 10^{-7}$	$6,37 \times 10^{-7}$

Tabela 11

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SED_1 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$5,00 \times 10^{-5}$	$2,56 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$	$8,71 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-5}$
0,5	$3,39 \times 10^{-8}$	$1,56 \times 10^{-8}$	$1,56 \times 10^{-8}$	$1,22 \times 10^{-8}$	$1,10 \times 10^{-8}$
0,1	$9,25 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-7}$	$5,40 \times 10^{-8}$	$6,89 \times 10^{-8}$	$2,84 \times 10^{-8}$
1	$1,22 \times 10^{-5}$	$7,51 \times 10^{-6}$	$7,14 \times 10^{-6}$	$3,93 \times 10^{-6}$	$3,05 \times 10^{-6}$
Σ	$6,23 \times 10^{-5}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$2,97 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-5}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$6,67 \times 10^{-6}$	$9,22 \times 10^{-6}$	$7,69 \times 10^{-6}$		$6,22 \times 10^{-5}$
0,5	$3,28 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-8}$	$1,58 \times 10^{-8}$		$9,36 \times 10^{-9}$
0,1	$4,43 \times 10^{-8}$	$3,98 \times 10^{-8}$	$5,71 \times 10^{-8}$		$1,87 \times 10^{-7}$
1	$1,45 \times 10^{-6}$	$2,56 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-6}$		$1,63 \times 10^{-5}$
Σ	$8,17 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-5}$		$7,87 \times 10^{-5}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$3,56 \times 10^{-6}$	$1,92 \times 10^{-4}$	$7,92 \times 10^{-5}$	$1,15 \times 10^{-4}$	$6,38 \times 10^{-5}$
0,5	$1,88 \times 10^{-8}$	$6,98 \times 10^{-8}$	$1,43 \times 10^{-7}$	$9,83 \times 10^{-8}$	$1,97 \times 10^{-7}$
0,1	$9,33 \times 10^{-8}$	$3,30 \times 10^{-7}$	$1,10 \times 10^{-6}$	$1,62 \times 10^{-6}$	$4,79 \times 10^{-7}$
1	$1,52 \times 10^{-5}$	$5,15 \times 10^{-5}$	$4,06 \times 10^{-5}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$
Σ	$1,89 \times 10^{-5}$	$2,44 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$8,13 \times 10^{-5}$

Tabela 12

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} , referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SN_2 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$1,34 \times 10^{-4}$	$4,92 \times 10^{-5}$	$4,38 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$	$2,64 \times 10^{-5}$
0,5	$4,25 \times 10^{-8}$	$3,63 \times 10^{-8}$	$2,09 \times 10^{-8}$	$8,00 \times 10^{-9}$	$1,26 \times 10^{-8}$
0,1	$1,67 \times 10^{-7}$	$2,95 \times 10^{-7}$	$8,49 \times 10^{-8}$	$1,29 \times 10^{-7}$	$4,39 \times 10^{-8}$
1	$2,23 \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-5}$	$8,02 \times 10^{-6}$	$7,79 \times 10^{-6}$	$4,91 \times 10^{-6}$
Σ	$1,56 \times 10^{-4}$	$6,31 \times 10^{-5}$	$5,19 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-5}$	$3,14 \times 10^{-5}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$1,77 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-4}$	$5,35 \times 10^{-6}$
0,5	$8,90 \times 10^{-9}$	$8,76 \times 10^{-9}$	$1,50 \times 10^{-8}$	$7,92 \times 10^{-8}$	$3,11 \times 10^{-9}$
0,1	$8,20 \times 10^{-8}$	$5,49 \times 10^{-8}$	$8,16 \times 10^{-8}$	$8,60 \times 10^{-7}$	$1,71 \times 10^{-8}$
1	$4,55 \times 10^{-6}$	$5,90 \times 10^{-6}$	$4,17 \times 10^{-6}$	$7,27 \times 10^{-3}$	$7,24 \times 10^{-6}$
Σ	$2,23 \times 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-5}$	$2,24 \times 10^{-5}$	$7,43 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-5}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$1,53 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$	$8,41 \times 10^{-6}$	$6,12 \times 10^{-6}$
0,5	$8,90 \times 10^{-9}$	$1,67 \times 10^{-8}$	$1,29 \times 10^{-8}$	$2,22 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-7}$
0,1	$9,89 \times 10^{-9}$	$3,62 \times 10^{-8}$	$4,29 \times 10^{-8}$	$2,61 \times 10^{-8}$	$2,36 \times 10^{-8}$
1	$1,57 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-5}$	$3,38 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-6}$
Σ	$3,12 \times 10^{-6}$	$5,40 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-5}$	$7,53 \times 10^{-6}$

Tabela 13

Concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição I_{50} referido a $Cu^{2+}=1$, da fração SED_2 , das diversas amostragens. Σ - somatório das concentrações molares corrigidas.

lagoa CR	L1	L2	L3	L4	L5
0,5	$6,76 \times 10^{-6}$	$3,41 \times 10^{-6}$	$3,26 \times 10^{-6}$	$1,49 \times 10^{-6}$	$3,99 \times 10^{-6}$
0,5	$4,31 \times 10^{-8}$	$3,31 \times 10^{-8}$	$1,33 \times 10^{-8}$	$8,72 \times 10^{-9}$	$7,21 \times 10^{-9}$
0,1	$1,03 \times 10^{-7}$	$7,00 \times 10^{-8}$	$1,09 \times 10^{-8}$	$9,35 \times 10^{-9}$	$1,30 \times 10^{-8}$
1	$2,52 \times 10^{-6}$	$1,84 \times 10^{-6}$	$7,91 \times 10^{-6}$	$7,56 \times 10^{-7}$	$7,75 \times 10^{-7}$
Σ	$9,43 \times 10^{-6}$	$5,35 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-6}$	$4,78 \times 10^{-6}$

lagoa CR	L6	L7	L8	L9	L10
0,5	$5,87 \times 10^{-6}$	$4,04 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$1,44 \times 10^{-2}$	$6,79 \times 10^{-5}$
0,5	$6,59 \times 10^{-9}$	$5,34 \times 10^{-9}$	$6,05 \times 10^{-9}$	$1,30 \times 10^{-5}$	$8,9 \times 10^{-9}$
0,1	$1,29 \times 10^{-8}$	$1,10 \times 10^{-9}$	$1,31 \times 10^{-8}$	$6,44 \times 10^{-5}$	$1,99 \times 10^{-7}$
1	$7,31 \times 10^{-7}$	$9,83 \times 10^{-7}$	$5,14 \times 10^{-7}$	$5,47 \times 10^{-2}$	$3,30 \times 10^{-5}$
Σ	$6,62 \times 10^{-6}$	$5,04 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-6}$	$6,92 \times 10^{-2}$	$1,01 \times 10^{-4}$

lagoa CR	L11	L12	L13	L14	L15
0,5	$3,45 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-4}$	$2,18 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-4}$	$7,65 \times 10^{-5}$
0,5	$1,42 \times 10^{-8}$	$5,09 \times 10^{-7}$	$4,26 \times 10^{-7}$	$1,62 \times 10^{-7}$	$1,68 \times 10^{-7}$
0,1	$1,14 \times 10^{-7}$	$5,16 \times 10^{-7}$	$2,61 \times 10^{-6}$	$2,15 \times 10^{-6}$	$6,13 \times 10^{-7}$
1	$1,67 \times 10^{-5}$	$8,12 \times 10^{-5}$	$4,43 \times 10^{-5}$	$4,41 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$
Σ	$5,13 \times 10^{-5}$	$3,97 \times 10^{-4}$	$2,65 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-4}$	$9,98 \times 10^{-5}$

