

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**ACUMULAÇÃO DE METAIS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA NO CORAL ENDÊMICO
BRASILEIRO *Mussismilia hispida* SOB
INFLUÊNCIA DO RIO BURANHÉM, BAHIA**

ANDREW JAMES TAYLOR

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal do
Rio Grande – FURG, como requisito
parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Dr. Adalto Bianchini

**RIO GRANDE
Dezembro de 2016**

Agradecimentos

First and foremost I would like to thank my beautiful fiancée, best friend, and partner in every step of life, Marina Marinho Novazzi. Without whom this entire chapter in Brazil would be impossible, and from whom I have learned so much, I am incredibly grateful and lucky.

To my entire family in Australia, including the two newest members Sebastian and Myah (who I am yet to meet), for supporting my overseas journey and keeping close contact along the way.

To the Marinho and Novazzi families, for welcoming me with open arms and putting in so much effort to make me feel at home. All the experiences have been invaluable, and I am lucky to have such a special Brazilian family.

To Joseane Marques and Laura Marangoni for providing support above and beyond in every moment. From the first chance meeting in our apartment building and their orchestrating my inclusion in this research group, to helping coordinate so much of my Masters degree, I am greatly appreciative. A special thanks to Josi for so much wisdom and help with statistics!

To Adalto Bianchini, for selflessly giving me this great opportunity within his research team, and taking the time from a busy schedule to help along the way.

To Patricia da Costa and Ana Laura for tireless efforts in the toxicology labs, and Juliana Fonesca for constant help with analyses. Especially to Pati, who is one of the most dedicated and hard-working people I have met.

To all the colleagues of the ICB, who are some of the friendliest and most helpful people I know.

To the many friends in Cassino and FURG, who have coloured my time in Brazil with memories that I'll never forget.

To Jordan Lim, Jason Cooke, and Samuel Evans, for all the Skype support and updates of home.

To Samuel "Samuca" and the Fisiobol team, for the comradery and great times playing futebol on Thursdays and Sundays.

To the people at Coral Vivo, who are conducting a great and necessary work in Brazil.

For all the teachers at FURG who accommodated a primarily Portuguese-illiterate student into their midst. You have all helped with language, knowledge and my personal development with patience and understanding.

And finally, to the financial support groups who provide salaries for researchers to help develop necessary literature in this great country.

Sumário

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos Gerais.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Coleta de material biológico.....	11
3.2 Análise de metais.....	13
3.3 Atividades enzimáticas.....	13
3.4 Análises estatísticas.....	15
4. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	16
4.1 Concentração de metais traço (Cu, Cr, Cd, Pb).....	16
4.1.1 Concentração de metais no tecido de <i>M. hispida</i>	16
4.1.2 Concentração de metais nos esqueletos de <i>M. hispida</i>	17
4.2 Atividade da Ca^{2+} -ATPase.....	17
4.3 Atividade da anidrase carbônica (AC).....	18
5. CONCLUSÕES.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
7. ANEXO – Manuscrito para submissão ao periódico Coral Reefs.....	24

RESUMO

O presente estudo avaliou as concentrações de metais e atividade de enzimas relacionadas à calcificação no coral *Mussismilia hispida* coletado em distâncias variáveis de uma fonte de poluição de rio ainda pouco caracterizada. Os corais foram coletados em 5 locais no Parque Natural Municipal do Recife de Fora (PNMRF) à uma distância crescente (2; 4; 6; 8 e 9,4 km) em relação à desembocadura do Rio Buranhém. As coletas foram realizadas em Agosto 2013, Dezembro 2013, Fevereiro 2014 e Maio 2014, representando assim variações sazonais. As concentrações de Cu, Cd, Cr e Pb foram determinadas nas amostras de tecido e esqueleto do coral *M. hispida*, em conjunto com análise das atividades de enzimas relacionadas à calcificação [Ca^{2+} -ATPase e anidrase carbônica (AC)]. Os metais analisados foram detectados nos corais de todas as áreas de estudo, sendo o local de coleta um fator significativo quanto às concentrações de metais bioacumulados. Os resultados sugerem que o Rio Buranhém é uma fonte de contaminação para o PNMRF, apresentando maior grau de influência em regiões mais próximas à sua desembocadura. A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi menor em corais dos locais mais próximos à desembocadura do Rio Buranhém, enquanto a atividade da AC foi maior nestes corais. Estes resultados indicam que as taxas de calcificação podem estar reduzidas nos corais coletados nas regiões mais próximas à desembocadura do Rio Buranhém. Por sua vez, a maior atividade da AC observada nestes corais pode indicar uma resposta compensatória às condições da água do mar, além daquelas aqui avaliadas. O presente estudo fornece evidências de contaminação por metais no PNMRF e sugere a realização de estudos futuros para melhor caracterizar a contaminação nessa região, bem como os impactos biológicos decorrentes da mesma.

Palavras-chave: bioacumulação, corais, enzimas, metais, *Mussismilia hispida*

ABSTRACT

The present study determined metal concentrations and the activity of calcification-related enzymes within *Mussismilia hispida* corals collected at varying distances from an uncharacterized river-based source of pollution. Corals were collected from five locations in the Parque Natural Municipal do Recife de Fora (PNMRF) of increasing distance (2; 4; 6; 8 and 9.4 km) from the Buranhém River mouth. Collections were conducted in August, December, February, and May, representing seasonal variation. Concentrations of Cu, Cd, Cr, and Pb in both skeleton and tissue samples of *M. hispida* were assessed, along with the activities of enzymes related to calcification [Ca^{2+} -ATPase and carbonic anhydrase (CA)]. Metals were detected in corals at all locations, and collection location was a significant factor with respect to bioaccumulated metal concentrations. Results suggest the Buranhém River is a source of contamination for the PNMRF with a distance dependent influence. Activity of Ca^{2+} -ATPase was significantly decreased in corals from locations closer to the Buranhém River mouth, while CA was significantly increased in these corals. Enzyme responses from *M. hispida* indicated calcification rates may be reduced closer to the Buranhém River mouth, while up-regulation of CA may indicate a compensatory response to seawater conditions, which remains beyond the scope of this work. The present study provides evidence for metal contamination in the PNMRF and encourages further studies to better characterize this important location.

