PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM EISENIA ANDREI EXPOSTAS A SOLO CONTAMINADO

Jéssica Tais KERKHOFF[1], Guilherme Eduardo Mörschbacher GABRIEL[2], Emerson FINKEN[2], Roberta LISBÔA[3], Andressa De Oliveira SILVEIRA[4], Bárbara CLASEN[5].

[1] Bolsista de iniciação científica CNPq. Curso de Bacharelado em Agronomia. Unidade em Três Passos. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS); [2]Discente do curso de Bacharelado em Agronomia – UERGS. Unidade em Três Passos. [3]Mestranda em Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental (PPGEAMB). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); [5]Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); [5]Professora Orientadora. UERGS Unidade Três Passos. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

E-mails: jessica_kerkhoff@hotmail.com; guilhermegabrieledu@hotmail.com; emersons.finken@hotmail.com; roberta.piardi@gmail.com; aosilveira@hotmail.com; ba.clasen@hotmail.com.

Resumo

O descarte inadequado de efluentes domésticos pode resultar em inúmeras consequências negativas, tais como efeitos nocivos à saúde humana e à biota, incluindo fauna edáfica, resultam na necessidade de investigação, monitoramento e remediação dessas áreas. Considerando a importância ecológica e o potencial indicador das minhocas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do lançamento de efluente sanitário no solo de uma área, em oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*, através dos biomarcadores: catalase (CAT) e peroxidação lipídica (TBARS). Os solos contaminados causaram mudanças significativas nos parâmetros avaliados. Observou-se um incremento na atividade da enzima CAT como mecanismo de defesa antioxidante. O aumento apresentado nos níveis de TBARS, indica a ocorrência de peroxidação lipídica da membrana celular em decorrência dos contaminantes presentes no solo da área contaminada.

Palavras Chave: Biomarcadores; *Eisenia Andrei*; Efluentes.

INTRODUÇÃO

A deposição de efluentes domésticos no solo é uma prática muito antiga. No entanto, ainda não se tem muitas informações em relação ao potencial contaminante que tal sistema possui. Devido a isso, a aplicação de efluentes no solo não deve ser feita de forma indiscriminada, sem controle (MEHNERT, 2003).

Considerando o potencial de contaminação dos efluentes domésticos, tem-se utilizado para a avaliação de contaminação de solo, inúmeros parâmetros, tais como testes de comportamento e reprodução, ensaios ecotoxicológicos e a utilização de biomarcadores.

A utilização de biomarcadores, visa a quantificação de parâmetros a nível de organismos para avaliar a influência dos contaminantes sobre vias enzimáticas e bioquímicas específicas. Deste modo, permitindo a associação entre agentes tóxicos e o comprometimento dos mecanismos de regulação fisiológica (OLIVEIRA, 2014).

Dentre os parâmetros utilizados como biomarcadores estão, os de estresse oxidativo, e a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes. Este processo decorre de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Isso leva a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo contra células e tecidos (BARBORA et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante atua através da regulação das defesas, impedindo previamente que as ERO causem danos à célula. Esse sistema inclui a enzimas catalase (CAT).

A enzima superóxido dismutase metaboliza o ânion superóxido (O2-) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H2O2), que é então desativado pelo CAT, evitando assim, o dano oxidativo (NOVAIS et al., 2011).

A peroxidação lipídica das membranas celulares ocorre devido ao estresse oxidativo, a extensão dessa lesão pode ser medida através dos níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrio, que corresponde ao malondialdeído (MDA), que é o produto da degradação peroxidativa de lipídios das membranas (NUNES et al., 2006).

Frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, a espécie *Eisenia andrei* é indicada devido apresentar, alta taxa de reprodução, ciclo de vida curto, fácil manutenção em laboratório, além da boa sensibilidade a uma ampla gama de substância tóxicas (SHI et al., 2017), sendo indicadas como organismo padrão em testes de toxicidade em protocolos internacionais (ISO, 2012).