QUADRO 2

COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN (r_s), UTILIZANDO AS
CONCENTRAÇÕES MOLARES DOS METAIS INDIVIDUAIS

AI	AF	SN ₁	SED ₁	SN ₂	SED ₂	$\Delta \%$	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
							r_s	r_s	r_s	r_s
X						X	0,50	sc	0,63	0,54
X				X			0,44	sc	0,44	sc
	X		X				0,91	0,84	0,61	0,95
	X				X		0,87	0,80	0,79	0,85
	X			X			0,44	0,81	sc	sc
			X		X		0,97	0,81	0,70	0,90

N = 15

 $r_s (\alpha = 0,05) = 0,44$

sc = sem correlação

nível de significância

QUADRO 3

COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN UTILIZANDO O SOMATÓRIO
DAS CONCENTRAÇÕES MOLARES DOS METAIS

AI	AF	SN ₁	SED ₁	SN ₂	SED ₂	$\Delta \%$	r_s
X						X	0,62
	X					X	0,55
			X		X		0,85

N = 15

 $r_s (\alpha = 0,05) = 0,44$

QUADRO 4

COEFICIENTES DE SPEARMANN UTILIZANDO O SOMATÓRIO DAS CONCENTRAÇÕES
MOLARES DOS METAIS CORRIGIDOS CONFORME EFEITO RELATIVO DE
INIBIÇÃO - I_{50} , referido a Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+}

AI	AF	SN ₁	SED ₁	SN ₂	SED ₂	Δ %	rs
X						X	0,63
	X					X	0,51
			X		X		0,86

N = 15

rs ($\alpha = 0,05$) = 0,44

4 - DISCUSSÃO

Para qualquer estudo de um ecossistema, a avaliação ambiental, através de bioindicadores, tem-se verificado como medida indispensável (PHILLIPS, 1977) e por isto, sendo amplamente estudados.

No caso da poluição, o indicador biológico não é um simples coletor do agente químico poluente, mas é também um portador de processos biológicos que, alterados, podem expressar a real modificação ou mesmo dano no plano biológico. No presente trabalho, o bioindicador servirá, principalmente, como portador do sensor enzimático.

Na busca de enzimas que são altamente sensíveis a metais pesados, para fixação de parâmetros bioquímicos em bioindicadores de poluição decidiu-se examinar com mais detalhe a delta-aminolevulinato desidratase.

Esta enzima é bem conhecida como indicadora de intoxicação humana por chumbo e foi intensamente estudada em eritrócito, em casos de saturnismo (MITCHELL, 1977; BELLINASO, 1985).

Procurando, por um lado, examinar o efeito de metais pesados a nível enzimático e, por outro, verificar a possibilidade de usar o teste enzimático como parâmetro de bioindicação

em águas, foi iniciado o estudo desta enzima em componentes de plâncton.

Trabalhou-se com o enzima extraída da fração de plâncton coletada entre as redes de malhas de 25 μ m e 112 μ m.

Procurou-se padronizar as coletas somente em termos do tamanho do plâncton, com as redes, evitando-se assim que organismos maiores, como larvas de insetos e outros, estivessem presentes nas amostras.

Embora a comunidade planctônica possa variar qualitativa e quantitativamente em função de múltiplos fatores, sempre haverá presença de δ -aminolevulinato desidratase, exatamente pelo fato de ser uma enzima universal básica de processos metabólicos essenciais. Situação semelhante se verifica com a determinação de clorofila para aferição da produção primária.

4.1 - pH ótimo, temperatura ótima e Km

A delta-aminolevulinato desidratase extraída de fontes de origem vegetal apresenta valores de pH ótimo entre 7,5-9,0 para a enzima extraída de *Rhodopseudomonas spheroides* (SHEMIN, 1962; BURNHAM & LASCELLES, 1963; NANDI et al., 1968), trigo (NANDI & WAYGOOD, 1967), tabaco (SCHNEIDER, 1970) "callus" de soja (TIGIER et al., 1968, 1970), *Phaseolus vulgaris* L (SLUITERS - SCHOLTEN, 1973) e *Ricinus communis* (AMAZARRAY, 1986). Valores mais baixos de pH, entre 6,0-7,0, em tampão fosfato, foram encontrados para fontes enzimáticas de origem animal como reticulócitos de coelhos e eritrócitos de galinha (GRANICK & MAUZERALL, 1958), fígado bovino (BATTLE et al., 1967) eri-

trócito humano (MITCHELL et al., 1977; BELLINASO, 1985), fígado e sangue do peixe *Pimelodus maculatus* (BELLINASO, 1985; RODRIGUES, 1987) e glândula digestiva de *Ampullaria canaliculata* (MARTINS, 1986).

Na fração de plâncton estudada, o pH ótimo de incubação da enzima, a 37°C, em tampão Tris 0,05M, está situado na faixa de 8,5-8,6 (Figura 4).

Para a temperatura ótima de incubação, na fração de plâncton, foi encontrado o valor em torno de 40°C, ocorrendo a seguir brusca queda da atividade da enzima (Figura 5). Valores semelhantes foram encontrados para a enzima em *Ricinus communis* (AMAZARRAY & DICK, 1985). Valores mais altos de temperatura, entre 50-60°C foram encontrados para a enzima em *Rhodopseudomonas spheroides* (NANDI et al., 1968), "callus" de soja (TIGIER et al., 1968), sangue humano e fígado do peixe *Pimelodus maculatus* (BELLINASO, 1985), glândula digestiva de *Ampullaria canaliculata* (MARTINS, 1986) e sangue do peixe *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES, 1987).

A constante de Michaelis - Menten encontrada na fração de plâncton pelo método das duplas recíprocas (Figura 3) foi de $4,0 \times 10^{-3}$ M.

Valor semelhante, de $6,6 \times 10^{-3}$ M foi encontrado na enzima de *Ricinus communis* (AMAZARRAY & DICK, 1985).

Estes valores diferem dos Km encontrados na literatura, por exemplo: eritrócito de galinha e reticulócito de coelho (GRANICK & MAUZERALL, 1958) $5,0 \times 10^{-4}$ M, fígado bovino (BATTLE

et al., 1967) $1,5 \times 10^{-4}$ M, *Rhodopseudomonas spheroides* (NANDI et al., 1968) $7,0 \times 10^{-4}$ M, "callus" de soja (TIGIER et al., 1970) $3,5 \times 10^{-4}$ M, tabaco e espinafre (SCHNEIDER, 1970), $3,6 \times 10^{-4}$ M e $2,4 \times 10^{-4}$ M, respectivamente, *Phaseolus vulgaris* L (SLUITERS-SCHOLTEN, 1973) $3,0 \times 10^{-4}$ M, eritrócito humano e fígado de *Pimelodus maculatus* (BELLINASSO, 1985) $2,2 \times 10^{-4}$ M, *Ampularia canaliculata* (MARTINS, 1986) $1,6 \times 10^{-4}$ M e sangue de *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES, 1987) $1,4 \times 10^{-4}$ M.

Deve-se considerar que as enzimas de origem vegetal, que constam na literatura, eram preparados parcialmente purificados, diferindo do nosso caso onde a enzima não sofreu nenhuma forma de purificação.

4.2 - Efeito da concentração de IAM, EDTA e DTT

A δ -ALA-D possui grupamentos sulfidrílicos que são indispensáveis para sua atividade catalítica e seu bloqueio leva à perda da mesma. Isto foi confirmado em diversos estudos mediante o emprego de agentes bloqueadores desses grupos sulfidrílicos, tais como a iodoacetamida (GRANICK & MAUZERALL, 1958) e p-cloromercuriobenzoato (BATTLE et al., 1967).

