

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE BIODIESEL: FOSFATASE ÁCIDA COMO BIOMARCADOR. BIOQUÍMICO

Andréa Cristina Santos da Cruz¹
Iracema Andrade Nascimento²
Louirânia Soares de Souza³

Resumo: Seguindo uma tendência mundial, o Brasil vem desenvolvendo pesquisas com o intuito de inserir no mercado uma opção de energia de qualidade, economicamente mais barata e menos poluente. O biodiesel é um combustível derivado de fontes naturais, como os óleos vegetais e as gorduras animais, obtido pelo processo denominado de transesterificação, que consiste numa reação química do óleo com um álcool (etanol ou metanol) na presença de um catalisador. Alguns aspectos acerca da utilização do biodiesel como biocombustível, ainda não estão claros, principalmente no que se refere ao grau de toxicidade das formulações originárias do processo de extração do óleo e das frações solúveis da mistura com o diesel. Os biomarcadores são importantes ferramentas para prover análises de riscos, envolvendo respostas de organismos vivos a agentes estressores, mensuráveis a nível bioquímico-celular fisiológico ou comportamental. Constituem respostas adaptativas de aviso, detectadas antes que os impactos sejam manifestados em níveis mais altos de organização biológica, como populações, comunidades e ecossistemas. O uso de biomarcadores propicia vantagens sobre outras técnicas de determinação de poluição, por serem de fácil e rápida detecção e de baixo custo. O presente trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade de diferentes formulações de biodiesel (mamona, dendê) e óleo residual, utilizando a fosfatase ácida como biomarcador bioquímico. O tratamento das amostras foi realizado de acordo com a API, RP 13H, 1984. *Drilling Fluid Bioassays, Federal Register -EPA- USA. Juvenis de Oreochromis niloticus (tilápias) foram expostos à fração solúvel em água (FSA) das diferentes formulações de biodiesel e óleo residual. Posteriormente à exposição, os fígados dos peixes foram retirados, lavados e homogeneizados para obtenção da fração lisossômica, seguindo técnica de Rodrigues et al. (1998). As determinações da atividade da fosfatase ácida e do teor de proteínas totais foram feitas utilizando as técnicas de Andersch e Szczypinski (1947) e Bradford (1976), respectivamente. Os resultados dos testes de toxicidade mostraram que dentre as formulações analisadas, a amostra contendo biodiesel de mamona foi a mais tóxica, seguida das amostras de óleo residual e do biodiesel de dendê.*

Palavras-chave: Testes ecotoxicológicos; Fosfatase ácida; Biodiesel.

INTRODUÇÃO

Para superar o desafio de atender à crescente demanda por energia, de forma sustentável, causando o menor impacto possível ao ambiente, é necessário buscar alternativas energéticas que possam substituir os combustíveis fósseis, mesmo que parcialmente. O limite ao uso do petróleo não vai se dar pelo esgotamento da fonte, mas pela redução da capacidade ambiental do planeta de absorver os gases oriundos de sua combustão (Ribeiro, 2006).

¹ Mestre em Ecologia e Biomonitoramento pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, integrante do Grupo de Pesquisa Ecotoxicologia e Biomonitoramento / Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento – IBIO/UFBA, Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC). E-mail: acscruz@yahoo.com.br. Autora

² Doutora em Ecotoxicologia, líder do Grupo de Pesquisa Ecotoxicologia e Biomonitoramento / Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento – IBIO/UFBA, Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC). Co-autora

³ Bióloga, especialista. DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas). Co-autora

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, praticamente livre de enxofre e aromáticos, considerado por esta razão um combustível ecológico. Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas, tais como mamona, dendê, girassol, babaçu, pinhão manso, soja, dentre outras.

O biodiesel é um combustível derivado de fontes como os óleos vegetais e as gorduras animais, obtido pelo processo denominado de transesterificação, que consiste numa reação química do óleo com um álcool (etanol ou metanol) na presença de um catalisador (Rede Baiana de Biocombustíveis, 2006).