Keywords: metals, corals, bioaccumulation, *Mussismilia hispida*, enzymes

1. INTRODUÇÃO

Os recifes de coral estão enfrentando a ação de estressores globais e locais, que podem promover danos biológicos, desde um nível organizmico até ecossistêmico (Hughes et al. 2003; Veron et al. 2009; Hoegh-Guldberg and Bruno 2010; Bongaerts et al. 2011; Nikinmaa 2013). A poluição do habitat associada ao desenvolvimento costeiro representa atualmente um importante estressor aos recifes de coral. É importante caracterizar a contaminação e a dinâmica de resposta fisiológica *in situ* para permitir um manejo efetivo dos recifes de corais, especialmente em regiões que carecem de estudos específicos (Diaz and Rosenberg 2008; Wilkinson and Salvat 2012; Hoegh-Guldberg 2015).

Os recifes brasileiros apresentam baixa diversidade quando comparados aos recifes do Caribe e Indo-Pacífico. Também carecem de corais escleractíneos ramificados em favor das espécies endêmicas, massivas e incrustantes (Castro and Pires 2001). Os recifes de corais cobrem mais de 900 km da costa da Bahia e são ecologicamente importantes devido a diversos fatores, inclusive a presença de espécies endêmicas do gênero *Mussismilia* (Leão and Ginsburg 1997; Leão et al. 2003). As espécies *M. harttii*, *M. braziliensis* e *M. hispida* são as principais construtoras dos recifes coralíneos brasileiros, os quais representam os únicos recifes de corais verdadeiros do Atlântico Sul (Leão and Ginsburg 1997; Marangoni 2014).

O coral *M. hispida* emprega o método de desova “broadcast-spawning” como um modo primário de reprodução, sendo sequencialmente hermafrodita (Neves and Pires 2002). Este coral demonstra uma das maiores distribuições espaciais entre as espécies endêmicas brasileiras, com populações ocorrendo desde o Atol das Rocas (região Nordeste) até Santa Catarina (Leão et al. 2003). *M. hispida* é um coral maciço com pólipos grandes e é considerado um importante construtor de estruturas para os

recifes de coral brasileiros (Leão et al. 2003). No entanto, estudos recentes têm observado um aumento na prevalência de estressores neste gênero, incluindo doenças como "white-band disease" e episódios de branqueamento (Leão et al. 2003). De fato, um declínio significativo na cobertura de corais está previsto para os próximos 50 anos (Francini-Filho et al. 2008). Por outro lado, estratégias efetivas de manejo estão atualmente inibidas pela falta de conhecimento a respeito da dinâmica da poluição e da saúde do ecossistema na área em questão.

Rios e córregos contaminados pelas atividades associadas à agricultura, indústria e ao desenvolvimento urbano constituem uma fonte comum de poluentes para a zona costeira (van Dam et al. 2011). Como resultado destas atividades, rios poluídos podem introduzir vários contaminantes, incluindo metais, diretamente em ambientes costeiros (Peters et al. 1997; Ščančar et al. 2000; Grillo et al. 2001). O Rio Buranhém é um exemplo importante da poluição associada a rios, ocorrendo próximo ao *Parque Natural Municipal do Recife de Fora* (PNMRF). O PNMRF está localizado à aproximadamente 8 km da desembocadura do Rio Buranhém, na costa da cidade de Porto Seguro (Sul do estado da Bahia). Esta cidade apresenta uma população de aproximadamente 120.000 habitantes e é visitada anualmente por mais de 1,3 milhões de turistas. No PNMRF existe um complexo recifal de aproximadamente 17,5 km², sendo este parque a primeira unidade de conservação marinha municipal criada no Brasil. Por sua vez, o rio Buranhém faz parte da maior bacia hidrográfica da região. Este rio nasce em Minas Gerais, cruza as cidades de Eunápolis e Porto Seguro e deságua no Oceano Atlântico, no sul da Bahia (Fig. 1) (Sarmiento-Soares et al., 2008).

A indústria metalúrgica, as refinarias de petróleo e as fontes de esgotos domésticos estão presentes nas áreas em torno do Rio Buranhém, representando

possíveis fontes de contaminação (Silva et al, 2015). Geralmente, a contaminação costeira associada aos rios segue um gradiente decrescente a partir da fonte de poluição, e pode ser afetada pela sazonalidade (Costa et al. 2008; Wear and Thurber 2015). Há poucos dados sobre a dinâmica de poluição do rio Buranhém e os sistemas de recifes afetados pela influência da pluma deste rio. Alguns estudos anteriores já observaram um aumento nas concentrações de nutrientes, sedimentos e mudanças na fauna bentônica em áreas do PNMRF, próximo à foz do rio (Costa et al. 2008; Oliveira-Silva 2008; Arantes 2012). Porém, nenhum estudo ainda avaliou os efeitos fisiológicos em relação à influência do Rio Buranhém em espécies endêmicas de coral, embora se saiba que o comprometimento da qualidade da água e, especialmente, a contaminação por metais pode afetar a saúde dos recifes de coral (Howard and Brown 1984; Fabricius 2005; van Dam et al. 2011; Wear and Thurber 2015).