A curva com monoiodoacetamida tem por objetivo a identificação da dependência da atividade enzimática de grupos -SH, indicativo de sua suscetibilidade a metais pesados, na δ -ALA-D de plâncton.

O IAM mostrou-se pouco efetivo em sua capacidade de bloqueio dos grupos tiólicos da enzima extraída da fração de plâncton.

ton, ficando, a inibição enzimática, em torno de 36% na concentração de $60 \times 10^{-3} \text{M}$ do reagente (Figura 8). Observa-se que em *Ricinus communis* (AMAZARRAY, 1986), também nesta concentração, foi obtida inibição em torno de 50%.

Este valor de concentração de IAM citado está em torno de seis vezes maior do que o valor encontrado para fígado de *Pimelodus maculatus* (BELLINASO, 1985), de cento e vinte vezes maior do que para glândula digestiva de *A. canaliculata* (MARTINS, 1986) e de mil vezes maior para sangue de *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES, 1987).

Sabe-se que o p-cloromercuriobenzoato (PCMB) provoca inibição completa da δ -ALA-D de origem bacteriana (BATLLE et al., 1967), em torno de 70% em *Chlorella vulgaris* (TAMAI, 1979) e em torno de 85% em *Saccharomyces cerevisiae* (BARREIRO, 1967).

Estudos anteriores revelaram que a δ -ALA-D de fígado bovino (SHEMIN, 1976), fígado de *Pimelodus maculatus* (BELLINASO, 1985), *Ricinus communis* (AMAZARRAY, 1986) e de *A. canaliculata* (MARTINS, 1986) necessitam de um cofator metálico. Ora, era de se esperar que também a enzima da fração de plâncton apresentaria a mesma necessidade. Para testar esta hipótese, utilizou-se o ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) que é um quelante inespecífico de metais e um potente inibidor da enzima. Neste caso o agente quelante reteria o metal tornando-o indisponível para ação catalítica. Esta inibição é um dos critérios reconhecidos para identificar uma metaloenzima.

Observou-se que também na fração de plâncton a δ -ALA-D é uma metaloenzima necessitando de cofator metálico para sua a-

tividade enzimática. A concentração de $0,06 \times 10^{-3} \text{M}$ de EDTA é suficiente para provocar a inibição (Figura 9).

A ativação observada em concentrações menores do que $0,06 \times 10^{-3} \text{M}$ pode ser devido à remoção, pelo quelante, de algum metal presente capaz de inibir a δ -ALA-D, mas que não faz parte da estrutura da enzima.

A concentração encontrada, bem menor do que a observada em fígado de boi (GIBSON, 1955), fígado de peixe (BELLINASSO, 1985), *Ricinus communis* (AMAZARRAY, 1986) pode ser um indicativo de que o cofator estaria mais bem retido nestes outros tecidos do que na fração de plâncton estudada.

Contudo, não se sabia qual ou quais metais agiam como cofatores. Para identificar a natureza desse cofator, inibiu-se a enzima com EDTA e tentou-se regenerar a atividade perdida com a adição dos cátions Zn^{2+} , Cd^{2+} ou Ni^{2+} (Figura 40).

Os três íons estudados conseguiram restaurar, plenamente, a atividade enzimática, na concentração de $4 \times 10^{-4} \text{M}$.

SHEMIN (1976) encontrou Zn^{2+} atuando como provável cofator metálico da δ -ALA-D de fígado bovino. Mais tarde, Zn^{2+} e Ni^{2+} também foram identificados como cofatores por BELLINASSO (1985) em fígado de peixe, por AMAZARRAY (1986) em *Ricinus communis* e por MARTINS (1986) em *A. canaliculata*.

CLELAND (1964) mostrou que, além de cisteína, glutation, mercaptoetanol, 2,3- dimercaptopropanol e tioglicolato, pode-se, utilizar o reagente Ditioneitol (DTT) para a proteção de grupos sulfidríla, mantendo-os no estado reduzido, contudo, es

te reagente também possui a propriedade de fixar íons metálicos, mesmo estando, estes, em baixas concentrações.

Mais tarde, GRANICK (1973) constatou a eficiência do ditionotriitol (DTT) como agente protetor dos grupos -SH em δ -ALA-D.

DTT foi utilizado em tecidos de origem animal como fígado e sangue de peixe (BELLINASSO, 1986; RODRIGUES, 1987) e *A. canaliculata* (MARTINS, 1986) causando ativação enzimática até a concentração de $20-25 \times 10^{-3}$ M. Testado na enzima de origem vegetal, *Ricinus communis* (AMAZARRAY, 1986) provocou ativação até a concentração de 9×10^{-3} M. Pode-se novamente verificar a semelhança da enzima de origem vegetal com a da fração de plâncton já que a concentração necessária de DTT para causar ativação nesta última é de 3×10^{-3} M, para acima desta concentração, inibir. (Figura 17, 18, 19 e 20).

Esta ativação, seguida de inibição pode ser devida ao fato de que, havendo o DTT removido cátions inibidores presentes no meio, começa a remover os metais que fazem parte da estrutura da enzima e que atuam como cofatores enzimáticos.

4.3 - Efeito dos íons metálicos

Tendo em vista que um dos objetivos do trabalho era verificar a sensibilidade da δ -ALA-D do plâncton a metais pesados, e confirmada esta hipótese, poder-se-ia prosseguir os estudos tentando mostrar sua viabilidade de uso como instrumento de biomonitoração. Testou-se a enzima com cátions metálicos que estão entre os mais reativos com os grupamentos sulfidrilicos.

O íon Mg^{2+} não causa, nenhum tipo de inibição à enzima até a concentração de $200 \times 10^{-3}M$, ocorrendo inclusive uma pequena ativação de 5% em relação ao controle. (Figura 12).

O íon Ca^{2+} em concentrações de $60 \times 10^{-6}M$ a $140 \times 10^{-6}M$, provoca uma inibição em torno de 20%. Já na concentração de $200 \times 10^{-6}M$ recupera-se a atividade enzimática até 100%, em relação ao controle. Este efeito é difícil de ser explicado (Figura 11).

Contrário ao que ocorre com a enzima de mamona, *Ricinus communis* (AMAZARRAY & DICK, 1984) o íon Mn^{2+} não causa inibição à δ -ALA-D, ocorrendo uma discreta ativação de 10% em relação ao controle (Figura 13).

Estes íons, Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} já foram identificados como ativadores enzimáticos da δ -ALA-D por NANDI & WAY GOOD (1967) em seu trabalho com folhas de trigo.

O íon Co^{2+} na concentração de $200 \times 10^{-6}M$ inibe a enzima em 50% de sua atividade original, chegando até 80% de inibição na concentração de $2.000 \times 10^{-6}M$ (Figura 14). Contudo, para testes de biomonitoramento, concentrações metálicas tão elevadas não são significativas neste estudo.

No caso do íon Ni^{2+} observou-se uma pequena queda de atividade enzimática em torno, de 10%, até a concentração de $30 \times 10^{-6}M$ com uma subsequente ativação que chegou ao redor de 150% em relação ao controle na concentração de $200 \times 10^{-6}M$. (Figura 15).

Este fato poderia ser decorrente de haver na enzima gru-

pamentos sulfidrílicos periféricos que tivessem maior afinidade pelo íon do que o sítio ativo. Ficando, estes grupamentos comprometidos, o íon Ni^{2+} ocuparia, então, posições no sítio ativo que seria a causa da ativação da enzima, podendo ser mais um indício de sua atuação como cofator enzimático.

Observou-se uma sensibilidade bastante acentuada da enzima do plâncton, *in vitro*, aos íons $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ (Figura 16).