Deste modo, tendo em vista o alto potencial de contaminação de efluentes domésticos, e que em inúmeras situações este resíduo é depositado no solo sem nenhum tratamento prévio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do lançamento de efluente sanitário no solo de uma área, em oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*, através dos biomarcadores: catalase e peroxidação lipídica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em uma área localizada em Santa Maria/RS, com cerca de, 1.700 m². O lançamento de efluentes nessa área se dá por quatro tubulações denominadas fontes pontuais: FP-31, FP-32, FP-31A e FP-50, e tem características similares ao do esgoto doméstico, sendo previamente tratado em tanque séptico seguido de filtro anaeróbico.

O efluente das fontes pontuais escoa até alcançar uma área de acúmulo no solo. Logo após, ocorre à saída de esgoto da zona saturada por um canal de drenagem (CDE) que é um canal que escoa até encontrar a Sanga Lagoão do Ouro, tributário do rio Vacacaí Mirim.

Foram amostrados seis pontos na área de estudo por meio de coletas simples, na profundidade de 0-15 cm. Em cada tratamento foram utilizadas 500 gramas de solo coletado de cada ponto de amostragem, colocados em recipientes de 2L, em cada recipiente utilizou-se 10 minhocas de espécie *Eisenia andrei* com peso entre 400 a 600 mg. A umidade do solo foi mantida em 30±5% da capacidade máxima de retenção de água, temperatura em 20±2 °C e fotoperíodo natural.

O trabalho foi constituído de seis tratamentos, e três repetições cada. Durante o ensaio, os organismos foram alimentados com 5 g de esterco bovino.

Para a determinação dos biomarcadores, os organismos foram expostos às amostras de solo por 28 dias. De duas a três minhocas foram coletadas de cada unidade no 3º, 7º, 14º e 28º dia de experimento. Posteriormente, as minhocas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80ºC até realização das determinações enzimáticas.

Para os ensaios foram preparados homogeneizados do corpo da minhoca com tampão de fosfato de potássio (TFK, 20 mM), CAT e TBARS. Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 rpm durante 15 min. O sobrenadante resultante foi armazenado a -20°C para as determinações bioquímicas.

A atividade do CAT foi ensaiada espectrofotométricamente (NELSON E KIESOW, 1972). A mistura de ensaio consistiu em TFK (50 Mm), H2O2 (0,3 M) e homogeneizado. A alteração da absorbância de H2O2 foi medida à 240 nm. A atividade CAT foi expressa em µmol/min/mg de proteína.

A peroxidação lipídica foi estimada pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), por uma reação de malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), e medida por espectrofotometria de acordo com Buege e Aust (1978). A mistura da reação foi colocada num tubo de centrifuga e incubada durante 15 minutos a 95° C. Após arrefecimento,

foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos e a densidade óptica medida por espectrofotometria à 535 nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol MDA / mg proteína.

Após a obtenção dos resultados das variáveis toxicológicas, os dados foram submetidos a análise utilizando a linguagem e ambiente R Core Team – Versão 3.3.1 (AUSTRIA, 2016). Para todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade da enzima catalase (figura 1), em seu 3° dia de exposição, apresentou uma baixa atividade da enzima nos pontos P1 e P2, enquanto P3 apresentou mediana de 5,34, sendo estatisticamente maior que o solo controle (P6). Aos 7 dias de exposição, a atividade da CAT nas minhocas foi bastante variável, as maiores medianas apresentadas foram nos pontos P1, P3 e P5, no entanto, foram semelhantes ao do controle (P6), não diferindo estatisticamente. Aos quatorze dias de exposição, a atividade de CAT foi significativamente superior ao do solo controle nos pontos P1 e P2. Já no dia 28 os pontos P1 e P3 apresentaram maior e menor atividade de CAT quando comparados ao solo controle.

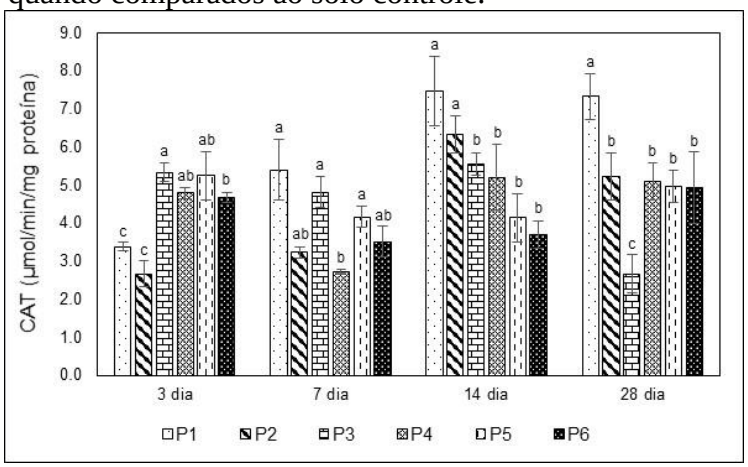

Figura 1: Atividade de catalase em *Eisenia andrei* expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário.aos 3, 7 dias, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam $p \leq 0,05$.

