



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALEXANDRE D'AGOSTINI ZOTTIS

**USO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
DIAGNÓSTICO AMBIENTAL EM OSTRAS,
Crassostrea gigas e MEXILHÃO, *Perna perna* DE
MALACOCULTURA DA
ILHA DE SANTA CATARINA.**

Florianópolis,

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**USO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
DIAGNÓSTICO AMBIENTAL EM OSTRAS,
Crassostrea gigas e MEXILHÃO, *Perna perna* EM ESTAÇÕES DE
MALACOCULTURA DA
ILHA DE SANTA CATARINA.**

**Dissertação apresentada como
requisito Parcial à Obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia
– Área de concentração: Ambiental,
da Universidade Federal de Santa
Catarina – UFSC**

Aluno: Alexandre D'Agostini Zottis

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Florianópolis, SC, Brasil

Março, 2005

Dedico este trabalho a André Carlos Zottis, por ser um exemplo de vida e não se encontrar mais na Terra, e que infelizmente não pode testemunhar a conquista dessa vitória!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Danilo Wilhelm Filho, pela orientação, amizade, compreensão, paciência, e tempo dedicado para que eu pudesse desenvolver e concluir este trabalho; também agradeço por ter-me aceito neste programa, mesmo sabendo que não tinha a formação para atuar na área, mas, permitiu-me mostrar que seria capaz de vencer essa etapa. Além de ter sido um grande companheiro e amigo meu. Foi uma honra tê-lo tido como orientador.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Soares, por ter-me auxiliado nas análises dos parâmetros físico-químicos da água do mar, e pelas observações feitas para enriquecer este trabalho.

Aos professores Dr. José Maria Monserrat e Dr^a Aimê Rachel Magalhães, pela paciência e compreensão do esforço despendido neste trabalho, bem como as valiosas sugestões para a melhoria do mesmo.

Às professoras Dr^a Rosangela Curi Pedrosa, grande amiga, flexível e muito justa, e Regina Vasconcelos, pela carinhosa acolhida em seus laboratórios e pela disposição em compartilhar suas experiências e apoio necessário para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Eloi Melo Filho, do Departamento de Engenharia Ambiental desta instituição, por ter cedido dados de simulação do programa POM, para tornar o estudo mais completo.

Aos funcionários da biblioteca do IPUF, por terem cedido as fotos de geoprocessamento. Aos funcionários da FATMA; (Berenice, do Laboratório de

Ecotoxicologia, à diretora de Recursos Hídricos, Ana Cimardi, e aos funcionários da biblioteca pelo auxílio das fontes bibliográficas).

Também quero agradecer os funcionários, técnicos (Yara) e engenheiros Agrônomos da Epagri, por terem me auxiliado na busca de informações, especialmente ao Engenheiro Agrônomo Dr. Hugo José Braga, chefe do núcleo de Pesquisa em Agrometeorologia do CIRAM.

Especialmente aqui vai também um obrigado aos maricultores Carlos (Gaúcho), Fernando e o presidente da AMASI, Sr. Adércio, por terem permitido o andamento das pesquisas nos cultivos, mesmo depois de ter ocorrido a confusão causada não por eles, mas sim por uma atitude irresponsável por parte de uma professora do curso.

Aos queridos colegas de laboratório, Tiago, Gustavo, Leonilda, Fabíola, Mariana, Maria Cláudia, Patrícia, Luziane, Tatiane, Cíntia, e recentemente o Bruno, pela ajuda e à Anabele Belinha, pelas análises físico-químicas, prestatividade, companheirismo e os inesquecíveis momentos de descontração durante o ano.

A todo o pessoal do Mestrado, e meus colegas pela troca de experiências científicas, aos bons momentos em que a amizade, companheirismo e alegria fizeram parte do nosso dia a dia em sala de aula, valeu estar com vocês, especialmente Baiano (o mau humorado, segundo o Prof. Carlos Pinto), Ana Kelli, Alessandra, Renato, ao Jean, Alexandre, meu xará, Luciano pelos valiosos conselhos e amizades no decorrer do nosso curso.