Examinando-se as seqüências que causam inibição em I_{50} , em outros tecidos, tem-se:

$\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, eritrócito humano (BELLINASO, 1985);

$\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ e Cu^{2+} , fígado de *Pimelodus maculatus* (BELLINASO, 1985);

$\text{Mn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, *Ricinus communis* (AMAZARRAY & DICK, 1984);

$\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, *Ampullaria canaliculata* (MARTINS, 1986); $\text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, sangue de *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES, & DICK, 1985).

Pode-se observar que não existe paralelismo entre as seqüências de metais das enzimas dos diferentes grupos.

Uma das hipóteses que tentam explicar estas diferenças seriam amostras dos tecidos com quantidade iniciais de metais distintos em relação ao conteúdo enzimático, ou seja, a enzima poderia estar previamente inibida por uma quantidade qualquer de metal o que faria com que a quantidade de metal adicionado, capaz de provocar 50% de inibição diferísse de um ca

so para outro, alterando, assim, o posicionamento dos íons na escala.

Uma outra hipótese seria o fato de que as amostras estudadas não eram, de forma alguma, purificadas.

Contudo, fica claro que o íon Pb^{2+} é um forte inibidor enzimático em tecidos animais enquanto que a δ -ALA-D de tecidos vegetais não é afetada de maneira tão acentuada por este cátion.

4.4 - Inibição enzimática por metais pesados e recuperação da atividade com EDTA e DTT

Na tentativa de estabelecer um método enzimático que pudesse avaliar, com o uso de bioindicadores, as condições do meio ambiente quando submetido a cargas poluidoras contendo metais pesados, observou-se que a simples determinação da atividade enzimática era insuficiente para tirar-se conclusões sobre a qualidade do meio em estudo.

Assim, como saber se a atividade medida era um valor normal, correspondente ao total da enzima, ou era um valor que já se mostrava parcialmente afetado pelo meio? Para resolver esta questão existiam duas soluções.

A primeira delas, consistia em ter-se no laboratório uma cultura com uma comunidade planctônica determinada, como controle, isenta de metais e fazendo-se diversas medições procurar determinar, estatisticamente, quais os valores de atividade da enzima que poderiam ser considerados como normais quan-

do completamente isenta de inibidores. Esta abordagem foi descartada pois a atividade enzimática do plâncton apresenta variações nos ambientes naturais, provavelmente, por apresentar diferentes representantes de cada espécie presentes em determinado tempo e local.

Para este estudo seria necessário ter-se no laboratório culturas com as mais diversas combinações de espécies a fim de saber-se se estas modificações influenciam significativamente na atividade enzimática. Como pode-se observar seria um trabalho oneroso e que dispenderia um longo tempo e provavelmente, não conclusivo.

Por outro lado, observou-se que nos diversos testes realizados em laboratório com amostras mistas colhidas "*in natura*" ocorria, freqüentemente, uma reativação da atividade da enzima, em relação a um controle, quando EDTA ou DTT era adicionado. A idéia era de que estes reagentes, devido a sua capacidade quelante e protetora reagissem com os metais que porventura estivessem inibindo a enzima, recuperando-a. Existiram casos em que mesmo colocando-se EDTA ou DTT, não se observou nenhuma modificação no valor obtido da amostra em relação ao controle (sem EDTA e DTT), indicando que, provavelmente, não existia inibição enzimática nestas amostras.

Esta constatação foi de grande valia pois desta forma poder-se-ia tentar restaurar a atividade da enzima quando inibida, por cátions metálicos, tanto "*in vitro*" como de amostras coletadas em campo.

Os testes foram realizados inibindo-se a δ -ALA-D até pró

ximo de 100% com Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} e depois utilizando-se EDTA ou DTT, tentou-se recuperar a atividade perdida.

A concentração dos quelantes utilizada variou, em regra, entre $0,03$ a $0,09 \times 10^{-3}\text{M}$ com poucas exceções (indicadas no texto) para EDTA e foi de $3 \times 10^{-3}\text{M}$ para DDT.

Pelas Figuras 21, 22, 23, 24 e 25 pode-se observar que o EDTA recupera a atividade enzimática, na faixa de concentração de $0,03$ a $0,09 \times 10^{-3}\text{M}$, dos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Ni^{2+} . Para o íon Co^{2+} a recuperação ocorre somente na concentração de $0,24 \times 10^{-3}\text{M}$ de EDTA. (Figura 26).

EDTA não consegue recuperar a enzima totalmente quando inibida por Hg^{2+} (Figura 27). O mesmo acontece com a δ -ALA-D de *A. canaliculata* (MARTINS, 1986), enquanto que para sangue de *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES, 1987) não foi obtida nenhuma recuperação para este íon usando EDTA como quelante.

A hipótese de que Hg^{2+} inibe a enzima de maneira diferente dos outros íons, que seria indicada pela recuperação somente parcial com EDTA não é necessariamente válida. Há recuperação completa com DTT e o efeito pode ser atribuído ao comportamento particular do Hg^{2+} perante o EDTA ou deve-se pensar que a causa desta recuperação parcial está na ligação entre o íon Hg^{2+} e o reagente EDTA.

Pelas Figuras 23 e 24 pode-se observar que o EDTA recupera plenamente a atividade enzimática inibida pelos íons. Por outro lado, a inibição da enzima por EDTA inicia, quando em

presença de Cd^{2+} ou Ni^{2+} mais tardiamente ($0,09 \times 10^{-3}\text{M}$ com-
parado com $0,03 \times 10^{-3}\text{M}$). Como se atribui o efeito inibitório
do EDTA ao sequestro do íon metálico cofator e como Ni^{2+} ou
 Cd^{2+} podem substituí-lo na função de cofator enzimático, não
surpreende este deslocamento do início do processo inibitório
por EDTA.

Curioso é o fenômeno da reativação por EDTA após inibi-
ção por Co^{2+} . Não se explorou com muito detalhe este resulta-
do (obtido em diversas repetições) mas por certo merece um re-
exame no futuro.

As Figuras 17, 18, 19 e 20 mostram a recuperação obtida
quando o DTT é utilizado para proteger os grupamentos sulfi-
drílicos. Pode-se observar que para os íons Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} ,
 Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} a recuperação situa-se entre 95-100% e so-
mente para o íon Co^{2+} está na faixa de 90%.

Para os testes realizados em campo, foi escolhido o DTT
como agente recuperador da atividade enzimática devido ao bom
desempenho em relação a todos os metais causadores de inibi-
ção estudados.

Admitindo-se que em presença de DTT, se consiga plena re-
cuperação da atividade enzimática, idêntica àquela obtida sem
a presença de íons metálicos, pode-se relacionar a diferença
entre a atividade medida com DTT e sem DTT como forma de ex-
pressar a contaminação do meio ambiente.

Prosseguindo-se no estudo, levantou-se a questão de como
a adição de quantidades crescentes de metal teria influência

sobre quantidades diferentes de enzima. Em suma, conseguir-se-ia recuperar a atividade enzimática inibida por metal com qualquer quantidade de enzima presente?

As Figuras 28, 29, 30, 31 e 32 mostram que para os íons, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} consegue-se plena recuperação da atividade enzimática. Isto pode ser verificado pelo paralelismo das retas tracejadas com o eixo das abcissas.

Pode-se observar que em alguns gráficos existe, na origem, uma diferença entre os dois valores correspondentes à mesma amostra. Isto deve-se provavelmente, e já foi comentado, à presença de metais endógenos e que são retirados com DTT. Esta diferença deveria ser constante, se em todos os tubos a quantidade de metais endógenos fosse proporcionalmente a mesma. Isto não acontecendo faz com que ocorram estas diferenças. Por outro lado, conforme mostram as Figuras 33, 34, 35, 36 e 37 de recuperação da atividade enzimática com EDTA quando inibida por metais pesados em diversas concentrações de enzima a não ser no caso da inibição com o íon Cu^{2+} , que se obtém uma recuperação em todas as concentrações, com os outros cátions os resultados não são consistentes e difícil de serem interpretados.