Os corais têm sido usados no passado em observações das condições ambientais, uma vez que muitos contaminantes podem ser acumulados no esqueleto ou nos componentes teciduais dos corais (El Nemr et al. 2004; Ali et al. 2011; van Dam et al. 2011). Tem sido demonstrado que metais presentes na coluna d'água se acumulam nas zooxantelas simbiotes e nos tecidos vivos dos corais escleractíneos (Anu et al. 2007; Bielmyer et al. 2010). Indivíduos coralíneos podem incorporar metais no seu esqueleto e, conseqüentemente, nos seus tecidos via alimentação por filtração de sedimentos ou metais particulados, o que pode resultar em efeitos deletérios (van Dam et al. 2011). A incorporação de metais no esqueleto ocorre principalmente no meio de calcificação, onde os íons metálicos (Me) podem substituir o íon cálcio (Ca^{2+}) na reação de calcificação (Eça et al. 2012): $\text{CaCO}_3(\text{s}) + \text{Me}^{2+}(\text{aq}) \leftrightarrow \text{MeCO}_3(\text{s}) + \text{Ca}^{2+}(\text{aq})$. A taxa de incorporação do metal e o conseqüente impacto fisiológico

variam em função da espécie, bem como entre o esqueleto e os componentes dos tecidos vivos (Anu et al. 2007).

Os metais podem se acumular no esqueleto dos corais provavelmente em resposta à exposição de longo prazo (Howard and Brown 1984). De fato, os corais têm sido cada vez mais reconhecidos como indicadores ambientais, sendo que um grande número de estudos usa estes organismos para avaliar as condições da água do mar (Ščančar et al. 2000; Reichelt-Brushett and McOrist 2003; Yu et al. 2005; Lewis et al. 2007; Rosales-Hoz et al. 2009; Ali et al. 2011). Neste contexto, a análise da acumulação de poluentes nos corais pode auxiliar na avaliação das condições da água do mar. Os efeitos da contaminação de metais são relativamente bem documentados (van Dam et al. 2011). Têm sido observados efeitos negativos no sucesso de fertilização de gametas, atividade do fotossistema II, assentamento larval, bem como maiores taxas de branqueamento e mortalidade nos corais expostos à metais (van Dam et al. 2011). No entanto, informações relacionadas à bioacumulação destes contaminantes e as respostas enzimáticas decorrentes deste fenômeno são escassas.

A calcificação representa um dos principais processos fisiológicos em corais, e alterações associadas a ele podem ser utilizadas como biomarcadores da saúde de organismos calcificadores (Bielmyer et al. 2010; Marangoni 2014). Particularmente, as atividades da Ca^{2+} -ATPase e da anidrase carbônica (AC) estão associadas ao processo de calcificação nos corais escleractíneos (Al-Horani et al. 2003; Meibom et al. 2004; Bertucci et al. 2013). Portanto, podem ser utilizadas como biomarcadores da saúde dos corais.

A Ca^{2+} -ATPase é uma importante enzima que direciona a reação de calcificação ($\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + 2\text{H}^+$) no sentido da formação do carbonato de cálcio (CaCO_3), o qual é fundamental para a construção das estruturas tridimensionais dos

recifes de corais (Al-Horani et al. 2003; Dove et al. 2013). A Ca^{2+} -ATPase transporta ativamente íons cálcio (Ca^{2+}) para o interior do sítio de calcificação, ao mesmo tempo que remove íons de prótons (H^+). Isto fornece uma fonte de Ca^{2+} e subsequentemente mantém um pH alcalino, o qual facilita a difusão passiva de CO_2 para o sítio de calcificação (Al-Horani et al. 2003). O processo enzimático apresentado acima é regulado e dependente de energia, sendo crítico para a calcificação. No entanto, este processo pode ser inibido quando exposto a metais.

A AC é uma enzima que catalisa a hidratação reversível de dióxido de carbono (CO_2) em bicarbonato (HCO_3^-) e prótons (H^+), provendo assim o holobionte com uma fonte de carbono inorgânico (Bertucci et al. 2013). Por sua vez, este carbono inorgânico é usado na fotossíntese pela zooxantela simbiote e no processo de calcificação pelo coral hospedeiro (Al-Horani et al. 2003). A atividade da AC já foi relatada como sendo inibida por metais pesados (Gilbert and Guzmán 2001; Bielmyer et al. 2010).

Considerando a importância ecológica e econômica dos recifes brasileiros e a ocorrência de espécies endêmicas na Bahia, bem como o potencial impacto que esses ecossistemas estão sofrendo como decorrência dos efeitos da poluição de origem continental, torna-se extremamente importante a realização de avaliações da atual qualidade da água e os efeitos associados desta condição na saúde dos corais. Neste contexto, o presente estudo visa avaliar a influência espacial e temporal do Rio Buranhém (Porto Seguro, BA) na bioacumulação de metais no coral *M. hispida*. Além disso, se propõe a avaliar possíveis relações entre a atividade de enzimas envolvidas no processo de calcificação no coral *M. hispida* e o local de coleta, a estação do ano e a bioacumulação de metais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a influência espacial e temporal do Rio Buranhém na acumulação dos metais no coral *M. hispida*;
- Avaliar a relação entre a atividade de enzimas envolvidas na calcificação no coral *M. hispida* e o local de coleta, a estação do ano e a bioacumulação de metais.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a relação entre a distância dos locais de coleta a partir da desembocadura do Rio Buranhém e a acumulação de Cu, Cr, Cd e Pb em amostras de tecidos e esqueleto do coral *M. hispida*;
- Determinar a relação entre a distância dos locais de coleta a partir da desembocadura do Rio Buranhém e as atividades da Ca^{2+} -ATPase e da anidrase carbônica no coral *M. hispida*;
- Determinar as relações entre a acumulação de Cu, Cr, Cd e Pb e as atividades da Ca^{2+} -ATPase e da anidrase carbônica nos tecidos e no esqueleto do coral *M. hispida*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material biológico

