

Actividade de Acetilcolinesterase em Esponjas Marinhas da Costa Portuguesa

Acetylcholinesterase Activity in Marine Sponges from the Portuguese Coast

Rui Coito¹, Pedro Torres¹, Maria do Céu Costa¹, Madalena Humanes², Marise Almeida²

¹Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Rua Fernando Palha, 69, 1900-693 Lisboa, Portugal.

²Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal.

Resumo

As esponjas marinhas são organismos ubíquos possuindo muitas características que lhes conferem um elevado potencial como organismos bioindicadores. Dado que se reveste de enorme importância e premência o estabelecimento de um grande número de organismos que possam actuar como bioindicadores de exposição a poluentes, neste trabalho investigamos a presença do biomarcador acetilcolinesterase nas esponjas marinhas *Spongia officinalis* e *Spongia agaricina*.

Os exemplares foram recolhidos em locais pré-seleccionados ao longo da costa oeste portuguesa em locais considerados não sujeitos a poluição. Escolheram-se também alguns pontos de amostragem onde pode ocorrer alguma actividade antropogénica.

Para o estudo foi usado um método padrão de detecção da actividade de acetilcolinesterase- a produção do ião 5-tio-2-nitrobenzoato. Estabeleceu-se a presença de acetilcolinesterase nestas espécies e validou-se o método em termos de repetibilidade e reprodutibilidade para estes organismos.

Foi também possível determinar o intervalo normal de valores de actividade específica de AChE para as espécies em estudo: [0,000; 1,270] mU of AChE/mg of proteína para *S. officinalis* e [0,000;1,439] mU of AChE/mg de proteína para *S. agaricina*.

Palavras Chave: Actividade de acetilcolinesterase, biomarcador, esponjas marinhas, *Spongia agaricina*, *Spongia officinalis*.

Abstract

Sponges, ubiquitously occurring organisms, have many characteristics that provide their foreseen potential as biomonitors. Since it is very important to find the most wide range of organisms that can act as early warners of pollution, we investigated the presence of the biomarker acetylcholinesterase in the marine sponges *Spongia officinalis* and *Spongia agaricina*.

The specimens were collected from pre-selected sites along the western coast of Portugal, which considered undisturbed in terms of pollution. Some sites were also chosen, where anthropogenic activities can be predicted to occur. A standard analytical method was used for the determination of the acetylcholinesterase activity based on the production of 5-thio-2-nitrobenzoate ion. We ascertain the presence of this enzyme in these species and also validate the method in respect to the repeatability and reproducibility.

It was possible to determine the normal interval range of the acetylcholinesterase (AChE) specific activity levels for these species: [0.000; 1.270] mU of AChE/mg of protein for *S. officinalis* and [0.000;1.439] mU of AChE/mg of protein for *S. agaricina*.

Key-words: Acetylcholinesterase, biomarker, marine sponges, *Spongia agaricina*, *Spongia officinalis*

Introdução

A acetilcolina é um neurotransmissor, sendo uma das moléculas mais importantes envolvidas na transmissão do impulso nervoso. Este requer que a acetilcolina seja libertada no espaço intersináptico de modo a assegurar a manutenção e repetição das acções no interior do sistema nervoso central e ao nível das terminações nervosas periféricas. A acetilcolina liga-se a um receptor colinérgico produzindo, desta forma, um potencial pós-sináptico e a consequente propagação do impulso nervoso^[1,2]. Após este processo a acetilcolina é imediatamente hidrolisada pela acção da enzima acetilcolinesterase, que existe nas junções neuro-sinápticas, a ácido acético e colina^[1,2,3].

A reacção de hidrólise processa-se pelo ataque nucleofílico de aminoácidos existentes no sítio activo da acetilcolinesterase ao carbono do grupo carbonilo da acetilcolina, do qual resulta a acetilação da enzima e libertação da colina. Segue-se uma hidrólise da enzima acilada que origina acetato e a recuperação do centro activo^[1,2].

Os agentes inibidores da acetilcolinesterase podem actuar de forma reversível, por bloqueio competitivo da hidrólise do substrato que alcançou o centro activo, sem reagirem com a enzima, ou de forma quasi-irreversível, por acetilação do grupo OH⁻ do aminoácido serina (o qual faz parte do centro activo), formando um éster que, sendo uma molécula mais estável que o acetato livre (produto usual da reacção catalisada), mais dificilmente abandona o centro activo, inactivando desta forma a capacidade catalítica da enzima^[1,2,3].

Os organismos que vivem em estuários e águas costeiras estão continuamente expostos a um conjunto de compostos químicos descarregados no ambiente marinho como resultado de actividades antropogénicas. A inibição da acetilcolinesterase tem sido usada para detectar e quantificar os efeitos biológicos de pesticidas organofosforados e carbamatos no ambiente aquático^[4]. Outros estudos referem que a acetilcolinesterase pode ainda ser inibida por metais pesados e surfactantes^[5,6,7].

A medida da resposta à exposição ambiental a um produto químico ao nível de um organismo individual é designado biomonitorização, que recorre ao uso de biomarcadores, os quais constituem um referencial para uma variação induzida xenobioticamente em funções, estruturas, processos ou componentes bioquímicos ou celulares, mensurável numa amostra ou sistema biológico^[8].