Analisando as Figuras 38 e 39 pode-se concluir que elas mostram, de maneira clara, o que se pretendia dos testes.

Na Figura 38, observa-se que no ponto escolhido para ter-se, aproximadamente, 50% de inibição com 0,1 ml de solução, obteve-se uma inibição de 43%, mostrando que o efeito conjunto dos metais está presente pois se estivessem atuando sozi-

nhos causariam 1/5 deste efeito cada um.

Na Figura 39 observa-se o efeito somado mais uma vez, pois se cada metal atuasse sozinho teria-se uma inibição de no máximo 58%. Contudo, verifica-se que com 0,1 ml de solução, obtem-se 85% de inibição.

4.5 -- Efeito da variação de concentração de plâncton e tempo de exposição sobre a atividade enzimática quando inibida por Cd^{2+} , em escala de laboratório

A Figura 42 ilustra um conjunto de experiências nas quais se expôs quantidades crescentes de plâncton a uma idêntica concentração de Cd^{2+} (10 ppb). Comparando a capacidade de concentração de Cd^{2+} pela massa de plâncton, verifica-se que ela atinge um ótimo a um determinado nível, na experiência, em torno de 25 mg de peso seco para depois decrescer rapidamente. Nesta mesma faixa a quantidade total de Cd^{2+} assimilada permanece constante.

Quanto ao tempo de exposição (Figura 41) observou-se que nos 60 primeiros segundos o metal é rapidamente fixado pelo plâncton provavelmente pela parede celular (BEVERIDGE, 1986), ocorrendo, depois, um certo equilíbrio que se mantém pelo resto do tempo (5h).

No trabalho realizado por KHUMMONGKOL et al. (1982) observa-se, nos dois tipos de ensaios (sem crescimento celular e com crescimento exponencial) que a medida em que o metal (Cd^{2+}) desaparece da solução, reaparece nas células.

Contudo, pode-se observar na Figura 41 que entre 20 e 1800 segundos o metal que desaparece da solução, aparentemente não reaparece nas células.

Este tipo de teste é de suma importância para o conhecimento do comportamento dos organismos frente aos metais. Barreiras naturais, adsorção, absorção, sistemas de detoxificação são capítulos ainda obscuros e que devem ser estudados tentando preencher possíveis lacunas até agora sem explicação.

4.6 - Amostragem em campo

Depois de estudadas as características cinéticas da enzima, pretendeu-se verificar a possibilidade de utilizar a metodologia desenvolvida para monitoramento, em campo, particularmente se $\Delta\%$ é proporcional à presença de metais no meio natural. Para isto, foram coletadas 15 amostras de águas e plâncton de diversas fontes, lagos e lagoas de estabilização, industriais e não industriais.

Deve ser lembrado que cada coleta reflete a situação daquele instante, podendo esta ser modificada de um dia para outro.

Em função disto, alguns aspectos de transferência, mecanismos de detoxificação, acumulação e inibição devem ser discutidos.

Segundo WOLLAST (1982) existem muitos fatores a serem considerados quando da transferência do metal da fase aquosa para a fase particulada. Entre eles podem ser citadas reações

de dissolução - precipitação, processos de adsorção - desorção e processos biológicos. A disponibilidade do metal em solução, sua maneira de atuação e seu mecanismo de fixação devem ser criteriosamente estudados.

É interessante distinguir processos puramente físico - químicos, de atividades biológicas, como capacidade em acumular metais. Por exemplo, a capacidade genética de produzir ligantes orgânicos naturais como defesa a agressão tóxica de metais pesados é um fator a ser considerado.

Esta habilidade não é só função da variação genética, mas também da idade ou estágio de desenvolvimento do vegetal (GALE, 1986).

BEVERIDGE (1986) estudando o mecanismo de retenção de metais pesados por seres procarióticos verificou que as paredes celulares das bactérias possuem cargas negativas e desta forma, interagem, fortemente, com os íons metálicos, eletropositivos, presentes no meio. Somente há pouco tempo, foi reconhecida esta facilidade em fixar metais, observando que as bactérias desenvolveram eficientes sistemas de imobilização e retenção de metais do seu ambiente nativo. Processos de fotossíntese e respiração podem modificar profundamente as condições físico-químicas do meio circundante (pH, potencial redox, etc) e indiretamente, interferir nestes mecanismos. Parece haver uma ligação inicial, rápida, do metal pesado com a superfície da parede e/ou membranas (GALE, 1986).

KHUMMONGKOL et al. (1982) estudando a acumulação de Cd^{2+} , em baixas concentrações, em *Chlorella vulgaris* observou que a

assimilação por adsorção é rápida e em poucos segundos atinge o equilíbrio permanecendo constante, se a concentração celular permanece constante pelo período estudado de 60 h.

Um exemplo desta habilidade foi a simulação em laboratório, com águas do lago Erie que contem concentrações da ordem de μ molar de metais dissolvidos. Utilizando *B. subtilis*, BEVERIDGE (1986) observou que as bactérias, com suas paredes, retiraram, efetivamente, da água os metais, concentrando-os em seus tecidos, em torno de umas 100 vezes, concluindo que estudos como este são de grande interesse pois poderão auxiliar, ainda mais, na detoxificação de águas de uso industrial.

JENSEN (1981) observou em seus estudos com bioensaios "*in situ*", diferenças no comportamento das algas quando submetidas a metais pesados provenientes de atividades industriais. Entre outras observações, notou que em espécies de maior resistência, a taxa de crescimento não era afetada com a presença de poluentes; espécies mais sensíveis tinham esta taxa diminuída e outras menos resistentes chegavam a morte. Todavia, constatou que uma diminuição na concentração de metais pesados nas algas refletia um decréscimo de poluição de determinada indústria.

Deve-se salientar que a fixação externa de metais pesados resulta num aumento de sua incorporação celular e por conseguinte a sua probabilidade de interações posteriores com estruturas vitais ou enzimas o que eventualmente leva a manifestações de toxicidade. Frequentemente pode se associar a proteínas, de pequena massa molecular, no caso dos animais, meta

lotioneinas (GALE, 1986) e no caso de vegetais, fitoquelatinas. (GRILL et al., 1988)

No Quadro 2, verifica-se a correlação positiva entre a concentração molar dos metais individualmente presente na amostra inicial (AI) e a atividade diferencial ($\Delta\%$) para os cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} .

Nos Quadros 3 e 4 também se observa uma correlação positiva para os mesmos parâmetros utilizando agora, tanto o somatório das concentrações molares dos metais como o somatório das concentrações molares dos metais corrigidas conforme efeito relativo de inibição, significando que os metais analisados individualmente não afetam a correlação existente.

A inexistência de correlação com Cd^{2+} quando se analisa as concentrações molares dos metais individuais poderia ser explicada pelo fato de que as quantidades deste elemento encontradas nas águas estiveram, sempre, muito abaixo dos limites dos valores indicados por ALLEN et al. (1974), mesmo nos locais mais contaminados.

A ocorrência destas correlações são de grande importância, pois deduz-se que a medida que a contaminação da água por metais aumenta, ela se reflete, diretamente, sobre o $\Delta\%$, que neste trabalho, é o parâmetro bioquímico utilizado como indicador de metais pesados na água. Pode-se desta forma inferir, medindo-se o $\Delta\%$, que a água se apresenta menos ou mais contaminada.