No nordeste semi-árido brasileiro concentra-se a produção nacional de mamona (80%), sendo a Bahia o principal produtor regional. No que se refere ao seu potencial para a produção de biodiesel, a mamona é considerada como excelente por especialistas, principalmente devido ao seu alto teor de óleo (48% a 50%). O dendê apresenta grande versatilidade, o que possibilita sua aceitação por diversos segmentos industriais.

Na Bahia, verifica-se uma diversidade excepcional de solos e clima para a cultura do dendzeiro, que se destaca dentre as oleaginosas como a cultura de maior produtividade, com um rendimento de 4 a 6 toneladas de óleo/ha. Outra possibilidade de produção do biodiesel é a reutilização de óleos e gorduras residuais (OGR) de processos de fritura de alimentos, que tem se mostrado atraente, na medida em que se aproveita o óleo como combustível após sua utilização alimentar (Carneiro, 2003).

A diferente composição dos óleos destas fontes de biodiesel, bem como os diferentes processos usados para a sua obtenção, podem originar formulações, cujas frações solúveis são de toxicidade variada; as frações solúveis destes óleos podem vir a poluir corpos d'água, comprometendo a biota local. Sendo o biodiesel um produto relativamente novo, este aspecto ainda não foi estudado. Todavia, existem dados comprobatórios de toxicidade da mamona, cujos métodos de extração do óleo podem exacerbá-la. Características semelhantes podem ser verificadas em relação a outras oleaginosas, cuja toxicidade da fração solúvel do óleo nunca foi avaliada.

A busca de uma fonte energética alternativa exige concomitantemente a escolha de produtos eco-compatíveis; esta escolha só pode ser viabilizada mediante a determinação comparativa da toxicidade de todas as formulações geradas.

Os biomarcadores são alterações avaliadas em níveis bioquímico, celular, fisiológico e comportamental que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes na biota. Estas respostas são os primeiros sinais de alterações determinadas pelas condições de impacto. A detecção prévia desse estresse fornece subsídios ecotoxicológicos para ações de controle, antes que severas mudanças atinjam a dinâmica do ecossistema (Nascimento et al. 2002).

A toxicidade é uma característica que indica reais ou potenciais efeitos deletérios causados por exposição de organismos vivos a contaminantes. Sua determinação não pode ser analítica, desde que análises químicas determinam concentrações de contaminantes isolados, mas não os possíveis sinergismos ou adições que podem ampliar seus efeitos. Os biomarcadores são instrumentos básicos para a avaliação de riscos, em vista das muitas vantagens decorrentes de seu uso na prevenção de poluição: possibilitam respostas biológicas à exposição em curto prazo; os custos de análise são baixos em relação a técnicas convencionais indicativas da exposição a poluentes; são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes; permitem, na maioria dos casos, o uso de técnicas não invasivas (Nascimento et al., 2006, Walker et al., 1996). A resposta do organismo ao estresse ambiental é um dos primeiros sinais da tentativa de adaptação celular às condições de impacto.

A fosfatase ácida é uma enzima intra-lisossômica através da qual se pode comprovar uma possível toxicidade mediante a evidência do grau de fragilidade da membrana lisossômica. Quando substâncias exógenas, com comprovada ação tóxica, atuam sobre esta membrana, fragilizando-a, pode ocorrer ruptura e o conteúdo enzimático que apresenta pH ácido é liberado para seu exterior, que é caracterizado por apresentar pH alcalino, comprometendo, assim, a sobrevivência da célula (Rodrigues, 1986); o aumento da atividade da fosfatase ácida liberada com a quebra lisossômica pode ser utilizada como uma ferramenta eficaz na avaliação da toxicidade. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade de diferentes formulações de biodiesel (mamona, dendê) e óleo residual, utilizando a fosfatase ácida como biomarcador bioquímico.