As esponjas marinhas, como organismos ubíquos, filtradores e sésseis, constituem à partida uma boa escolha para organismos bioindicadores. Neste trabalho, pretendeu-se testar as esponjas marinhas *Spongia agaricina* e *Spongia officinalis*, recolhidas na

Introduction

The acetylcholine is a neurotransmitter and one of the crucial molecules involved in the nervous impulse transmission. This mechanism requires that acetylcholine being released in the intersynaptic cleft in order to ensure the maintenance and repetitions of the actions inside the central nervous system and at the periferic nervous terminals. The acetylcholine interacts with the cholinergic receptors producing, therefore, a post-synapsis potential and consequently the nervous impulse propagation^[1,2]. After this process the acetylcholine is hydrolyzed by the acetylcholinesterase present at the neuro-synaptic junctions, to acetic acid and choline^[1,2,3].

The hydrolysis reaction proceeds by the nucleophilic attack aminoacids of the acetylcholinesterase active site to the carbonyl carbon of the acetylcholine, which results in the acetylation of the enzyme and choline liberation, followed by the hydrolysis of the acetylated enzyme which produces the free acetate and enables the recovering of the enzyme active site^[1,2].

Some compounds may function as acetylcholinesterase inhibitors and act in a reversible way by a competitive blocking of the substrate hydrolysis at the active site, without reacting with the enzyme or alternatively by a quasi-irreversible way, by acetylation of the OH⁻ group of the aminoacid serine (which belongs to the active site), producing an ester. The latter, which being a more stable molecule than the free acetate (the usual enzyme catalysed product), will present more difficulties in terms of reactivity and stability to abandon the active site, therefore resulting in this way an overall inactivation of the enzyme catalytic ability^[1,2,3].

The organisms that live in the estuary and coastal waters are continuously exposed to a wide variety of chemical products that are discharged in the marine environment as a result of anthropogenic activities. The acetylcholinesterase activity inhibition has been used for detection and quantification of the biological effects of organophosphorates and carbamates pesticides in the aquatic environment^[4]. Other studies suggest that the acetylcholinesterase activity may be inhibited by heavy metals and surfactants^[5,6,7].

The evaluation of the impact of environmental exposure to a chemical product at an organism level is designated by biomonitorization which lies in the use of biomarkers that constitute a reference for xenobiotic induced variations at functions, structures, processes or biochemical or cellular components which are measured in a sample or in a biological system^[8].

Marine sponges as ubiquitous, filters and sessile organisms, constitute a good choice as bioindicator organisms. In this work, we tested the marine sponges *Spongia agaricina* and *Spongia officinalis*, collected at

Reserva Natural da Berlenga e no Parque Natural da Arrábida como potenciais organismos bioindicadores de exposição a poluentes orgânicos. Um estudo semelhante foi efectuado recentemente, por membros desta equipa, usando a esponja marinha *Cliona celata*^[9,10]. Assim, ao serem avaliados neste trabalho os níveis base da actividade de acetilcolinesterase, nas espécies em estudo, estes constituirão valores de referência para estudos futuros onde se suspeite que exista contaminação ambiental por exposição a poluentes orgânicos nomeadamente organofosforados e carbamatos.

Material e Métodos

Amostras biológicas

Os exemplares estudados foram recolhidos através de mergulho em várias zonas da Reserva Natural das Berlengas e do Parque Natural da Arrábida e um exemplar em Graña Ferrol, Espanha, (Figura 1).

the Natural Reserve of Berlengas and at the Natural Park of Arrábida, for their role as potentials bioindicators organisms in the monitorization of the impacts to the exposure to organic pollutants. A similar study was conducted recently, by members of the present research team, using the marine sponge *Cliona celata*^[9,10]. Therefore, we evaluated the basal levels of acetylcholinesterase specific activity in the species under study, in order to construct a data base of reference values for future studies, where suspicions of environmental contamination by exposure to organic pollutants namely organophosphorates and carbamates pesticides is considered.

Materials and Methods

Biological specimens

The specimens under study were collected by scuba diving, in several areas of the Natural Reserve of Berlengas and Natural Park of Arrábida. One specimen was collected in Graña - Ferrol, Spain, (Figure 1).

