



# **HOLOTHURIA GRISEA (SELENKA, 1867) COMO BIOINDICADOR DA PRESERVAÇÃO AMBIENTAL**

**A.J.D.Cogo**

E.R.Pereira; A.C.Virgens; Z.M.A.Cruz

Centro Universitário Vila Velha, Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Complexo Biopráticas, Rua Com. José Dantas Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha/ES, Brasil, CEP: 29.102 - 770 Telefone: 55 27-3339 - 5906 antoniojesusdc@hotmail.com

## **INTRODUÇÃO**

A região costeira é um ecossistema caracterizado pelas inúmeras interações biológicas, químicas, físicas, geológicas e meteorológicas, que ocasionam migrações ou mudanças sazonais nos organismos presentes nesse ambiente (Jaramillo & McLachlan, 1993). O equilíbrio dessa população pode ser diretamente afetado pelas atividades antrópicas como a pesca predatória, a poluição termal e química e principalmente a descarga de efluentes domésticos e industriais. (Lercari & Defeo, 1999, Schmiegelow, 2004). Os organismos bentônicos são extremamente sensíveis à qualidade de seu ambiente e qualquer alteração pode resultar em modificações em seu metabolismo o que interfere na sua composição e estrutura corporais. Os invertebrados constituem 95% das espécies animais do ambiente e esta abundância populacional os tornam importantes nos estudos de impacto do ecossistema marinho.

A capacidade desses organismos em eliminar uma série de poluentes, constitui uma ferramenta importante no estudo do ambiente aquático em constantes pressões, principalmente, as resultantes do crescimento urbano. Pesquisas que abordam essa problemática são essenciais para a manutenção do equilíbrio, haja vista ser a água essencial para a vida assim como importante veículo de eliminação de poluentes (Shnurstein & Braunbeck, 2001).

A poluição da água por substâncias químicas como metais pesados e pesticidas liberadas pelas indústrias, pelo lixo urbano e pelas atividades agrícolas, estão entre os mais críticos problemas para a conservação do ecossistema aquático. A toxicidade dessas substâncias pode ser monitorada por meio das alterações morfológicas em indivíduos utilizados como indicadores, cujas alterações resultam das tentativas de adaptação e conservação das suas funções fisiológicas (Laurent and Perry, 1991).

Outro aspecto a ser considerado são os efeitos dessas substâncias químicas sobre atividade de enzimas utilizadas como marcadores, que estão diretamente relacionadas às defesas antioxidantes e alterações metabólicas, entre outros.

Gu Jing *et al.*, 2006), demonstraram a acumulação expressiva de cobre em glândula digestiva de *Pinctada fucata* e os efeitos do metal sobre a atividade de enzimas envolvidas com a defesa imune ( Fosfatase Ácida AcP), com a defesa antioxidante (Superóxido Dismutase SOD) e outras sensíveis a metal (Fosfatase Alcalina ALP).

A Fosfatase Alcalina (ALP) é uma enzima não específica, presente em vários órgãos, que desempenha uma série de atividades no organismo, entre as quais, a defosforilação de compostos orgânicos, a formação óssea e o transporte através da membrana.

*Holothuria grisea* (Holothuroidea Aspidochirotida) foi utilizada, no presente trabalho como bioindicador da poluição ambiental, no que se refere à contaminação do ambiente por metais pesados.

A manutenção do equilíbrio nos sistemas naturais passa pelas atividades de monitoramento que são essenciais para que tomadas de decisões corretivas e educacionais possam ser implantadas e desenvolvidas com sucesso (Krüger, 2001). O monitoramento, por sua vez, utiliza biomarcadores bioquímicos ou celulares, capazes de indicar a presença de contaminantes no meio ambiente, nos fluidos corporais, nas células ou tecidos (Livingstone, 1993).