Amostras de corais (n) foram coletadas em cinco locais (L) na região do PNMRF [L1: Recife de Itassepocu (16°25'54,1"S - 039°02'24,2"W); L2: Pedra Carapindaúba (16°25'43,0"S - 039°01'29,9"W); L3: Ponto Intermediário (16°25'41,6"S - 039°00'24,5"W); L4: Recife de Fora (SW) – (16°25'06,1"S - 038°59'27,0"W); e L5: Recife de Fora (NW) – (16°23'31,6"S - 038°59'03,0"W)] a

aproximadamente 4 m de profundidade (Fig. 1). Para dados de condições nestes locais, consultar o Banco de dados do Projeto Coral Vivo (Porto Seguro, BA). A amostragem foi realizada em diferentes períodos (C), representando assim as variações sazonais (C1: Agosto/2013, C2: Dezembro/2013, C3: Fevereiro/2014, e C4: Maio/2014). As amostras foram coletadas por mergulho autônomo e utilizando um amostrador do tipo “core” de 12 mm de diâmetro. Quatro amostras de *M. hispida* foram coletadas em cada um dos cinco locais e em cada tempo amostral ($n = 4$, $L = 5$, $C = 4$), perfazendo um total de 80 amostras. Imediatamente depois de retiradas da colônia doadora, e ainda durante o mergulho, as amostras foram acondicionadas em criotubos de 5 ml. Na embarcação, a água dos criotubos foi drenada. Os tubos foram mantidos sob refrigeração e transportados até a base de apoio do Projeto Coral Vivo em Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, BA), onde foram congeladas (-80°C) para posterior análise.

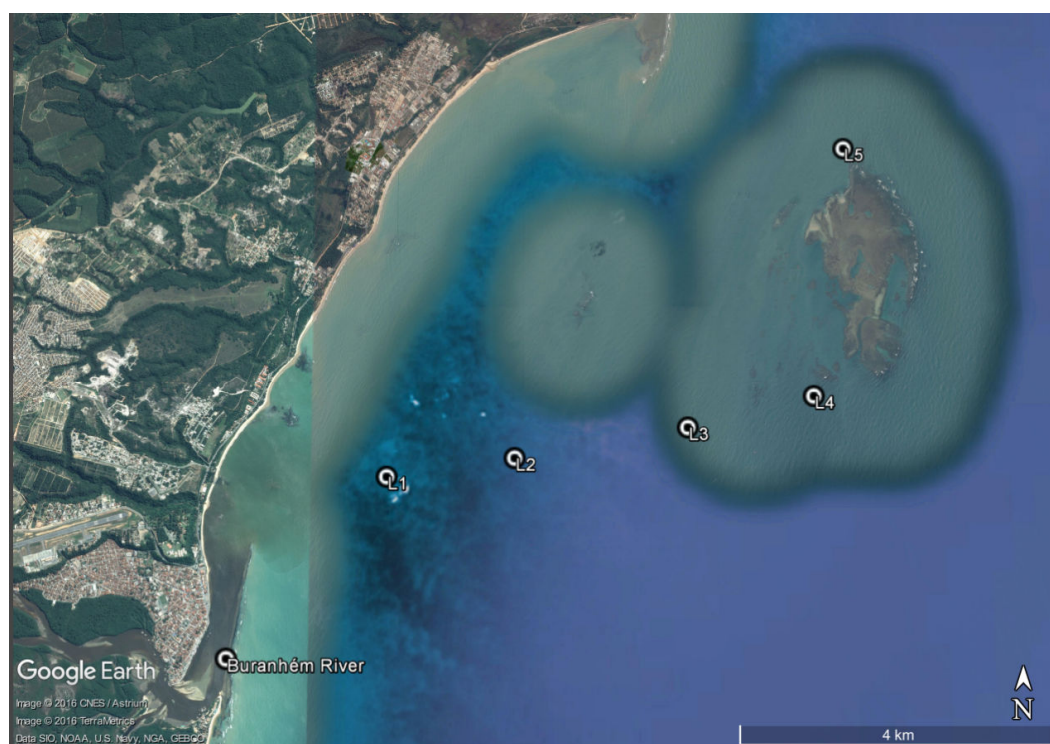


Figura 1: Mapa da foz do Rio Buranhém e locais de coleta de *Mussismilia hispida* no Parque Natural Municipal do Recife de Fora. L1: Recife de Itassepocu ($16^{\circ}25.9'S - 039^{\circ}02.4'O$); L2: Pedra Carapindaúba ($16^{\circ}25.7'S - 039^{\circ}01.5'O$); L3: Ponto Intermediário ($16^{\circ}25.5'S - 039^{\circ}00.2'O$); L4: Recife de Fora (SW) ($16^{\circ}25.3'S - 038^{\circ}59.3'O$); L5: Recife de Fora (NW) - ($16^{\circ}23.5'S - 038^{\circ}59.0'O$).

3.2 Análise de metais

As amostras para a determinação das concentrações de metais nos tecidos vivos e no esqueleto dos corais foram preparadas seguindo os procedimentos descritos por Eça et al. (2012), com modificações conforme descrito por Carlos Filho et al. (2012). As amostras de *M. hispida* foram seccionadas em pedaços de 0,5 cm³ usando um alicate de corte diagonal de aço inoxidável. As amostras foram então submersas em 2 ml de água Milli-Q em tubos criogênicos de 5 ml previamente pesados. As amostras de tecidos e esqueletos foram separadas por sonicação (ultrassom), a qual foi aplicada diretamente na amostra. Os tecidos isolados foram então transferidos para outro tubo criogênico previamente pesado, o qual foi colocado para secagem em estufa a 60°C. As amostras remanescentes de esqueleto foram submetidas a um processo de descontaminação do metal adsorvido na sua superfície, devido à coleta e ao manuseio do material. As amostras de esqueleto foram então submersas em solução 0,2 M de HNO₃ (Merck, Suprapur), submetidas a 10 min de banho ultrassônico e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para remoção do fluido ácido usado na descontaminação. Este processo foi repetido 5 vezes. As amostras de esqueleto foram então colocadas para secagem em estufa a 60°C. As amostras secas de tecido e esqueleto foram pesadas e digeridas em HNO₃ 65% (Merck, Suprapur). As concentrações de Cu, Cd, Cr e Pb foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica de alta resolução (HR-CS-AAS; ContrAA 700, Analytik Jena) e expressas em µg g⁻¹ de peso seco.