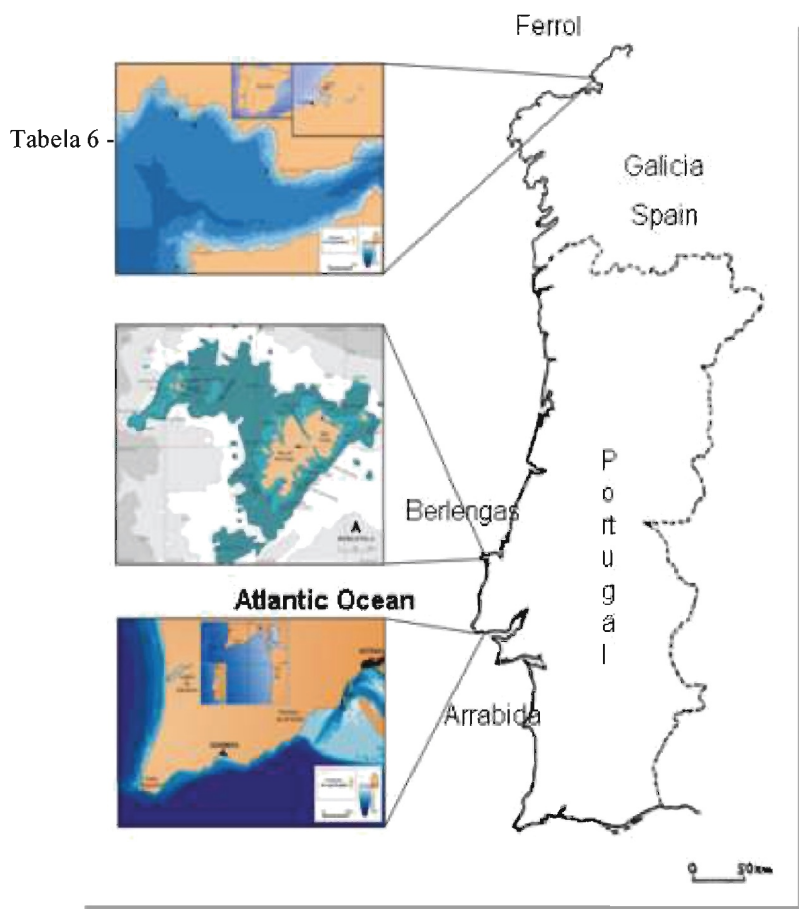


Figura 1 - Locais de recolha das amostras.
Figure 1 - Localization of the collecting sites.

Após a recolha, todos os exemplares foram transportados para o laboratório em sacos isotérmicos e congelados a -20°C . Foram recolhidas amostras representativas de cada exemplar as quais foram conservadas em etanol 96% (v/v), para classificação taxonómica.

As amostras foram designadas de acordo com o local de recolha: B para Berlengas, A para Arrábida e F para Ferrol, seguida de um número que corresponde à ordem de recolha.

Preparação das amostras e extractos

Dado que as esponjas marinhas possuem vários tipos de organismos associados, previamente a qualquer estudo, o material biológico foi limpo de macro organismos ou mesmo de areias. Após este tratamento prévio, as amostras foram homogeneizadas, num banho de gelo, com cerca de 10 volumes da solução tampão 0,2M Tris- SO_4 (pH8,3), durante dez minutos, seguidos de um processo de extração durante uma hora a 4°C . O extracto foi centrifugado a 5000 g durante 35 minutos a 4°C . Os sobrenadantes filtrados foram considerados prontos para serem utilizados.

Determinações da actividade de acetilcolinesterase

As determinações da actividade de acetilcolinesterase foram efectuadas a 20°C , de acordo com uma modificação ao método de Ellman, o qual utiliza iodeto de acetiltiocolina (ATC) como substrato^[11,12]. Este método foi o escolhido por ser extremamente sensível e permitir a utilização de quantidades muito pequenas de amostra. A mistura reaccional é composta por: 2,6 mL de tampão 0,1 M de fosfato de sódio, pH 8,0; 0,1 mL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01M com NaHCO_3 1,5mg/mL em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0; 0,02mL de ATC 0,075M em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, e 0,4 mL do extracto em teste. A conversão do DTNB ao ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) foi seguida a 412nm ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durante 5 minutos de reacção. A correcção para a produção de TNB por parte de materiais tiólicos existentes na esponja, foi determinada do mesmo modo, substituindo o ATC por igual volume de tampão fosfato de sódio.

Foram efectuados três ensaios para cada determinação e o valor apresentado é a média das determinações.

Uma unidade de actividade de acetilcolinesterase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 μmol de substrato por minuto.

Determinação do teor de proteína nos extractos

O conteúdo proteico foi determinado pelo método Lowry modificado^[1,3].

After collection, the specimens were transported to the laboratory in isothermal containers, frozen and store at -20°C . Vouchers specimens have been kept in 96% (v/v) ethanol, for taxonomical analysis. The samples were named according to the respective collection site: B for Berlengas, A for Arrábida and F for Ferrol, followed by a number that corresponds to the order of collection.

Sample and extract preparation

Since marine sponges possess several organisms associated with them, prior to any study, the biological material was cleaned from any macro organisms (such as small algae or crustacean) or even alien bodies, like sediments or rocks. After that, the samples were homogenised with a blender in ten volumes of ice-cold 0.2M Tris- SO_4 (pH8.3), for ten minutes, followed by an hour extraction process at 4°C . The homogenates were centrifuged at 5000 g for 35 minutes at 4°C . The filtered supernatants were then ready to use.

Acetylcholinesterase activity determinations

Acetylcholinesterase (AChE) activity measurements were carried out at 20°C , using acetylcholine iodide (ATC) as substrate, according to a modification of the method early described by Ellman [11,12]. This method was used since it is extremely sensitive and small quantities of sample can be used. The assay mixture was composed of 2.6 mL of 0.1 M sodium-phosphate buffer, pH 8.0, 0.1 mL of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.01M with NaHCO_3 1.5mg/mL in sodium-phosphate buffer, pH 7.0; 0.02 mL of ATC 0.075M in sodium-phosphate buffer 0.1M, pH 7.0, and 0.4 mL of enzyme solution (extract). The conversion of DTNB to 5-thio-2-nitrobenzoate ion (TNB) was monitored at 412 nm ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), during five minutes of reaction. The correction for the TNB production by the thiol materials from sponge cells, is determined by a similar assay, substituting the ATC by equal volume of sodium-phosphate buffer. Three experiments were done for each determination and the value presented is the mean value.

One enzyme unit was defined as the amount of enzyme which catalyses the hydrolysis of 1 μmol of substrate per minute.

Protein determination in sponge extracts

Protein content was determined by the modified Lowry method^[13].