Entre o metal existente na amostra inicial (AI) e o sobrenadante (SN2) obteve-se correlação positiva somente para

as concentrações molares dos metais individuais Zn^{2+} e Cu^{2+} .

O estudo realizado por WOLLAST (1982) na costa da Bélgica colabora na tentativa de explicar esta distribuição diferenciada. Observando a distribuição de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} na água e na fração particulada (plâncton e material inerte), este autor constatou um fator de concentração pelo plâncton na ordem de $10^4 - 10^5$ vezes. Verificou ainda que altos valores de Cu^{2+} e Zn^{2+} são encontrados na fase particulada onde a concentração do plâncton é maior. Isto é relevante pois Zn^{2+} e Cu^{2+} são elementos essenciais em algumas rotas metabólicas. Todavia, quando se tem maior contribuição de material inorgânico, na fase particulada diminui a concentração destes elementos.

Ao contrário, a presença de Pb^{2+} e Cd^{2+} é menos relacionada com o material celular como ficou evidenciado pelo fator de enriquecimento pelo plâncton destes dois elementos e que é nitidamente menor.

Dos Quadros 2 e 3 verifica-se uma correlação positiva da amostra filtrada (AF) com o $\Delta\%$ para os metais utilizando-se tanto o somatório das concentrações molares dos metais como o somatório das concentrações molares dos metais corrigidos conforme efeito relativo de inibição. Não se observa correlação dos metais individualmente com o $\Delta\%$ podendo isto significar que há um efeito sinérgico.

Observou-se uma correlação positiva entre a amostra filtrada (AF) e SED 1 e amostra filtrada (AF) e SED 2 para cada um dos quatro metais estudados. Isto poderia ser um indicati-

vo de que os metais presentes na amostra filtrada (AF), efetivamente são reencontradas na SED 1. Como há correlação com a SED 2 isto poderia indicar que a maior parte dos metais se encontra preso a organelas e membranas que sedimentam quando centrifugadas a alta rotação (43.500 g).

Entre a amostra filtrada (AF) e o Sobrenadante 2 (SN₂) observou-se uma correlação positiva somente para os elementos Cd²⁺ e Cu²⁺. Conforme o que foi descrito por WOLLAST (1982) Cd²⁺ não estaria muito associado com o material orgânico. Contudo, sendo um elemento com propriedades muito semelhantes ao Zn²⁺, e tendo sido identificado como possível cofator enzimático da δ-ALA-D, poder-se-ia compreender que estivesse presente no SN₂, talvez até atuando como cofator (VALLEE & ULMER, 1972).

Obteve-se uma correlação positiva nos três casos entre o SED 1 e o SED 2, conforme os Quadros 1, 2 e 3, indicando que quanto mais metal houver no SED 1, mais metal será encontrado no SED2, evidenciando, novamente a hipótese da fixação de metal por membranas e outras estruturas.

Fatos curiosos que poderiam ser levantados são a falta de correlação entre algumas das variáveis testadas.

No caso do metal existente na amostra inicial (AI) e amostra filtrada (AF) para os três casos não encontrou-se correlação.

Este fato poderia ser explicado pela distribuição diversa do íon metálico face a variáveis como pH, temperatura, força iônica, etc. No caso do metal existente na amostra inicial, tem-se, além da própria água com metais dissolvidos mais três

frações de plâncton, ou seja, microorganismos menores do que $25\mu\text{m}$, entre $25\mu\text{m}$ e $112\mu\text{m}$ e maiores do que $112\mu\text{m}$, além de larvas de insetos e outros, bem como material inorgânico. Na amostra filtrada (AF) tem-se somente grande quantidade de plâncton entre $25\mu\text{m}$ e $112\mu\text{m}$ além da água e material inorgânico. Estas diferenças de composição poderiam ser uma das causas do resultado obtido. A mesma explicação poderia ser dada para o caso de não ter havido correlação entre o metal existente na amostra inicial e o sedimento 1.

Além de tudo isto, um ponto deve ser considerado, ou seja o número de amostras, que embora suficiente para a realização do teste estatístico, é pequeno, acarretando com isto um rigor muito grande quanto aos graus de liberdade.

Alguns fatores influenciaram de maneira decisiva para que este número ficasse em quinze. O primeiro deles foi a pequena quantidade de lagos encontrados em Porto Alegre, que serviriam como grupos contendo baixa concentração de metal.

Um segundo fator, e bastante importante, foi o baixo número de indústrias, situadas próximas de Porto Alegre, potencialmente poluidoras que continham lagoas de estabilização.

A distância destas indústrias até a capital também deve ser considerada pois existe um tempo limite entre o deslocamento da amostra até a realização do ensaio, a partir do qual, possíveis modificações devido a estresse, falta de oxigênio começam a ser percebidas, podendo ocorrer, muitas vezes, morte dos organismos, afetando assim o material proteico.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um teste enzimático que pudesse refletir a presença de poluentes metálicos no meio ambiente. Para isto, estudou-se detalhadamente o comportamento cinético da enzima extraída do plâncton, "*in vitro*" e após aplicou-se a metodologia desenvolvida em campo. Desse teste observou-se que existe correlação significativa entre os metais encontrados na amostra inicial (AI) e o $\Delta\%$, indicando que o teste enzimático poderá servir como ferramenta no monitoramento precoce de águas industriais.

O principal objetivo deste teste piloto foi levantar dados preliminares que justificassem continuar o estudo da δ -ALA-D em plâncton.

A partir deste trabalho outros projetos poderão ser desenvolvidos, considerando que este campo de pesquisa, tendo o plâncton como fonte enzimática, é praticamente inexplorado.

Sugere-se portanto:

- a) estudo cinético das barreiras naturais, mecanismos de acumulação e detoxificação de metais pesados em comunidades planctônicas;
- b) estudo aprofundado da influência do tipo e da concentração da comunidade planctônica no processo de acumulação de metais, "*in vitro*" e em campo;
- c) observação do tempo necessário entre a apreensão do metal pelos organismos e o equilíbrio entre o metal dissolvido e a superfície externa do plâncton corrigindo-se a concentração do metal no meio de modo que não chegue a zero, como

também deixando-se esgotar o metal contido no meio;

d) estudar a influência de fatores externos (material h_umico, pH, taxa de crescimento) nos processos de absorção e ad_sorção de metais pesados pelas comunidades planctônicas;

e) realização de um sistema de monitoramento ativo atr_avés de testes de exposição;

f) purificando-se a enzima, verificar os mecanismos de fixação dos metais, observando as causas de determinado metal ser mais agressivo que outro aos organismos;

g) por fim, ampliar e diversificar os ensaios com o tes_te piloto na tentativa de esclarecer algumas correlações, que não foram evidenciadas.