3.3 Atividades enzimáticas

A preparação das amostras e a análise da atividade da Ca²⁺-ATPase foi conduzida de acordo com os procedimentos descritos por Santos et al. (2015). As amostras de coral foram preparadas via maceração em nitrogênio líquido, separação

de tecido por sonicação e homogeneização, utilizando-se uma solução tampão (100 mM Tris-HCl, 500 mM sacarose, 1 mM DTT, 1 mM PMSF em água Milli-Q; pH ajustado a 7,6). A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi determinada pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada durante uma reação de 30 min entre 10 μl de homogeneizado e uma quantidade conhecida de ATP (3mM), fornecida via solução de reação (20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 189 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 em água Milli-Q; pH ajustado a 7,6). As condições de ensaio foram as seguintes: 10 μl de homogeneizado da amostra de tecido foram adicionados em 250 μl de solução reação e incubados a 30°C por 30 min para permitir que reação ocorresse. As amostras foram então colocadas em gelo por 10 min para interromper a reação. A quantidade de fosfato inorgânico liberada pela atividade da enzima no meio de reação foi estimada utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fiske and Subbarow (1925). Para isso, utilizou-se o kit comercial de reagentes "Fosfato" (Doles, Goiânia, GO, Brasil) e uma leitora de microplaca (ELX 808, Biotek, Vermont, EUA). A detecção espectrofotométrica foi realizada a 630 nm. A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi então normalizada pela concentração de proteínas no homogeneizado do tecido.

A preparação das amostras e a determinação da atividade da anidrase carbônica (AC) foram conduzidas seguindo o protocolo descrito por Santos et al. (2015) e Henry (1991), onde a atividade da AC foi determinada por meio da adição de um substrato de carbono em uma amostra de tecido isolado no meio de reação, observando-se a diminuição subsequente no pH. Neste caso, as amostras foram preparadas via maceração em nitrogênio líquido, separação de tecido por sonicação e homogeneização em solução tampão (10 mM Tris-base, 75 mM sacarose, 1 mM PMSF e 1 mM DTT em água Milli-Q; pH ajustado a 8,5). O substrato de carbono foi fornecido via injeção de CO_2 diretamente em água destilada até a saturação do gás. As

condições de ensaio foram as seguintes: 15 µl de homogeneizado do tecido foram adicionados a 3 ml de solução de reação (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris-base, 10 mM MSP; pH ajustado a 8,5), seguido de imediata adição de 390 µl de substrato de carbono. A redução de pH da solução de reação foi determinada com o auxílio de um pHmetro de bancada (modelo pH 21, Hanna) e registrada a cada 5 s por 40 s, indicando assim a taxa de liberação de prótons (H^+) catalisada pela AC (reação de hidratação entre água e CO_2). A atividade enzimática foi então calculada com base na taxa de redução de pH e normalizada pela quantidade de proteínas presente no homogeneizado do tecido dos corais.

A concentração de proteínas em cada amostra para normalização dos dados de atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria, conforme o método descrito por Bradford (1976).

3.4 Análises estatísticas

Os dados das concentrações de metais e atividades enzimáticas foram apresentados como média $\pm$ erro padrão para cada local de amostragem (L) e tempo de coleta (C). As diferenças entre as concentrações de metais e as respostas da atividade enzimática em função do local de amostragem (L) e tempo de coleta (C) foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, fixando-se os fatores, local de amostragem e tempo de coleta. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados relacionados às concentrações de metais foram transformados utilizando-se a raiz quadrada de forma a atender os pré-requisitos da ANOVA, os quais foram testados através dos testes de Shapiro-Wilk (homogeneidade de variância) e Levene (normalidade dos dados). Os dados relacionados às atividades enzimáticas foram transformados utilizando-se o

logarítmico na base decimal para atender estes mesmos pressupostos, os quais foram validados utilizando-se os testes mencionados acima. Quando a ANOVA foi significativa, foi utilizado o teste *a posteriori* de Fisher para identificar diferenças significativas entre os grupos amostrais. Modelos lineares generalizados (GLM) com distribuições logarítmicas normais foram empregados a fim de testar a hipótese de que a atividade enzimática foi afetada pela acumulação de metais. A atividade das enzimas foi usada como variável de resposta, enquanto as concentrações de metais nos tecidos e no esqueleto foram selecionadas como variáveis contínuas explanatórias. Variáveis correlacionadas foram excluídas de modo a aprimorar os modelos de parcimônia e ajuste. Um procedimento feito passo-a-passo de forma reversa comparando o critério de informação de Akaike's (AIC) foi executado para selecionar os modelos finais, seguido de comparações de ANOVA entre a variância explicada.

4. SÍNTESE DOS RESULTADOS

4.1 Concentrações de metais (Cu, Cr, Cd, Pb)

4.1.1 Concentração de metais nos tecidos de *M. hispida*

Todos os metais (Cu, Cr, Cd e Pb) foram detectados nas amostras de tecidos dos corais coletados em todos os locais de amostragem (L) e os resultados foram apresentados como média do local de amostragem $\pm$ erro padrão (Fig. 2A-D). O local de coleta foi um fator significativo com relação às concentrações bioacumuladas de Cu ($F_{4,46} = 14,959$; $p < 6,65E^{-08}$), Cr ($F_{4,52} = 2,784$; $p < 0,036$) e Cd ($F_{4,50} = 3,347$; $p < 0,0167$) nos tecidos de *M. hispida* (ver Apêndice). As concentrações de Cu e Cr nos tecidos foram maiores nos corais coletadas nos locais mais próximos à desembocadura do Rio Buranhém, enquanto as concentrações de Cd seguiram uma

tendência oposta, com as maiores concentrações de bioacumulação do metal sendo observadas nos corais coletados em L4.