Analytical method: data analysis and statistical treatment

Repeatability and reproducibility

The repeatability and reproducibility of the AChE

Estudo do método analítico -Tratamento Estatístico

Repetibilidade e reprodutibilidade

Para efectuar o estudo do método analítico de doseamento da acetilcolinesterase (AChE) em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, utilizou-se um extracto bruto, seleccionado aleatoriamente, das esponjas em estudo.

Para a realização do estudo da repetibilidade do método procedeu-se à medição da actividade específica de AChE, nos extractos brutos B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis*, efectuando-se dez réplicas nas mesmas condições de medição ou seja utilizando o mesmo procedimento, o mesmo observador, o mesmo instrumento usado nas mesmas condições, o mesmo local e repetição num curto intervalo de tempo.

Para a realização do estudo da reprodutibilidade do método de doseamento da actividade específica de AChE, procedeu-se à medição da actividade total de AChE nos extractos brutos mantidos a -80°C, variando a condição tempo (dia de medição/nº de dias a -80°C).

Para avaliar o comportamento do método em termos de repetibilidade e reprodutibilidade determinou-se a incerteza padrão e o intervalo de confiança associado à repetibilidade e reprodutibilidade do método. Para o cálculo do intervalo de confiança utilizou-se um grau de confiança de 95% e recorreu-se ao uso do parâmetro t da distribuição *t-student*, para o grau de confiança considerado e o número de graus de liberdade da experiência.

Finalmente para uma mais completa avaliação do método em estudo calculou-se a incerteza associada à medição, obtida pela combinação das incertezas provenientes da repetibilidade e reprodutibilidade com um grau de confiança de 95%.

Determinação da actividade enzimática de AChE em esponjas marinhas

Após a obtenção dos valores da actividade enzimática específica de acetilcolinesterase nos vários exemplares das esponjas marinhas em estudo e por forma a obter uma caracterização da variabilidade deste marcador para os vários exemplares das duas espécies em estudo, usou-se como medida de localização o indicador mediana e como medida de escala, o indicador Dispersão quartal.

Para a construção do histograma usou-se a Regra de Sturges, para determinação do número de classes no mesmo.

activity determination method were determined using a crude extract chosen randomly from each sponge specie.

For the repeatability study we measured, ten times, the specific AChE activity of the B332 extract from *S. agaricina* and B140 extract from *S. officinalis*. These measurements were performed using the same procedure, the same observer, the same measuring instrument, used under the same conditions, the same location and repetition over a short period of time.

For the study of the reproducibility we measured, during several days, the specific AChE activity for the same extracts, kept at -80°C.

In order to evaluate the method behaviour in terms of repeatability and reproducibility, we determined the standard uncertainty and the confidence interval with a 95% degree of confidence, using the t parameter of the t-student distribution for the degrees of freedom of the experiment in question.

Finally, in order to ascertain a more complete evaluation of the method under study we calculated the total uncertainty, from repeatability and reproducibility associated to the AChE determination method also with a confidence level of 95%.

AChE specific activity determinations

In order to characterize the variability of the biomarker under study, we performed a statistical data analysis based on some indicators of localization (median) and scale (quartal dispersion). For the histograms construction we used the Sturges Rule for classes determination.

Results

AChE specific activity determinations

The presence of acetylcholinesterase activity was investigated for 26 specimens comprising 4 different sponge species. The results concerning the quantitative detection of the AChE specific activity are presented in the table 1.

Resultados

Determinação dos valores de actividade específica de AChE, para as esponjas em estudo

Foram analisados quanto à presença de actividade de acetilcolinesterase 26 exemplares distribuídos por 4 espécies diferentes de esponjas marinhas. Na tabela 1 encontram-se compilados os resultados obtidos na detecção quantitativa de actividade específica de AChE nestas esponjas.

Tabela 1 - Valores de actividade de acetilcolinesterase nas esponjas em estudo.

Table 1 - AChE specific activity values for the sponges under study.

Espécie <i>Specie</i>	Designação <i>Designation</i>	Actividade específica de AChE (mU AChE/mg prot.) <i>AChE specific activity (mU AChE/mg prot.)</i>
<i>Spongia officinalis</i>	B140	0,920
<i>Spongia officinalis</i>	B72	0,839
<i>Spongia officinalis</i>	B31	N.D
<i>Spongia officinalis</i>	B132	N.D.
<i>Spongia officinalis</i>	A77	0,699
<i>Spongia officinalis</i>	A41	1,270
<i>Spongia officinalis</i>	A63	0,385
<i>Spongia agaricina</i>	B70	N.D
<i>Spongia agaricina</i>	B374	0,609
<i>Spongia agaricina</i>	B332	0,345
<i>Spongia agaricina</i>	B345	N.D
<i>Spongia agaricina</i>	B55	N.D
<i>Spongia agaricina</i>	B420	1,349
<i>Spongia agaricina</i>	B312	N.D
<i>Spongia agaricina</i>	B40	N.D
<i>Spongia agaricina</i>	B303	0,176
<i>Spongia agaricina</i>	B148	1,439
<i>Spongia agaricina</i>	B71	0,108
<i>Spongia agaricina</i>	B326	0,188
<i>Spongia agaricina</i>	A74	N.D
<i>Erylus discophorus</i>	B206	N.D
<i>Erylus discophorus</i>	B320	N.D
<i>Erylus discophorus</i>	Fe 05	N.D
<i>Ircinia fasciculata</i>	B73	N.D
<i>Ircinia fasciculata</i>	A65	N.D
<i>Ircinia fasciculata</i>	A76	N.D
N.D - Actividade de AChE não detectável, nas condições do ensaio		
N.D. - not detectable, under the assay conditions		

Estudo do método analítico

Para efectuar o estudo do método analítico de doseamento de acetilcolinesterase em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, foram utilizadas para o estudo extractos brutos das espécies *S. agaricina* e *S. officinalis*.