METODOLOGIA

Os organismos-teste utilizados, *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758, foram obtidos no DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra a Seca, onde foram criados sob condições controladas em estação de piscicultura. As amostras do biodiesel de mamona (obtido por rota metálica e catalise básica), dendê (obtido por rota metálica e catalise ácida) e OGR (obtido por rota metálica e catalise ácida + básica) foram cedidas pelo Laboratório de Energia da UFBA.

Montagem dos testes de toxicidade

Preparo da fração solúvel em água (FSA) do biodiesel

O tratamento das amostras foi realizado de acordo com a API, RP 13H, 1984. Drilling Fluid Bioassays; Federal Register USEPA. As amostras de biodiesel foram agitadas e diluídas em frasco de Mariotti, na proporção 1/9 em água doce, e reagitados com agitador magnético na velocidade de 150 rpm por 20 horas. Após este período, deixou-se o extrato decantar e separou-se a fração solúvel em água (FSA). A FSA de cada amostra foi mantida sob agitação com agitador magnético, até a retirada das alíquotas necessárias ao preparo dos diferentes tratamentos. Foram feitas diluições, de forma a obter concentrações-teste de 10 % da FSA.

Os organismos-teste foram expostos à fração solúvel em água das diferentes amostras de biodiesel em aquários com capacidade de 4L, contendo 400 ml da FSA e 3600 ml de água doce; em cada aquário foi colocado um juvenil de *Oreochromis niloticus* (tilápia), por um período de 24 horas. Cada tratamento foi feito em triplicata e acompanhado de um tratamento controle, onde as tilápias foram expostas apenas à água doce.

Após 24 horas de exposição, os peixes foram mortos e os fígados retirados e lavados em solução tamponada de sacarose (0,25M); em seguida, os fragmentos de fígado foram ressuspensos em solução tampão sem fosfato, na proporção de 1/10 partes por volume. Esses fragmentos foram homogeneizados a 250 rpm durante 2 minutos em aparelho tipo Potter-Elvehjem. Posteriormente, a fração rica em lisossomos foi isolada através de centrifugação fracionada (900 a 22000g) (Figura 1), seguindo-se a técnica descrita por Rodrigues et al., (1983).