4.1.2 Concentração de metais nos esqueletos de *M. hispida*

Todos os metais foram detectados nos esqueletos de *M. hispida* coletados em todos os locais de amostragem (L), exceto em L3 e L5 para Pb (Fig. 3A-D) e os resultados foram apresentados como média de local de amostragem $\pm$ erro padrão. O local de coleta foi um fator significativo com relação às concentrações de Cu ($F_{4,50} = 7,058$; $p < 1,38E^{-04}$) e Pb ($F_{4,5} = 58,022$; $p < 9,77E^{-19}$) nas amostras de esqueleto de *M. hispida* (ver Apêndice). L1, L2 e L5 representaram os locais de coleta onde os esqueletos dos corais apresentaram as maiores concentrações de Cu. Corais oriundos dos locais L3 a L5 não apresentaram nenhuma acumulação esquelética de Pb, em contraste com aqueles coletados em L1 e L2, no qual o local mais próximo do Rio Buranhém apresentou a maior concentração. Concentrações de Cr (0,0020-0,0028 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) e Cd (0,0006-0,00011 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) no esqueleto não apresentaram diferenças significativas entre os locais de coleta, sendo estas consideradas baixas quando comparadas a dos outros metais.

4.2 Atividade da Ca^{2+} -ATPase

A atividade média da Ca^{2+} -ATPase no tecido de *M. hispida* foi significativamente afetada pelo local de coleta ($F_{4,46} = 2,91$, $p < 0,00315$), embora não tenha sido afetada pela tempo de coleta (C). Os resultados foram apresentados como média de local de coleta $\pm$ erro padrão. Amostras de *M. hispida* coletadas em L1 e L2 apresentaram uma atividade mais reduzida da Ca^{2+} -ATPase ($\sim 4,5$ -5,0 $\text{mM P}_i \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em comparação com os corais coletados em L3, L4 e L5; e L3,

respectivamente (ver Apêndice). A análise utilizando-se GLM indicou que a atividade da Ca^{2+} -ATPase foi parcialmente explicada (17% da variância explicada, AIC 84,8) pela acumulação de Cr no tecido ($p < 0,0122$) e de Pb no esqueleto ($p < 0,0164$). Um aumento nas concentrações de Cr e Pb em L1 coincidiram com uma diminuição significativa na atividade da Ca^{2+} -ATPase, quando comparado com a atividade enzimática apresentada pelos corais coletados nos locais mais distantes (L2-L5).

4.3 Atividade da anidrase carbônica (AC)

A atividade da AC foi significativamente afetada pelo local de coleta ($F_{4,49} = 12,082$, $p < 6,57\text{E}^{-07}$), embora não tenha sido afetada pela estação de coleta (C) ou a concentração de metais. A atividade da AC foi significativamente maior nos tecidos dos corais coletados em L1, e foi menor e mais estável nos locais mais distantes ao Rio Buranhém. A análise utilizando-se GLM indicou que as concentrações de metais nos tecidos e no esqueleto não explicam de forma significativa as variações observadas na atividade da AC, embora denote-se a presença de algumas tendências. A interação entre o local de amostragem (L) e o período de coleta (C) foi significativo com relação à atividade da AC ($F_{11,49} = 2,025035$; $p < 0,0458$), embora o período de coleta *per se* não tenha apresentado uma influência significativa. As amostras de *M. hispida* coletadas em L1 durante C1 e C2 demonstraram as maiores atividades de AC, seguidos por L2 durante C1, enquanto a atividade proveniente de todos os outros locais de amostragem e períodos de coleta permaneceu relativamente estável. A atividade de AC seguiu uma tendência de redução de L1 até L5, apresentando maiores valores nos locais de coleta mais próximos à desembocadura do Rio Buranhém. Essa tendência foi mais pronunciada em amostras de corais coletados durante C1 e C2, as quais representam as estações de chuva no estado da Bahia.