Analytical method analysis

In order to evaluate in terms of repeatability and reproducibility, the analytical method used for the acetylcholinesterase specific activity determination, extracts of the species *S. agaricina* and *S. officinalis* were used.

Repetibilidade

Na tabela 2 e figura 2 a) e b) encontram-se representados os valores de actividade específica de AChE para B332 e B140, respectivamente, para as dez réplicas efectuadas.

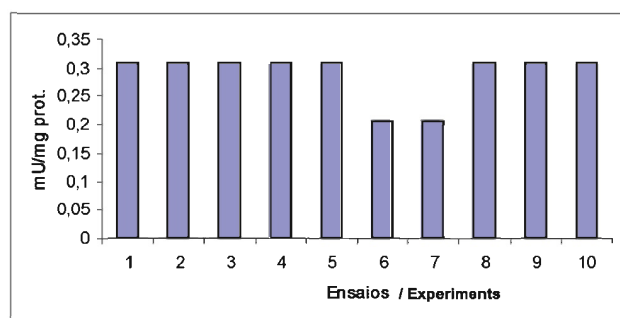
Repeatability

In table 2 and figures 2 a) and b) are presented the AChE specific activity values for the ten measurements using the B332 and B140 extracts.

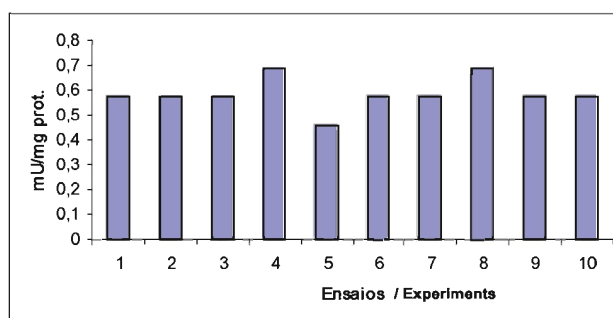
Tabela 2 - Actividade específica de AChE para o extracto B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis* estudo de repetibilidade.

Table 2 - AChE specific activity values for B332 extract from *S. agaricina* and B140 extract from *S. officinalis* repeatability study.

Ensaio Experiments	Actividade específica de AChE (mU AChE/mg de prot.) AChE specific activity (mU AChE/mg de prot.)	
	B332	B140
1	0,311	0,575
2	0,311	0,575
3	0,311	0,575
4	0,311	0,690
5	0,311	0,460
6	0,207	0,575
7	0,207	0,575
8	0,310	0,690
9	0,310	0,575
10	0,310	0,575



a)



b)

Figura 2 - Actividade específica de AChE para a esponja B332 (a) e B140 (b) - estudo de repetibilidade.

Figure 2 - AChE specific activity values for the extract B332 (a) and B140 (b)- repeatability study.

Com base nos resultados obtidos constantes da tabela 2 e figura 2 e por forma a avaliar o comportamento do método em termos de repetibilidade determinou-se o valor médio, desvio padrão, incerteza padrão e intervalo de confiança associados à repetibilidade do método, os quais se encontram na tabela 3.

These results were used for determination of the mean, standard deviation, standard uncertainty and the confidence interval associated to the repeatability of the analytical method as presented in table 3.

Tabela 3 - Avaliação da repetibilidade do método de doseamento da AChE para o extracto B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis*.

Table 3 - Repeatability evaluation for the determination method of AChE specific activity values for the B332 extract of *S. agaricina* and B140 extract of *S. officinalis*.

Parâmetros / Parameters	Actividade específica de AChE (mU AChE/mg prot.) AChE specific activity (mU AChE/mg prot.)	
	B332	B140
Média / Mean	0,290	0,587
Desvio padrão / Standard deviation	0,044	0,065
Incerteza padrão / Standard uncertainty	0,014	0,020
Intervalo de confiança* Confidence interval*	[0,258;0,322]	[0,542;0,632]
*Para um grau de confiança de 95% e para 9 graus de liberdade o parâmetro t- da distribuição t de Student é :2,262 *For a confidence level of 95% and 9 degrees of freedom t=2.262		

Reprodutibilidade

Na tabela 4 encontram-se os resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do método.

Reproducibility

In table 4 we present the results concerning the study of the method reproducibility.

Tabela 4 - Actividade específica de AChE para o extracto B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis* estudo de reprodutibilidade.

Table 4 - AChE specific activity values for the B332 extract from *S. agaricina* and B140 extract from *S. officinalis* reproducibility study.

Ensaio / Experiments	Actividade específica de AChE (mU AChE/mg de prot.) AChE specific activity (mU AChE/mg prot.)	
	B332	B140
Dia 1 / Day 1	0,414	0,690
Dia 2 / Day 2	0,414	0,920
Dia 3 / Day 3	0,311	0,690
Dia 4 / Day 4	0,311	0,575

Tal como efectuado para o estudo da repetibilidade, e por forma a avaliar o comportamento do método em termos de reprodutibilidade determinou-se o valor médio, desvio padrão, incerteza padrão e intervalo de confiança associados, os quais se encontram na tabela 5.