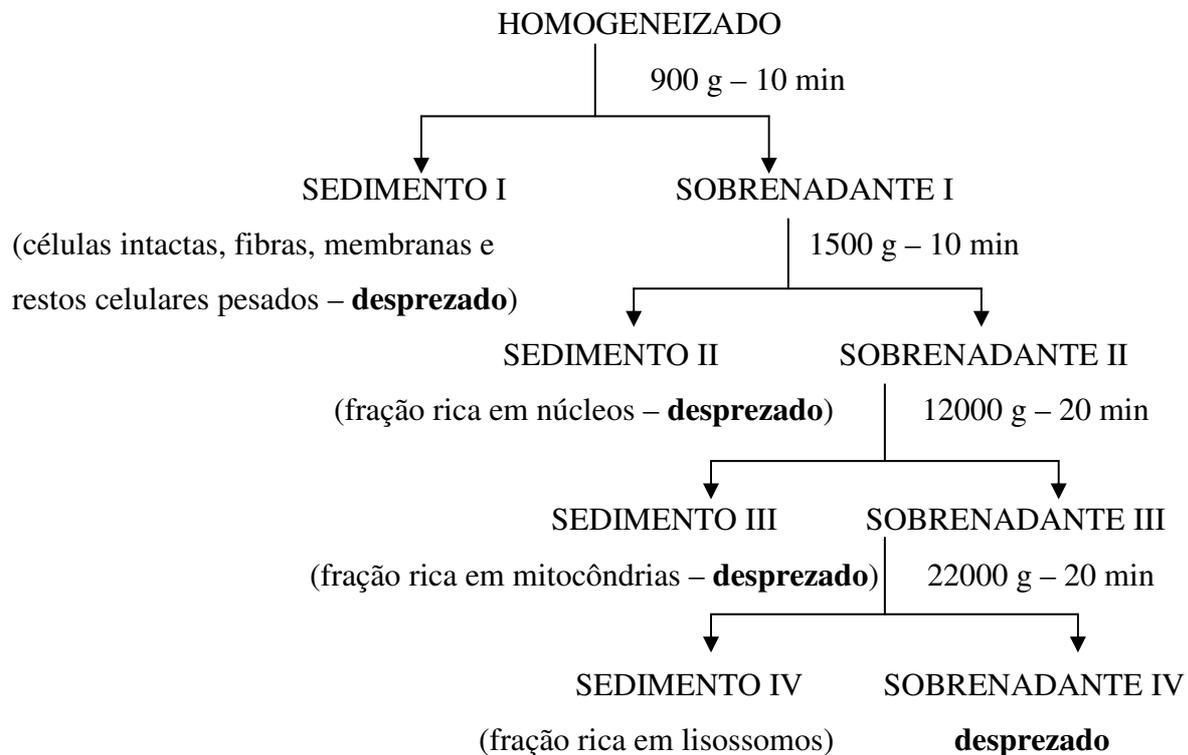


Figura 1. Esquema de centrifugação fracionada para a separação dos diversos componentes do compartimento lisossômico de hepatócitos de tilápias.

O sedimento de 22000g, que contém a maior parte dos lisossomos, foi ressuspenso para o mesmo volume do homogeneizado inicial, com a mesma solução tamponada e dividida em dois tubos. Num deles foi colocada água destilada e ambos foram incubados em banho de gelo por 20 minutos. Após esse tempo, eles foram novamente centrifugados a 22 000g por 20 minutos, com a finalidade de redepositar os lisossomos intactos. O sobrenadante de cada tubo foi utilizado para a dosagem da fosfatase ácida. A determinação da atividade da fosfatase ácida foi feita utilizando a técnica proposta por Andersch e Szczypinski (1947), a qual usa como substrato o p-nitrofenilfosfato que, pela ação da enzima, transforma-se em p-nitrofenol e ácido fosfórico. Adicionando-se hidróxido de sódio, interrompe-se a reação e o p-nitrofenol liberado é transformado em ânion de cor amarela, que é determinada por fotometria a 405nm. A quantidade de p-nitrofenol liberado na unidade de tempo é diretamente proporcional à atividade da fosfatase ácida, expressa em miliunidades por miligrama de proteínas totais. Ao mesmo tempo, foi determinado o teor de proteínas totais de acordo com a técnica de Bradford (1976).

Simultaneamente à realização dos testes, foi feito um controle utilizando água destilada, cujo objetivo foi avaliar o método de extração e incubação, empregado durante a experimentação. A exposição da fração lisossômica à água destilada (5ml) resulta na quebra integral dos lisossomos, durante um período de 20 minutos de incubação. Esse procedimento é relevante, pois permite calcular a atividade lisossômica total em determinadas condições de experimentação (controle negativo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos ao submeter juvenis de tilápia a 10% da fração solúvel em água do biodiesel, durante o período de 24 horas, indicaram a fração solúvel contendo biodiesel de mamona como sendo a mais tóxica ($5,0 \pm 0,02$ mU/mg), seguido de OGR ($3,9 \pm 0,01$ mU/mg) e biodiesel de dendê ($2,4 \pm 0,01$ mU/mg) (Figura 2). A toxicidade foi evidenciada por mostrarem valores altos de fosfatase ácida no interior da célula, quando comparados ao controle ($1,6 \pm 0,01$ mU/mg) causado pela fragilidade da membrana lisossômica, que deixou escapar a enzima para o interior da célula. Segundo Ramos (comunicação pessoal), juvenis de tilápia submetidos a 10% das frações solúveis em água de diferentes formulações de gasolina (GAS 5, GAS 4, GAS 3, GAS 2, e GAS 1) mostraram resultados de atividade da fosfatase ácida de $24,4 \pm 4,1$ mU/mg, $23,9 \pm 4,0$ mU/mg, $22,1 \pm 3,9$ mU/mg, $17,2 \pm 3,2$ mU/mg e $14,9 \pm 2,8$ mU/mg, respectivamente, ainda mais tóxicos quando comparados aos encontrados para as diferentes formulações de biodiesel analisadas.