CONCLUSÕES

Em face dos resultados pode ser concluído o seguinte:

a) para efeito de avaliação de ambientes e seu respectivo monitoramento em face de cargas poluentes não basta medir causas, mas também efeitos. Neste sentido o biomonitoramento representa uma abordagem, hoje, indispensável;

b) entre os parâmetros a serem examinados em biomonitoramento, os aspectos bioquímicos podem ser de especial importância, pois a ação de um agente químico, antes de se manifestar através de efeitos tóxicos, modificações fisiológicas ou morfológicas, ou outros, deve passar por modificações preliminares de processos bioquímicos e metabólicos. Estas são as manifestações iniciais de qualquer ação desta natureza e, portanto, se prestam para monitoramentos precoces;

c) a δ -ALA-D foi escolhida como sensor bioquímico de ação de metais pesados, porque participa da rota de biossíntese de compostos bioquímicos tetrapirrólicos como heme, clorofila e outros, estando presente em todos os seres unicelulares aeróbios.

d) o estudo específico da δ -ALA-D em frações de plâncton,

preponderantemente fitoplâncton, parece apresentar características suficientes para contribuir a um bom biomonitoramento em águas continentais;

e) as características enzimáticas como pH ótimo de atividade, tempo ótimo, Km, da δ -ALA-D da fração de plâncton confirmam a idéia de que há dois grandes grupos, conforme as fontes desta enzima: uma de origem animal e outra, preponderantemente, de origem vegetal;

f) na caracterização da enzima foram encontrados os seguintes resultados: pH de incubação ótimo, 8,5-8,6, temperatura ótima de atividade, 40°C e Km aproximado, $4,0 \times 10^{-3}$ M.

g) a presença de grupamentos sulfidrílicos, importantes na atividade catalítica da enzima, são evidenciados pela inibição da enzima por iodoacetamida e com a ativação por ditio-treitol;

h) ficou comprovada a inibição da enzima (não purificada) pelos cátions, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} com I_{50} aproximado de, respectivamente: 3×10^{-6} M, 6×10^{-6} M, 18×10^{-6} M, 18×10^{-6} M e 100×10^{-6} M. Observou-se inibição menos intensa da δ -ALA-D pelos cátions Co^{2+} e Ni^{2+} .

i) não causaram inibição enzimática os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , provocando o Mn^{2+} até certa ativação;

j) a inibição da δ -ALA-D, usando EDTA como quelante, indica a necessidade de um cofator metálico para seu desempenho; Zn^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} conseguiram reativar a atividade enzimática inibida, observando-se que a concentração do cofator no caso

do plâncton, a semelhança de outras δ -ALA-D de origem vegetal é maior do que na de origem animal;

l) DTT inibiu a atividade da enzima δ -ALA-D em concentrações acima de 3×10^{-3} M podendo este efeito ser igualmente atribuído a um processo de quelação do cofator metálico;

m) em concentrações inferiores, até 3×10^{-3} M o DTT conseguiu recuperar a atividade da enzima, "in vitro", quando inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} ;

n) o EDTA também conseguiu recuperar a atividade da δ -ALA-D, na faixa de 0,03 a $0,09 \times 10^{-3}$ M, quando inibida pelos íons Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} . A recuperação máxima no caso do íon Hg^{2+} situa-se abaixo de 50% quando EDTA é utilizado. As concentrações eficientes de EDTA estão abaixo da concentração que causaria inibição;

o) o DTT conseguiu recuperar plenamente a atividade enzimática também quando os cátions Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} atuam em conjunto;

p) observou-se que o efeito inibitório dos íons atuando em conjunto é maior do que se estivessem agindo isoladamente, sugerindo um efeito sinérgico direto sobre a enzima;

q) o DTT conseguiu igualmente recuperar a atividade da enzima, independente da concentração desta, quando inibida por Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} . Com o EDTA não foi possível obter resultado semelhante;

r) os testes preliminares de exposição em laboratório revelaram que a adsorção inicial de metal (Cd^{2+}) ao material

planctônico é bastante rápida (no prazo de segundos);

s) nestes testes, a eficiência de adsorção de metal (Cd^{2+}) parece variar com a concentração do material planctônico no meio;

t) foi estabelecido um método que permite avaliar a extensão do efeito de metais comparando-se as atividades da enzima δ -ALA-D com e sem quelante (DTT). Esta diferença, entre a atividade inibida e a desinibida pelo quelante, denominou-se a atividade diferencial ($\Delta\%$) e espelha o efeito conjunto de metais tóxicos;

u) este método, testado numa amostragem piloto com lagos e lagoas de estabilização apresentou algumas correlações estatisticamente significativas permitindo sugerir a sua aplicação para um monitoramento passivo de meios aquáticos extensível, eventualmente, a um monitoramento ativo;

v) levando-se em consideração que avaliações enzimáticas são, em regra, mais econômicas e acessíveis que a determinação direta de agentes químicos causadores de poluição, o uso do teste permite um acompanhamento constante e uma identificação precoce de efeitos de metais causadores de poluição.

Os resultados sugerem pelo menos duas linhas de pesquisa que podem ser desenvolvidas no futuro:

a) o estudo da cinética e do mecanismo do processo de assimilação de metais por algas em culturas axênicas bem como em culturas mistas;

b) a ampliação do estudo do método enzimático de "atividade diferencial da δ -ALA-D em frações planctônicas" para diagnóstico e avaliação de cargas de poluição de metais pesados em meios aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S.E.; GRIMSHAW, H.M.; PARKINSON, J.A.; QUARMBY, C.
In: *Chemical analysis of ecological Materials*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1974. p. 305-374.
- ALLEN, S.E.; BLATCHLEY, C.; BRISBIN, T.D. An algal assay method for determination of copper complexation capacities of natural waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30:448, 1983.
- AMAZARRAY, M.T.R. & DICK, T. Delta-Aminolevulinate dehidratase in plants (*Ricinus communis*); Effect of Heavy Metals. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUÍMICA, Rio de Janeiro, 14-20 outubro, 1984.
- _____. Medida enzimática para avaliação indireta de metais pesados. In: VI SIMPÓSIO DE ECOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS - Saarbrücken, Porto Alegre, 15-19 abril, 1985.
- AMAZARRAY, M.T.R. Efeito de metais pesados em plantas: δ -aminolevulinato dehidratase em (*Ricinus communis*). 109 f. Tese (Mestrado Ecologia) Inst. Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 1986.
- BARREIRO, O.L.C. 5 - Aminolaevulinate hidro-lyase from yeast isolation and purification. *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 1967.
- BATTLE, A.M.C.; FERRAMOLA, A.M.; GRINSTEIN, M. Purification and general properties of δ -aminolaevulate dehydratase from cow liver. *Biochem. J.* 104:244, 1967.
- BATTLE, A.M.C.; TIGIER, H.A.; LLAMBIAS, E.B.C.; XIFRA, E.A.W. Biosíntesis de porfirinas en callos de soya XIV cambios en la actividad de la delta-amino dehidrasa con las condiciones de crecimiento. *Anales Asoc. Quim. Argentina*, 63:305, 1975.
- BELLINASO, M.L. Estudo comparativo da δ -aminolevulinato dehidratase em eritrócitos humanos e fígado de peixes (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados. 128 f. Tese (Mestrado Bioquímica) Inst. Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 1985.

- BERGLIND, R. The effects of cadmium on ALA-D activity growth and haemoglobin content in the water flea, *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80c(2):407, 1985.
- BERGLIND, R.; DAVE, G.; SJÖBECK, M.L. The effects of lead on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity, growth, hemoglobin content and reproduction in *D. magna*. In: *Daphnia magna. Ecotoxicology and Environmental Safety*. 9:216, 1985.
- BEVERIDGE, T.J. The immobilization of soluble metals by bacterial walls. In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMP, 16, John Wiley & Sons, USA, 1986.
- BONSIGNORE, D.; CALISSANO, P.; CARTASEGNA, C. Un semplice metodo per la determinazione della δ -aminolevulinico deidratasi nel sangue: comportamento dell'enzima nell'intossicazione saturnina. *Med. Lavoro*. 56:199, 1965.
- BURNHAM, B.F. & LASCELLES, J. Control of porphyrin biosynthesis through a negative feed-back mechanism. Studies with preparations of δ -aminolaevulate synthetase and δ aminolaevulate dehydratase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem. J.* 87:462, 1963.
- BUTLER, G.C. *Ecotoxicology today*. In: PRE CONFERENCE SYMPOSIUM, Toronto, 1980 & IAWPR CONFERENCE, 10, Toronto, 1980. *Ecotoxicology and the aquatic environment: proceedings...* Oxford, Pergamon Press, 1981. p. 3-4.
- CHINARRO, S.; STELLA, A.M.; BERGES, L.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; BATLLE, A.M.C. δ -aminolevulinato dehidrasa; propiedades y mecanismo de acción. *N. Arch. Fac. Med.*, 41(2):61-70, 1983.
- CLELAND, W.W. Dithiothreitol, a new protective reagent for -SH groups. *Biochemistry*, 3:480, 1964.
- DISSANAYAKE, C.B. Metal-organic interactions in environmental pollution. *Intern. J. Environmental Studies*. 22:25, 1983.
- FINELLI, V.N.; MURTHY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. δ -aminolevulinic acid dehydratase, a zinc dependent enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 60(4):1418, 1974.
- GALE, N.L. The role of algae and other microorganismus in metal detoxification and environmental clean-up. In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMP, 16, John Wiley & Sons, USA, 1986.
- GIBSON, K.D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem J.* 61:618, 1955.
- GRANICK, S. & MAUZERALL, D. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes; II-Enzymes converting δ -aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *The J. Biolog. Chem.* 232:1119, 1958.