## **OBJETIVOS**

Estabelecer parâmetros cinéticos para Fosfatase Alcalina de intestino de *Holothuria grisea*(Holothuroidea Aspidochirotida);

Avaliar as alterações enzimáticas em indivíduos submetidos a concentrações de cobre e chumbo;

Caracterizar a *Holothuria grisea* como bioindicador da poluição marinha.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1-Área de Coleta e Bioensaio

As Holothurians foram coletados na Praia de Santa Cruz, Município de Aracruz/ES, mantidas em água do mar e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, onde foram transferidas, aleatoriamente, para 07 aquários com capacidade de 5L. Um aquário, denominado controle, continha água do mar, três outros com concentrações de Sulfato de Cobre (0,05; 0,1 e 0,2 mg/L) e os três restantes com Acetato de Chumbo (0,05; 0,1 e 0,2 mg/L). Os aquários foram mantidos em constante aeração e o bioensaio desenvolvido em processo semi - estático, com trocas das soluções a cada 24 horas. Os indivíduos foram mantidos em ambiente climatizado e com foto período de 12 horas. Após 96 horas, as Holothurians foram anestesiadas com solução 0,01% de benzocaína para o procedimento de retirada do material biológico.

### 3.2-Extração enzimática

O material foi homogeneizado em Homogeneizador Elvehjem - Potter em 3 volumes de tampão Bicarbonato - ácido carbônico (relação p/v) 20mM, pH 9,2, contendo Fenil metano sulfon fluoride (PMSF) 5mM e centrifugado a 15,000xg à 4°C, em centrífuga refrigerada Sigma, durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas para os estudos cinéticos. Todos os ensaios bioquímicos foram realizados em triplicata, em aparelho Espectrofotômetro Spectro 22.

### 3.3-Determinação enzimática.

A Fosfatase Alcalina (ALP) foi determinada Segundo Barred (1972) e modificado para utilização de p - Nitrofenilfosfato (p - NPP) como substrato. O meio de reação continha 20mM Tampão Bicarbonato - ácido carbônico, pH 9,2; 100mM MgCl<sub>2</sub> e 100 mM p - NPP. As amostras foram incubadas durante 10 minutos à 25°C e a reação interrompida pela adição de 1M NaOH, seguida de centrifugação à 3000xg. As atividades foram determinadas à 405nm, seguindo - se a quantidade de p - nitrofenol formado. Uma unidade de enzima foi definida como quantidade de proteína enzimática necessária para proporcionar mudança na absorvância de uma unidade óptica por minuto nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

### 3.4-Determinação de proteína

A proteína foi quantificada segundo metodologia descrita por Lowry *et al.*, (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Todas as determinações foram desenvolvidas em triplicatas.

### 5.5 - Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as atividades enzimáticas entre grupos e no próprio grupo experimental seguido por teste multicomparativo de Tukey (Zar, 1996). O grau de significância aceita no presente trabalho foi  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Durante as 96 horas do bioensaio não ocorreram eviscerações ou quaisquer outras alterações entre as Holothurians expostas aos ambientes impactados em relação ao controle. Os indivíduos, quando separados, se reagrupavam após determinado tempo, e quando tocados, respondiam com a contração muscular característica do animal.

Em relação à literatura envolvendo estudos com o equinoderma e, particularmente, às cinéticas enzimáticas, poucos são os relatados, e em relação à Fosfatase Alcalina de intestino podemos afirmar a inexistência de qualquer resultado divulgado até a presente data. Portanto, para este estudo, foi necessário o estabelecimento de parâmetros cinéticos como Km da enzima para p - nitrofenil fostato assim como a determinação da temperatura e o pH ideais a serem utilizadas nos estudos enzimáticos.

O Km foi estabelecido em  $5,2 \times 10^{-4}$  M em presença de Mg<sup>2+</sup> e quando ensaiadas em variadas concentrações desse íon, os resultados experimentais mostraram a dependência ao Mg<sup>2+</sup>, de maneira que a atividade enzimática respondeu de forma positiva quando em presença 20mM de MgCl<sub>2</sub> ( $p \leq 0,05$ ). Por outro lado, o estudo da sensibilidade térmica demonstrou uma atividade máxima em 35°C, decrescendo gradativamente de atividade nas temperaturas de 36°C a 43°C. O valor estabelecido para o presente estudo ficou em torno de 24°C ( $24 \pm 0,10$ ), além do fato de qualquer determinação no pico máximo de temperatura ser extremamente arriscada devido a desnaturação protéica, apesar da enzima resistir até 36°C.