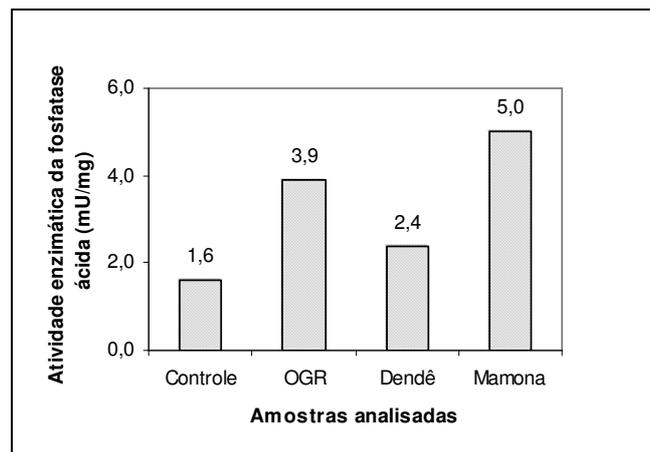


Figura 2. Valores médios da atividade da fosfatase ácida (mU/mg) em juvenis de *O. niloticus* submetidos a fração solúvel em água (FSA) de três tipos de biodiesel.

CONCLUSÃO

Os resultados dos testes de toxicidade utilizando *Oreochromis niloticus* como organismos-teste mostraram que, dentre as amostras analisadas, a fração solúvel contendo o biodiesel de mamona foi a mais tóxica, seguida das frações solúveis de OGR e de biodiesel do dendê.

REFERÊNCIAS

- API, RP 13H, First Edition, May 1, 1984. Drilling Fluid Bioassays; Federal Register, v. 50 no. 165, p.34631-34636, August 6, 1985.
- Andersch, M.A., Szcypinski, A.J..1947. Estimation of alkaline and acid phosphatase activities in normal human serum by using p-nitrophenol phosphate. *Am J Clin Pathol* 17: 571-574.
- Bradford, M.M..1976. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Carneiro, R.A.F..2003. A produção de biodiesel na Bahia. *Conj. & Planej.*, Setembro. Salvador: SEI, n.112, p.35-43.
- Nascimento, I. A., Leite, M.B.N.L., Martins, L.K.P., 2002. Uso de biomarcadores para diagnóstico ambiental: Proteínas de estresse e integridade da membrana lisossômica. In: *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Ind. Ltda., Salvador-Bahia, Brasil, v. 01, p.207- 216.
- Nascimento, I. A.; Pereira, S. A.; Leite, M.B.N.L. 2006. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição (Capítulo 17). In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds). (Org). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações*. 1ed. São Paulo: RIMA.2006.v. 1, p. 413-432.
- Ribeiro, S. K. 2006. Aposta no Biodiesel. *Scientific American Brasil*. Ano 5, nº 56. p.60-65.
- Rodrigues, L.E.A., Costa, M.F.D, Batista, P..1983. Biochemistry of *S.mansoni*; IV Effects of oxamniquine on the hepatic lysosomal activity. *Rev. Inst. Trop. São Paulo* 25:223-228.
- Rodrigues, L.E.A..1986. Papel dos lisossomos nos processos inflamatórios. Efeitos do íon sobre os componentes do compartimento lisossômico. Tese de Doutorado. Salvador, Bahia, Brasil.
- REDE BAIANA DE BIOCOMBUSTÍVEIS. **O BIODIESEL**, 2007. Disponível em: <<http://www.rbb.ba.gov.br/index.php?menu=obiodiesel>>. Acesso em: 01 de julho de 2007.
- Walker, C.H.; Holpkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B..1996. *Principles of Ecotoxicology*. Copyright Taylor e Francis Ltda. International Ltd Great Britain.