5. CONCLUSÕES

- Metais (Cu, Cr, Cd e Pb) foram detectados no coral *M. hispida* em todos os locais de coleta, sugerindo a ocorrência de contaminação de origem antrópica no PNMRF.
- Cu e Cr foram detectados em maiores concentrações em áreas mais próximas à desembocadura do Rio Buranhém, suportando assim a hipótese de que o Rio Buranhém é uma fonte de contaminação para o PNMRF.
- Os corais oriundos de locais mais próximos à desembocadura do Rio Buranhém apresentaram atividade da Ca^{2+} -ATPase reduzida, independentemente do período de amostragem, indicando uma possível redução no processo de calcificação.
- A maior atividade da anidrase carbônica nos locais mais próximos à desembocadura do Rio Buranhém sugere uma possível resposta compensatória às condições da água do mar nesta região.
- A atividade da anidrase carbônica nos tecidos de *M. hispida*, maior nos períodos de chuva e estações mais próximas à desembocadura do Rio, sugere que o aumento do volume de drenagem costeira tem efeito nas condições da água do mar e consequentemente um reflexo negativo na atividade enzimática dos corais.
- Futuros estudos são necessários para melhor caracterizar a contaminação observada no PNMRF, bem como avaliar os impactos biológicos dessa contaminação, visando o estabelecimento de estratégias adequadas de gerenciamento de uso e conservação dos recifes de coral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Horani FA, Al-Moghrabi SM, De Beer D (2003) The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. Mar Biol 142: 419-426
- Ali A-hAM, Hamed MA, El-Azim HA (2011) Heavy metals distribution in the coral reef ecosystems of the Northern Red Sea. Helgoland marine research 65:67-80
- Anu G, Kumar NC, Jayalakshmi KJ, Nair SM (2007) Monitoring of heavy metal partitioning in reef corals of Lakshadweep Archipelago, Indian Ocean. Environ Monit Assess 128: 195-208
- Arantes RCM (2012) Geoprocessamento Aplicado à Modelagem Ambiental em Recifes de Coral. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil
- Araujo GS, Moreira LB, Morais RD, Davanzo MB, Garcia TF, Cruz ACF, Abessa DMS (2013) Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuí State Park, SP, Brazil). Mar Pollut Bull 75: 62-68
- Barakat SA, Al-Rousan S, Al-Trabeen MS (2015) Use of scleractinian corals to indicate marine pollution in the northern Gulf of Aqaba, Jordan. Environ Monit Assess 187:1-12
- Bastidas C, García E (1999) Metal content on the reef coral *Porites astreoides*: an evaluation of river influence and 35 years of chronology. Mar Pollut Bull 38: 899-907
- Bertucci A, Moya A, Tambutté S, Allemand D, Supuran CT, Zoccola D (2013) Carbonic anhydrases in anthozoan corals - A review. Bioorg Med Chem 21: 1437-1450
- Bielmyer GK, Grosell M, Bhagooli R, Baker AC, Langdon C, Gillette P, Capo TR (2010) Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium* spp.). Aquat Toxicol 97: 125-133
- Bongaerts P, Riginos C, Hay KB, van Oppen MJ, Hoegh-Guldberg O, Dove S (2011) Adaptive divergence in a scleractinian coral: physiological adaptation of *Seriatopora hystrix* to shallow and deep reef habitats. BMC Evol Biol 11:303
- Buruaem LM, Hortellani MA, Sarkis JE, Costa-Lotufo LV, Abessa DMS (2012) Contamination of port zone sediments by metals from large marine ecosystems of Brazil. Mar Pollut Bull 64: 479-488
- Carlos Filho VSM, dos Santos WPC, de Kikuchi RKP, Hatje V (2012) Decontamination procedure for trace elements determination in coral skeleton samples. Microchem J 102: 123-129
- Castro CB, Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. Bull Mar Sci 69: 357-371
- Christensen GM, Tucker JH (1976) Effects of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase. Chem Biol Inter 13: 181-192
- Costa OS, Nimmo M, Attrill MJ (2008) Coastal nutrification in Brazil: a review of the role of nutrient excess on coral reef demise. J South Amer Earth Sci 25: 257-270
- de Polo A, Margiotta-Casaluci L, Lockyer AE, Scrimshaw MD (2014) A new role for carbonic anhydrase 2 in the response of fish to copper and osmotic stress: Implications for multi-stressor studies. PloS one 9:e107707
- Diaz RJ, Rosenberg R (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. Science 321: 926-929
- Dove SG, Kline DI, Pantos O, Angly FE, Tyson GW, Hoegh-Guldberg O (2013) Future reef decalcification under a business-as-usual CO₂ emission scenario. Proc Natl Acad Sci USA 110: 15342-15347

- Eça GF, Mendonça Filho CVS, Hatje V, Santos WPC (2012) Corais como organismos biomonitorios: aplicação, pré-tratamento e determinação de elementos majoritários e minoritários. *Química Nova* 35: 581-592
- Edge SE, Morgan MB, Gleason DF, Snell TW (2005) Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress. *Mar Pollut Bull* 51: 507-523
- El Nemr A, El-Sikaily A, Khaled A, Said TO, Abd-Allah AMA (2004) Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the coral reef skeleton of the Egyptian Red Sea Coast. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 1195-1202
- Fabricius KE (2005) Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Mar Pollut Bull* 50: 125-146
- Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375-400
- Francini-Filho RB, Moura RL, Thompson FL, Reis RM, Kaufman L, Kikuchi RKP, Leão ZMAN (2008) Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Mar Pollut Bull* 56: 1008-1014
- Gilbert AL, Guzmán HM (2001) Bioindication potential of carbonic anhydrase activity in anemones and corals. *Mar Pollut Bulletin* 42: 742-744
- Grillo V, Parsons ECM, Shrimpton JH (2001) A review of sewage pollution in Scotland and its potential impacts on harbour porpoise populations. Scientific Committee at the 53rd Meeting of the International Whaling Commission: 3-16
- Harland A, Brown B (1989) Metal tolerance in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Mar Pollut Bull* 20: 353-357
- Henry RP (1991) Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro. *The Carbonic Anhydrases*. Springer, pp. 119-125
- Hoegh-Guldberg O (2015) Reviving the Ocean Economy: the case for action–2015. WWF International, Gland, Switzerland
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF (2010) The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328: 1523-1528
- Howard L, Brown B (1987) Metals in *Pocillopora damicornis* exposed to tin smelter effluent. *Mar Pollut Bull* 18: 451-454
- Howard LS, Brown BE (1984) Heavy metals and reef corals. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 22: 195-210
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, Folke C, Grosberg R, Hoegh-Guldberg O, Jackson JB, Kleypas J, Lough JM, Marshall P, Nystrom M, Palumbi SR, Pandolfi JM, Rosen B, Roughgarden J (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301: 929-933
- Krishnakumar S, Ramasamy S, Magesh NS, Chandrasekar N, Peter TS (2015) Metal concentrations in the growth bands of *Porites* sp.: A baseline record on the history of marine pollution in the Gulf of Mannar, India. *Marine pollution bulletin* 101: 409-416
- Leão Z, Ginsburg RN (1997) Living reefs surrounded by siliciclastic sediments: the Abrolhos coastal reefs, Bahia, Brazil. *Proc 8th Int Coral Reef Symp* 2: 1767-1772
- Leão ZMAN, Kikuchi RKP, Testa V (2003) Corals and coral reefs of Brazil. In: Cortés J, *Latin American coral reefs*, Elsevier, pp. 9-52
- Lewis SE, Shields GA, Kamber BS, Lough JM (2007) A multi-trace element coral record of land-use changes in the Burdekin River catchment, NE Australia. *Palaeogeog Palaeoclim Palaeoecol* 246: 471-487