Inicialmente, os pontos P1 e P2, registraram valores baixos da atividade da CAT em comparação ao controle. Após o 7° dia houve uma recuperação até o 28° dia. O efeito mais comum de CAT contra uma situação tóxica é a indução de atividade que é considerada benéfica para lidar com uma condição de estresse, ou seja, é uma adaptação metabólica à exposição contínua ao solo contaminado e uma resposta de defesa contra danos oxidativos (WANG et al., 2012)

A atividade da catalase nos pontos P3, P4 e P5 foi diminuindo gradualmente seus valores até o dia 28°. Isso pode ser justificado, tendo em base que a defesa natural antioxidante foi saturada, devido a quantidade gerada de espécies reativas de oxigênio exceder a capacidade de defesa do organismo, ocasionando a redução gradual na atividade da enzima (WANG et al., 2012; ZHOU et al., 2016).

O efeito do solo da área contaminada sobre a peroxidação lipídica foi determinada pela avaliação do teor de MDA nos organismos (figura 2). No 3° dia de exposição foi observada diferença significativa na peroxidação lipídica. Todos os pontos de amostragem analisados apresentaram valores superiores ao do solo controle.

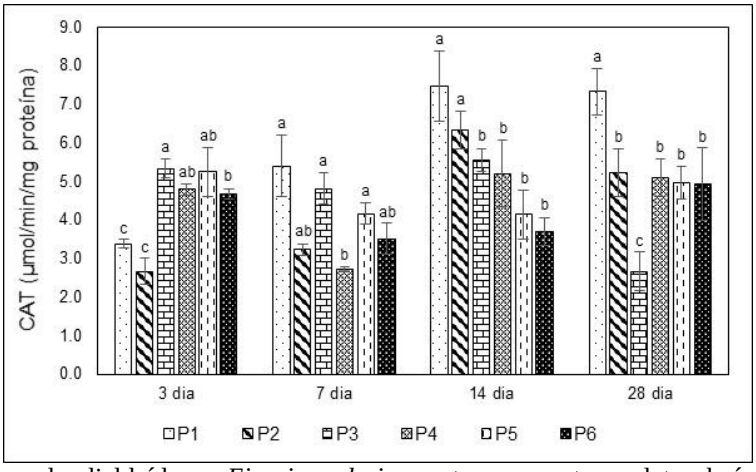

Figura 2: Níveis de malondialdeído em *Eisenia andrei* expostas as amostras coletas de área contaminada por efluente sanitário aos 3, 7, 14 e 28 dias de exposição. As barras representam as medianas e as linhas verticais o erro padrão (n = 6). Diferentes letras acima das barras indicam $p \leq 0,05$.

De modo geral, nos níveis de atividade das enzimas antioxidantes ocorreu um aumento significativo, e não a inibição destas. Esse aumento, indica respostas adaptativas dos organismos para neutralizar os efeitos tóxicos das espécies reativas geradas.

Nota-se, de maneira geral, que ocorreu um aumento significativo dos níveis de CAT nos pontos P1 e P2. Isso demostra a reação em cadeia do estresse oxidativo, ou seja, o radical superóxido foi convertido pela CAT em H2O2 e O2, indicando respostas adaptativas dos organismos para neutralizar o efeito oxidativo das ERO geradas (NOVAIS et al., 2011), o qual sugere mecanismo de desintoxicação.

A acumulação de espécies reativas, aliado a elevação das atividades de CAT, pode ser observado no aumento dos níveis do malondialdeído, indicando que ocorreu dano oxidativo. No entanto, não ocorreu nenhum aumento adicional no MDA, em relação ao controle no dia 28. Isso pode estar associado a um dano extremo que ocorreu na membrana celular que pode ter levado à sua ruptura e, consequentemente, a níveis mais baixos de peroxidação lipídica, como é o caso do P3; ou ainda, uma tentativa dos organismos para eliminar o fator de estresse e recuperar o estado oxidativo padrão (NOVAIS et al., 2011).