- GRANICK, J.L.; SASSA, S.; GRANICK, S.; LEVERE, R.D. Correlation between the ratio of activated to inactivated δ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. *Biochemical Medicine*, 8:149, 1973.
- GRANICK, S. Enzymatic conversion of δ -aminolevulinic acid to porphobilinogen. *Science*, 120:1105, 1954.
- GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. Occurrence of heavy metal binding phytochelatin in plants growing in a mining refuse area. Switzerland, Birkhäuser Verlag, 1988. p. 539-40.
- HOVENKAMP - OBBEMA, R.; MORMAN, A.; STEGWEE, D. Aminolaevulinic acid dehydratase in greening cells of *Euglena gracilis*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 72.S:277, 1974.
- JENSEN, A. Algal based bioassays for heavy metals. In: PRE CONFERENCE SYMPOSIUM, Toronto, 1980. & IAWPR CONFERENCE, 10., Toronto, 1980. *Ecotoxicology and the aquatic environment: proceedings...*, Oxford, Pergamon Press, 1981. p. 9-16.
- KHUMMONGKOL, D.; CANTERFORD, G.S.; FRYER, C. Accumulation of heavy metals in unicellular algae. In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMP, John Wiley & Sons, USA, 1982.
- KIRUCHI, G.; KUMAR, A.; TALMAGE, P.; SHEMIN, D. The enzymatic synthesis of δ -aminolevulinic acid. *The J. Biol. Chem.* 233: 1214, 1958.
- LLOYD, R. The role of acute toxicity tests with aquatic animals in chemical registration and notification schemes. In: PRE CONFERENCE SYMPOSIUM, Toronto, 1980 & IAWPR CONFERENCE, 10., Toronto, 1980. *Ecotoxicology and the aquatic environment: proceedings...*, Oxford, Pergamon Press, 1981. p. 5-8.
- LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The J. of Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- MARTINS, V. δ -Aminolevulinato desidratase (EC.:4.2.1.24) da glândula digestiva de *Ampullaria canaliculata*; características bioquímicas e efeito de metais pesados. 133 f. Tese. (Mestrado Bioquímica) Inst. Biociências, UFRGS, Porto Alegre, 1986.
- MAUZERALL, D. & GRANICK, S. The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *The J. of Biol. Chem.* 219:435, 1956.
- MITCHELL, R.A.; DRAKE, J.E.; WITTIN, L.A.; REJENT, T.A. Erythrocyte Porphobilinogen Synthase (delta-aminolevulinic acid dehydratase) Activity: A Reliable and Quantitative Indicator of Lead Exposure in Humans. *Clin. Chem.* 23,1:105, 1977.

- NANDI, D.L. & WAYGOOD, E.R. Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves II-5-Aminolaevulinate hydro-lyase. *Canadian Journal of Biochemistry*, 45:327, 1967.
- NANDI, D.L.; BAKER-COHEN, K.F.; SHEMIN, D. δ -Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides*, I-Isolation and properties. *The J. Biolog. Chem.* 243(6):1224, 1968.
- NANDI, D.L. & SHEMIN, D. δ -Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides*, III-Mechanism of porphobilinogen synthesis. *The J. Biolog. Chem.* 243:1236, 1968.
- PERKIN-ELMER. *Analytical methods for furnace atomic absorption spectroscopy*, nº 332, West Germany, 1980.
- PHILLIPS, D.J.H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review, *Environ. Pollut.* 13:281, 1977.
- RODRIGUES, A.L. & DICK, T. Efeitos de metais pesados em peixe: delta-aminoleculinato desidratase em eritrócitos. In: VI SIMPÓSIO DE ECOLOGIA - UFRGS - Saarbrücken, Porto Alegre, 15-19 abril, 1985.
- RODRIGUES, A. δ -aminolevulinato desidratase (Ec.:4.2.1.24) em sangue de *Pimelodus maculatus* (Pisces pimelodidae: características bioquímicas e efeito de metais pesados.) 132 f. Tese (Mestrado Bioquímica) Inst. Biociências, UFRGS, Porto Alegre, 1987.
- SAKAI, T.; YANAGIHARA, S.; KUNIGI, Y.; USHIO, K. Relationships between distribution of lead in erythrocytes in vivo and in vitro, and inhibition of ALA-D. *Br. J. Ind. Med.* 39:382, 1982.
- SCHOLEM, R.W.N. & DICK, T. Efeito de metais pesados em plâncton. Metodologia de delta-aminolevulitato desidratase. In: VI SIMPÓSIO DE ECOLOGIA UFRGS - Saarbrücken, Porto Alegre, 15-19 abril, 1985.
- _____. Porfobilinogênio sintase em amostras de plâncton como indicador de metais pesados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 1, Belo Horizonte, 3-5 setembro, 1986.
- SCHNEIDER, Hansjoerg A.W. Changes in activity of four consecutive enzymes in the porphyrin and chlorophyll biosynthesis chain during development and illumination. *Z. Naturforschung*, 28:45, 1970.
- SHEMIN, D. δ -Aminolevulinic acid dehydrase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Methods in Enzymology*, 5:883, 1962.
- _____. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 273B:109, 1976.

- SIEGEL, Sidney. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. McGraw-Hill do Brasil Ltda. São Paulo, 1975, 350p.
- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M.TH.; VAN DEN BERG, F.M.; STGWEE, D. Aminolevulinate dehydratase in greening leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Z. Pflanzenphysiol., Bd, 69:217, 1973.
- STELLA, A.M. & BATTLE, A.M. del C. Porphyrin biosynthesis - immobilized enzymes and ligands. VIII Studies on the purification of δ -aminolevulinate dehydratase from *Euglena gracilis*. Plant Science Letters, 11:87, 1978.
- TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. Purification and characterization of δ -aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. Plant & Cell. Physiol., 20:2, 1979.
- TIGIER, H.A.; BATTLE, A.M. del C.; LOCASCIO, G. Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system; isolation, purification and general properties of δ -aminolaevulinate dehydratase. Biochem. Biophys. Acta, 151:300, 1968.
- TIGIER, H.A.; BATTLE, A.M.; LOCASCIO, G. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. Improved purification and some properties of delta amino-laevulic acid dehydratase. Enzymologia, 38:43, 1970.
- VALLEE, B.L.; ULMER, B.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 41:91-128, 1972.
- VOLESKY, B. Biosorbent materials. In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMP, 16, John & Wiley & Sons, USA, 1986.
- WHITTON, B.A. Toxicity of zinc, copper and lead to *Chlorophyta* from flowing waters. Arch. Mikrobiol. 72:353, 1970.
- WOLLAST, R. Methodology of research in micropolutants-heavy metals. Wat. Sci. Tech. 14:107, 1982.