Outro parâmetro importante é o pH ótimo de atividade da enzima. A Fosfatase Alcalina apresentou um pH ótimo a 9,5, mantendo um percentual de 95 % de sua atividade quando ensaiada a pH=9,2, valor estabelecido para todos os ensaios no presente trabalho. As variações de pH parecem determinar a natureza cinética que a enzima exibe e pequenas mudanças na faixa de pH modificam sensivelmente a afinidade da enzima para com o seu substrato.

Outra característica da ALP está relacionada ao seu comportamento cinético quando em presença de várias concentrações de EDTA. Considerando - se a ação de metais sobre a Fosfatase Alcalina e da presença de cátions na composição da água do mar, a redução na atividade em presença de 1, 2, 4, 8 e 16 mM de EDTA sugere a estreita dependência do Mg<sup>2+</sup> como ativador. Os experimentos cinéticos de determinação da constante de Michaelis - Menten resultaram em acentuada redução de 62% na velocidade máxima da reação.

A verificação do efeito inibitório de cobre e chumbo sobre a atividade fosfatásica da ALP, foi efetuada com a enzima parcialmente purificada. Os ensaios foram realizados em concentração de substrato, temperatura, pH e concentração de Mg<sup>2+</sup> como previamente estabelecidos. Os resultados obtidos demonstraram redução da atividade em todas as concentrações dos metais, quando comparadas com amostra controle. Estudos apontaram que as concentrações de 0,2mg/L de cobre foram mais efetivas quando comparadas com as concentrações menores, o que contradiz alguns autores que relataram um processo de ativação em concentração de 5  $\mu$ M de Cu<sup>2+</sup> para fígado de peixe (Atli and Canli, 2007). Efeitos similares foram observados para o tratamento com Pb<sup>2+</sup>, nos quais o aumento da concentração resultou em maior percentual de inibição. Não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento com cobre e chumbo, porém as atividades foram reduzidas, de forma gradativa, com o aumento da concentração dos íons inibidores.

## CONCLUSÃO

A Fosfatase Alcalina de intestino de *Holothuria grisea* apresenta dependência de temperatura e pH não muito diferentes daqueles já conhecidos para a mesma enzima de intestino de peixes. Entretanto, quando comparado o valor de Km e a dependência de íon Mg<sup>2+</sup>, os valores são maiores daqueles conhecido para outros animais, sugerindo a dependência do íon apesar da água do mar conter concentrações de magnésio em sua composição. Este comparativo foi confirmado com a presença de agente quelante no meio de reação. Por outro lado, a ALP é enzima sensível a metais, e a presença de cobre e chumbo no ambiente experimental, resultou em inibições significativas o que permite o uso da *Holothuria* como indicador de poluição marinha.

Agradecemos ao Centro Universitário Vila Velha - UVV pelo financiamento do projeto

## REFERÊNCIAS

- Atli,G, Canli,M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 145, 282 - 287.
- Krüger, L.E. 2001. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*. Editora da UFPR. 4, p37 - 43.
- Gu Jing, Yu Li, Xie, L., Zhang, R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 144, 184 - 190.
- Jaramillo, E.; McLachlan, A. 1993. Community and population responses of the macroinfauna to physical factors over a range of exposed sandy beaches in south - central Chile. *Est. Coast. and Shelf Science*. 37: 615 - 624.
- Laurent, P, and Perry, S.F. 1991. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.* , 53, 4 - 25.
- Lercari, D.; Defeo, O.; Celentano, E. 2002. Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 1397 - 1404.
- Livinstone,D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57,195 - 211, 1993.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr,A.L.; Randall,R.J. - 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Schmiegelow, J. M. Miragaia. 2004. *O Planeta Azul. Uma introdução às Ciências Marinhas*. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 202pp.
- Schnurstein,A., Braunbeck,T. Tail moment versus tail length. Application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Eotoxicol. Environ. Saf.* 49, 187 - 196, 2001.
- Zar, H. J. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4 ed. Prentice - Hall, New Jersey. p. 663.