Such as for the repeatability study we have determined the mean value, standard deviation, standard uncertainty and the confidence interval for the reproductibility. These results are in table 5.

Tabela 4 - Avaliação da reprodutibilidade do método de doseamento da AChE para o extracto B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis*.

Table 4 - Reproducibility evaluation for the determination method of AChE specific activity values for the B332 extract of *S. agaricina* and B140 extract of *S. officinalis*.

Parâmetros / Parameters	Actividade específica de AChE (mU AChE/mg prot.) AChE specific activity (mU AChE/mg prot.)	
	B332	B140
Média / Mean	0,362	0,719
Desvio padrão / Standard deviation	0,060	0,144
Incerteza padrão / Standard uncertainty	0,019	0,046
Intervalo de confiança* / Confidence interval*	[0,302;0,422]	[0,573;0,865]
*Para um grau de confiança de 95% e para 3 graus de liberdade o parâmetro t- da distribuição t de Student é :3,182 *For a confidence level of 95% and 3 degrees of freedom t=3.182		

Na tabela 6 apresentam-se os valores da incerteza total do método para os extractos B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis*.

Table 6 summarizes the total uncertainty for the method, for the B332 extract from the specie *S. agaricina* and for the B140 extract from the specie *S. officinalis*.

Tabela 6 - Incertezas totais do método para os extractos B332 da espécie *S. agaricina* e B140 da espécie *S. officinalis*.
Table 6 - Total uncertainty for the AChE specific activity determination method for the B332 extract from *S. agaricina* and B140 extract from *S. officinalis*.

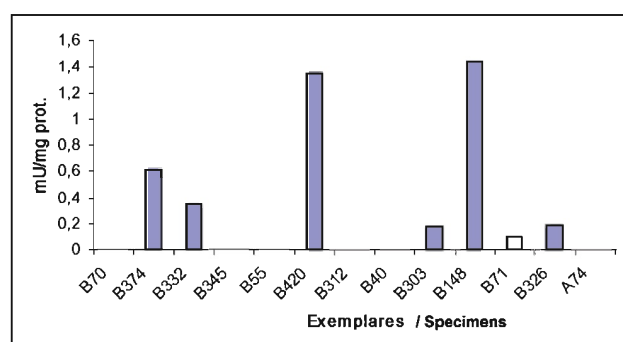
Parâmetros / Parameters	B332	B140
Incerteza repetibilidade / <i>Repeatability uncertainty</i>	0,014	0,020
Incerteza reprodutibilidade / <i>Reproducibility uncertainty</i>	0,019	0,046
Incerteza total / <i>Total uncertainty</i>	0,024	0,050

Caracterização estatística dos valores de actividade específica de AChE para as espécies *S. Agaricina* e *S. Officinalis*.

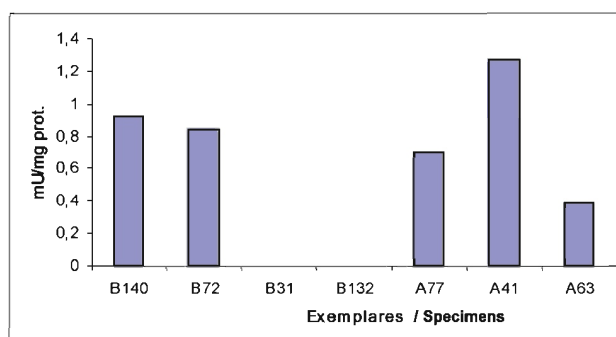
Por forma a testar a potencial utilização das espécies *S. agaricina* e *S. officinallis* como biomarcadores da poluição ambiental, foi determinado o teor de AChE nos extractos brutos das esponjas, de acordo com os dados da tabela 1 e figura 3.

Statistical characterization for the AChE specific activity values for the specimens of *S. agaricina* and *S.officinalis*.

In order to establish the potential usefulness of the species *S. agaricina* and *S. officinallis* as bioindicator organisms for the environmental pollution exposure, the AChE specific activity was determined for the sponges extracts, according to the data from table 1 and figure 3.



a)



b)

Figura 3 - Variabilidade dos níveis de actividade específica de AChE nas amostras de *S. agaricina* (a) e *S. officinalis* (b).
Figure 3 - Variability of the AChE specific activity values for the samples of *S. agaricina* (a) and *S. officinalis* (b).

Para se obter uma visão mais legível da variabilidade deste biomarcador nas sete amostras analisadas de *S. officinalis* e treze de *S. agaricina*, os dados são resumidos através das características de amostragem tais como localização e escala.

Assim as amostras foram ordenadas (tabelas 7 e 8) por ordem crescente do valor da actividade específica de AChE para as duas espécies em estudo, por forma a determinar a localização central- mediana (Md)- e a dispersão quartal (dF) dos valores de actividade específica de AChE (tabela 9).

The variability of this biomarker in the seven specimens analysed for the *S. officinalis* and in the thirteen for *S. agaricina*, was obtained using the sampling characteristics such as localization and scale. Therefore, the specimens were ordered (table 7 and 8) by their AChE specific activity values for the two species under study, in order to determine the central localization- the median (Md) and the quartal dispersion (dF) for the AChE specific activity values (table 9).