A reprodução diminui as defesas antioxidantes e, portanto, o estresse oxidativo representa um custo de reprodução, indicando uma ligação entre os ensaios crônicos e a susceptibilidade ao estresse oxidativo (ALONSO-ALVAREZ et al., 2004). De fato, isso ocorreu, visto os pontos de amostragem que obtiveram danos reprodutivos, por sua vez, também induziram alterações nas respostas bioquímicas, sugerindo uma ligação entre os ensaios, no entanto, maiores estudos são necessários para averiguar e confirmar esses mecanismos.

As maiores alterações nas respostas toxicológicas foram observadas nos pontos amostrados P1, P4 e P5, e são nestes pontos que ocorreram as maiores concentrações de Cu e Zn.

As alterações dos biomarcadores eram esperadas para os pontos com os maiores teores de Cu e Zn, o que se confirmou. No entanto, nos pontos P2 e P3, os quais apresentaram as menores concentrações desses metais, porém as maiores de Fe e Mn, foi expressiva a atividade da CAT ao longo do tempo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos biomarcadores demostraram que a exposição a solos com misturas de contaminantes provocaram efeitos adversos nos biomarcadores analisados.

O aumento na atividade da enzima CAT das minhocas expostas aos solos, evidencia o mecanismo de defesa dos organismos em resposta ao estresse causado pelos contaminantes presentes na área contaminada.

O aumento nos níveis de MDA demonstraram a peroxidação lipídica ocasionada na membrana celular das minhocas em decorrência da exposição ao solo contaminado, porém o sistema de defesa antioxidante impediu danos ao longo do tempo.

AGRADECIMENTOS: este estudo foi financiado pelo CNPq e contou com bolsa PROBIP/UERGS.

REFERÊNCIAS

ALONSO-ALVAREZ, C.; BERTRAND, S.; DEVEVEY, G.; PROST, J.; FAIVRE, B.; SORCI, G. *Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction.* Ecology Letters, v. 7, p. 363–368, 2004.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. *Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 73, n. 3, p. 320-325, 2010.

ISO. Internacional Organization for Standardization. ISO 11268-2: Soil quality -- *Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)* - Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva, 2012, 21 p.

LISBÔA, Roberta de Moura et al. *Avaliação toxicológica de solo contaminado com efluente sanitário. 2017.*

MEHNERT, Dolores Ursula. *Reúso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos*. Instituto Biológico, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 19-21, 2003.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. *Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 1C (with molar extinction coefficients of H2O2 solution in the UV).* Analytical Biochemistry. v. 49, p. 474–478, 1972.

NOVAIS, S. C.; GOMES, S. I. L.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; COEN, W.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. *Reproduction and biochemical responses in Enchytraeus albidus (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures*. Environmental Pollution, v. 159, p. 1836-1843, 2011.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. *Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean Artemia parthenogenetica*. Chemosphere, v. 62, p. 581 – 594, 2006.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals nº 222: Earthworm reproduction test. Paris, 2004. 18 p

OLIVEIRA, L. L. D. *Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos.* Diss. Universidade de São Paulo, 2014.

Oliveira, Laira Lúcia Damasceno de. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. Diss. Universidade de São Paulo, 2014.

R CORE TEAM. R: *A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22 abr. 2019.

SHI, Z.; TANG, Z.; WANG, C. *A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment.* Environmental Science and Pollution Research, v. 24, p. 13284–13294, 2017.

WANG, J.; ZHU, L.; LIU, W.; WANG, J.; XIE, H. *Biochemical responses of earthworm (Eisenia foetida) to the pesticides chlorpyrifos and fenvalerate*. Toxicology Mechanisms and Methods, v. 22, n. 3, p. 236–241, 2012.

ZHOU, D.; NING, Y.; WANG, B.; WANG, G.; SU, Y.; LI, L.; WANG, Y. *Stud y on the infl uenti al factors of Cd2+ on the earthworm Eisenia fetida in oxidative stress based on factor analysis approach*. Chemosphere, v. 157, p. 181-189, 2016.