- Lino AS, Galvão PMA, Longo RTL, Azevedo-Silva CE, Dorneles PR, Torres JPM, Malm O (2016) Metal bioaccumulation in consumed marine bivalves in Southeast Brazilian coast. *J Trace Elem Med Biol* 34: 50-55
- Lionetto MG, Giordano ME, Vilella S, Schettino T (2000) Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat Toxicol* 48: 561-571
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Schettino T (2016) The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: New insights and perspectives. *Int J Mol Sci* 17: 127
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Erroi E, Schettino T (2012) Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *Int J Environ Res Public Health* 9: 3965-3977
- Magesh NS, Chandrasekar N, Roy DV (2011) Spatial analysis of trace element contamination in sediments of Tamiraparani estuary, southeast coast of India. *Estuarine, Coast Shelf Sci* 92: 618-628
- Magesh NS, Chandrasekar N, Kumar SK, Glory M (2013) Trace element contamination in the estuarine sediments along Tuticorin coast - Gulf of Mannar, southeast coast of India. *Mar Pollut Bull* 73: 355-361
- Marangoni LFDB (2014) Biomarcadores para avaliação dos efeitos do cobre no coral *Mussismilia harttii* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae). MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande, Brazil
- Meibom A, Cuif JP, Hillion F, Constantz BR, Juillet-Leclerc A, Dauphin Y, Watanabe T, Dunbar RB (2004) Distribution of magnesium in coral skeleton. *Geophys Res Lett* 31: L23306
- Negri A, Heyward A (2001) Inhibition of coral fertilisation and larval metamorphosis by tributyltin and copper. *Mar Environ Res* 51: 17-27
- Neves E, Pires D (2002) Sexual reproduction of Brazilian coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902). *Coral Reefs* 21:161-168
- Nikinmaa M (2013) Climate change and ocean acidification-interactions with aquatic toxicology. *Aquat Toxicol* 126: 365-372
- Oliveira-Silva P (2008) Diagnóstico ambiental dos ecossistemas recifais de Abrolhos e Porto Seguro, BA com ênfase em foraminíferos e indicadores geoquímicos. PhD Thesis, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil
- Peters EC, Gassman NJ, Firman JC, Richmond RH, Power EA (1997) Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 16: 12-40
- Phillips DJ, Rainbow PS (1989) Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Mar Environ Res* 28: 207-210
- Pires C (2010) Brain Corals of Brazil. *JMBA Global Marine Environment* :35-36
- Prazeres M, Martins SE, Bianchini A (2012) Assessment of water quality in coastal waters of Fernando de Noronha, Brazil: biomarker analyses in *Amphistegina lessonii*. *J. Foram Res* 42: 56-65
- Reichelt-Brushett A, Harrison P (1999) The effect of copper, zinc and cadmium on fertilization success of gametes from scleractinian reef corals. *Mar Pollut Bull* 38: 182-187
- Reichelt-Brushett AJ, McOrist G (2003) Trace metals in the living and nonliving components of scleractinian corals. *Mar Pollut Bull* 46: 1573-1582
- Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A, Sanvicente-Añorve L, Alatorre-Mendieta MA, Rivera-Ramirez F (2009) Distribution of dissolved trace metals around the Sacrificos Coral Reef Island, in the Southwestern Gulf of Mexico. *Bull Environ Contamin Toxicol* 83: 713-719

- Santos HF, Duarte GAS, da Costa Rachid CT, Chaloub RM, Calderon EN, de Barros Marangoni LF, Bianchini A, Nudi AH, Do Carmo FL, van Elsas JD (2015) Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Scient Rep* 5
- Sarmiento-Soares LM, Mazzoni R, Martins-Pinheiro RF (2008) A fauna de peixes dos Rios dos Portos Seguros, extremo sul da Bahia, Brasil. *Bol Museu Biol Mello Leitão* 24: 63-69
- Ščančar J, Milačič R, Stražar M, Burica O (2000) Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge. *Sci Total Environ* 250: 9-19
- van Dam JW, Negri AP, Uthicke S, Mueller JF (2011) Chemical pollution on coral reefs: Exposure and ecological effects. In: Sanchez-Bayo F, Brink PJ van den, Mann RM (eds) *Ecological impacts of toxic chemicals*. Bentham Science Publishers, Amsterdam, Netherlands
- Veron JE, Hoegh-Guldberg O, Lenton TM, Lough JM, Obura DO, Pearce-Kelly P, Sheppard CR, Spalding M, Stafford-Smith MG, Rogers AD (2009) The coral reef crisis: the critical importance of <350 ppm CO₂. *Mar Pollut Bull* 58: 1428-1436
- Vidal-Dupiol J, Zoccola D, Tambutté E, Grunau C, Cosseau C, Smith KM, Freitag M, Dheilly NM, Allemand D, Tambutté S (2013) Genes related to ion-transport and energy production are upregulated in response to CO₂-driven pH decrease in corals: new insights from transcriptome analysis. *PloS one* 8:e58652
- Wear SL, Thurber RV (2015) Sewage pollution: mitigation is key for coral reef stewardship. *Ann New York Acad Sci* 1355
- Wilkinson C, Salvat B (2012) Coastal resource degradation in the tropics: Does the tragedy of the commons apply for coral reefs, mangrove forests and seagrass beds. *Mar Pollut Bull* 64: 1096-1105
- Yu K-F, Zhao J-X, Wei G-J, Cheng X-R, Chen T-G, Felis T, Wang P-X, Liu T-S (2005) $\delta^{18}\text{O}$, Sr/Ca and Mg/Ca records of *Porites lutea* corals from Leizhou Peninsula, northern South China Sea, and their applicability as paleoclimatic indicators. *Palaeogeog Palaeoclim Palaeoecol* 218: 57-73