Tabela 7 - Ordenação dos valores de actividade específica de AChE para *S. officinalis*.
Table 7 - AChE specific activity values ordering for the specie *S. Officinalis*.

1	2	3	4	5	6	7
B31	B132	A63	A77	B72	B140	A41
0	0	0.385	0.699	0.839	0.920	1.270

Tabela 8 - Ordenação dos valores de actividade específica de AChE para *S. agaricina*.
Table 8 - AChE specific activity values ordering for the specie *S. Agaricina*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B70	B345	B55	B312	B40	A74	B71	B303	B326	B332	B374	B420	B148
0	0	0	0	0	0	0,108	0,176	0,188	0,345	0,609	1,349	1,439

Tabela 9 - Indicadores de localização e escala para os valores de actividade específica de AChE (mU AChE/mg prot.) para as esponjas *S. officinalis* e *S. Agaricina*.
Table 9 - Localization and scale indicators for the AChE specific activity values (mU of AChE/mg prot.) for *S. officinalis* e *S. agaricina*.

Indicadores / <i>Indicators</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>S. agaricina</i>
Mediana (Md) / <i>Median (Md)</i>	0,699	0,108
Quarto inferior / <i>Lower quartet</i>	0,192	0,000
Quarto superior / <i>Upper quartet</i>	0,880	0,477
Dispersão quartal (dF) / <i>Quartal dispersion (dF)</i>	0,688	0,477

A representação gráfica da distribuição dos níveis de AChE obtidos, na forma de histograma, revela a forma da amostra e fornece pistas para a classe de modelos adequada ao seu comportamento.

Na figura 4 mostram-se os histogramas obtidos para o estudo na *S. officinalis* (a) e *S. agaricina* (b) construídos a partir dos dados das tabelas 10 e 11, respectivamente.

The histogram representation of the AChE specific activity values reveals the sample form and give some clues about the models that represent their behaviour. In figure 4 we present the histograms for *S. officinalis* (a) and *S. agaricina* (b) constructed from the data from tables 10 and 11, respectively.

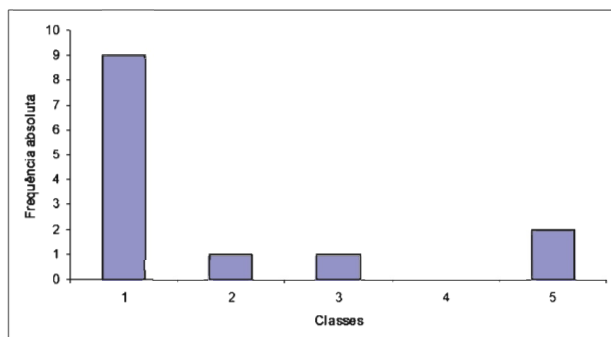
Tabela 10 - Lista de frequências do histograma que representa a distribuição dos níveis de actividade específica de AChE nas amostras de *S. officinallis*.
Table 10 - Histogram characteristics for the AChE specific activity values distribution in *S. officinallis*.

Classe <i>Class</i>	Intervalo da Classe <i>Class interval</i>	Ponto médio <i>Mean Point</i>	Frequência absoluta <i>Absolute frequency</i>	Frequência relativa <i>Relative frequency</i>	Frequência acumulada <i>Acumulate frequency</i>	Frequência relativa acumulada <i>Acumulate relative frequency</i>
1	[0,000;0,320]	0,160	2	0,286	2	0,286
2	[0,320;0,640]	0,480	1	0,143	3	0,429
3	[0,640;0,960]	0,800	3	0,428	6	0,857
4	[0,960;1,280]	1,120	1	0,143	7	1,000

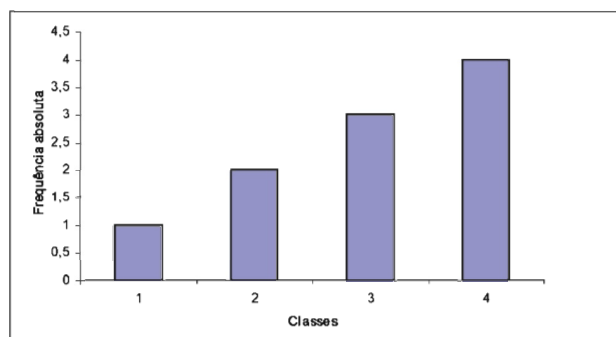
Tabela 11 - Lista de frequências do histograma que representa a distribuição dos níveis de actividade específica de AChE nas amostras de *S. agaricina*.

Table 11 - Histogram characteristics for the AChE specific activity values distribution in *S. Agaricina*.

Classe <i>Class</i>	Intervalo da Classe <i>Class interval</i>	Ponto médio <i>Mean Point</i>	Frequência absoluta <i>Absolute frequency</i>	Frequência relativa <i>Relative frequency</i>	Frequência acumulada <i>Accumulate frequency</i>	Frequência relativa acumulada <i>Accumulate relative frequency</i>
1	[0,000;0,288]	0,144	9	0,692	9	0,692
2	[0,288;0,576]	0,432	1	0,077	10	0,769
3	[0,576;0,864]	0,720	1	0,077	11	0,846
4	[0,864;1,152]	1,008	0	0	11	0,846
5	[1,152;1,439]	1,296	2	0,154	13	1,000



a)



b)

Figura 4 - Histogramas para a distribuição da actividade específica das *S. agaricina* (a) e *S. officinalis* (b).
Figure 4 - Histograms for the AChE specific activity distribution in *S. agaricina* (a) and *S. officinalis* (b).

Discussão de resultados

Das esponjas marinhas analisadas neste trabalho verificou-se que a maioria dos espécimes das espécies *S. officinalis* e *S. agaricina* apresentavam actividade de AChE (tabela 1). Para os exemplares das espécies *Erylus discophorus* e *Ircinia fasciculata* que foram analisados, não foi possível detectar, nas condições do teste, actividade de AChE. Tal facto não implica necessariamente que estes organismos não possuam esta enzima; serão necessários, concerteza, estudos num maior número de exemplares para estabelecer a presença ou não deste enzima nestas espécies.

As esponjas *S. officinalis* e *S. agaricina*, pertencentes ao mesmo género taxonómico, encontram-se amplamente distribuídas na costa portuguesa; este facto, aliado à presença de actividade de AChE nestas espécies, leva-nos a propô-las como possíveis espécies sentinela, ou seja, potenciais espécies bioindicadoras de exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos, na medida em que os valores de actividade específica de AChE apresentados neste trabalho

Discussion

From the marine sponges analysed in this work we verify that for most specimens of *S. officinalis* and *S. agaricina* it was possible to detect AChE activity (table 1). For the *Erylus discophorus* and *Ircinia fasciculata* specimens it was not possible to detect, in the assay conditions, any activity at all. This fact does not mean that these organisms do not possess this enzyme; it will be necessary to develop further experiments with a higher specimens number to clearly establish the presence or not of this enzyme in these species.

The sponges *S. officinalis* and *S. agaricina*, belonging to the same taxonomical genera, are widely distributed in the portuguese coast; this fact in conjunction with the presence of AChE activity in these sponges, prompt us to propose them as possible potential bioindicator species for the environmental exposure to organophosphorates and carbamates pesticides. The determined AChE specific activity values constitute basal and therefore reference values for future studies where contamination is suspected to occur.

constituirão valores dos níveis base de actividade de AChE, que poderão ser comparados, em estudos futuros com valores determinados nestas mesmas espécies, em condições em que haja suspeita de exposição aos poluentes.

Em termos comparativos a espécie *S. officinalis* ao apresentar valores superiores (comparação das medianas-tabela 9) deverá ser a espécie a considerar preferencialmente para estes estudos.

Todavia, para um melhor conhecimento das características destas duas espécies, no que diz respeito, à sua actividade de AChE, serão necessários mais estudos usando um maior número de exemplares, de várias estações de colheita, já que este trabalho mostrou a existência de uma variabilidade considerável nos valores de actividade específica de AChE para as duas esponjas em estudo.

Em relação ao método analítico utilizado, foram obtidas repetibilidades e reprodutibilidades adequadas para ser aplicado na análise de extractos brutos, das duas espécies em estudo.

Agradecimentos:

Ao ICN- Reserva Natural da Berlenga pelo apoio logístico e todas as facilidades concedidas.

À Helena Gaspar, Joana Xavier e Gonçalo Calado pela recolha das amostras.

À Joana Xavier pela classificação sistemática das mesmas.

Comparativamente, since the specie *S. officinalis* present higher specific AChE activity values (table 9) it may be a preferential specie for use in future evaluation studies. Nevertheless, more studies are necessary, especially with a higher number of specimens also collected at different locations in order to improve our knowledge about AChE specific activity values for these species, since a considerable variability was found.

In what the analytical method is concern, the repeatabilities and reproducibilities found were considered adequate for the application of crude extracts from these two species in biomonitorization studies.

Acknowledgements

To ICN- Reserva Natural da Berlenga for the logistic support and facilities.

To Helena Gaspar, Joana Xavier and Gonçalo Calado for sample recolection.

To Joana Xavier for taxonomical classification.

Bibliografia / References

- [1]. Soreq H, Seidman S Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature* 2001;2: 8-17.
- [2]. Houghton P, Ren Y, Howes M Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* 2006; 23: 181-199.
- [3]. Zimmerman G, Soreq H Termination and beyond:acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Research* 2006; 326: 655-669.
- [4]. Zimmerman G, Soreq H Termination and beyond:acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Research* 2006; 326: 655-669.
- [5]. Bocquené G, Roig A, Fournier D Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*) *FEBS Letters* 1997;14: 1-6.
- [6]. Hamza-Chaffai A, Romeo M, Gnassia-Barel, El Abed A Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull Env Cont Tox* 1998 ; 61: 397- 404.
- [7]. Guilhermino L, Barros P, Silva MC, Soares AMVM Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 1998;3: 157-163.
- [8]. Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 2006; 15:333-340.
- [9]. Marques Daniela Estudo prévio de avaliação da esponja *Cliona celata* para efeitos de biomonitorização Tese de mestrado em Química Analítica Aplicada, FCUL, 2005.
- [10]. Marques D, Almeida M, Xavier J, Humanes M Biomarkers in marine sponge- acetylcholinesterase in the sponge *Cliona celata* aceite para publicação em *Porifera Research -Biodiversity, Innovation, Sustainability* 2007.
- [11]. Ellman GL, Courtney D, Andreas V, Featherstone RM A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharm* 1961;7: 88-95.
- [12]. Brown M, Davies IM, Moffat CF, Redshaw J, Craft JA Characterisation of choline esterase and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). *Mar Environ Research* 2004;57: 155-169.
- [13]. Bensadoun A, Weinstein D Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 1976;70: 241-250.