Ao meu colega Tiago, agora mestre em Farmácia, e amigo das horas que dedicou um pouco de seu tempo para me auxiliar e pela sua disposição, prestatividade em dividir seus conhecimentos sobre as técnicas no laboratório e auxílio nas medidas e pelos churras, para que eu tivesse menos dificuldades a enfrentar no decorrer do meu estudo.

Ao professor Dr. Mário Steindel, pela excelente competência com que desempenha a difícil tarefa de coordenar este programa de pós-graduação. Ao professor Dr. Carlos Pinto, por ser um dos poucos a acreditar no meu potencial dentro deste curso, enquanto que muitos duvidavam que eu chegaria lá.

Ao professor Dr. Paulo César D'Ajeillo, do Departamento de Física, por ter-me mostrado que é importante nunca desistir e que sempre que uma porta se fecha, outras podem se abrir, desencadeando em surpresas que nunca esperaríamos, simplesmente por terem depositado a confiança, quando tudo parecia desabar ou estar perdido.

Aos meus pais Orvelino e Nelcinda, por nunca terem desistido de mim, e sim por sempre me apoiarem e serem, mais do que tudo, um exemplo de vida e união a serem seguidos nesta longa jornada. Ao meu irmão gêmeo Aroldo, que, mesmo não entendendo direito do que se tratava este estudo, procurou me auxiliar, da mesma forma agradeço ao meu cunhado Tide pela compreensão e companheirismo durante sua estadia conosco. A meus irmãos Edu e Cláudia, minha cunhada Iva, mesmo de longe compreenderam a importância deste trabalho.

À minha querida companheira e namorada Vanice, fiel escudeira das horas difíceis, que mesmo de longe nunca deixou de torcer e me incentivar para que eu pudesse concluir ao longo desses dois anos, por todo o carinho e compreensão nas horas mais complicadas e do tempo abdicado do seu convívio, e cada dia estar me estimulando em busca de conhecimento e melhoria como ser humano, simplesmente, amo você.

Agradeço também a presença de uma energia poderosa (alguns chamam de Deus), por ter-me dado forças para trilhar o rumo certo para enfrentar grandes dificuldades no decorrer do curso e nas horas mais difíceis e complicadas.

Enfim, a todos aqueles aqui não declinados nominalmente, que com seus conhecimentos, comentários, sugestões e apoio tornaram possível a realização deste trabalho.

“...Não são os mais fortes da espécie que sobrevivem, nem os mais inteligentes, mas sim os que respondem melhor às mudanças” (Charles Darwin).

RESUMO

Vários estudos sugerem que moluscos bivalves têm adquirido grande importância como sentinelas em programas de monitoramento da poluição marinha. Este trabalho teve como objetivo realizar um diagnóstico em estações de malacocultura incluindo a influência sazonal dos biomarcadores de estresse oxidativo em mexilhão e ostra, tentando correlacioná-los com parâmetros físico-químicos e microbiológicos das estações. Os animais adultos (n=10) de cada estação foram coletados em 3 sítios: sítio sul, PS = Ribeirão da Ilha, sítio referência, PC = Caieira da Barra do Sul, e sítio norte, PN = Ponta do Sambaquí em diferentes épocas do ano perfazendo um total de 180 amostras. Especificamente, 120 exemplares de *Crassostrea gigas* foram amostradas durante as quatro estações do ano entre 2003 e 2004, enquanto que 60 exemplares de *Perna perna* foram coletados durante os meses de Novembro/2003 e Julho/2004. Analisou-se espectrofotometricamente o dano celular por peroxidação lipídica (TBARS), glutathiona reduzida e total (GSH e GT), as atividades enzimáticas da catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST). Os conteúdos de TBARS apresentaram-se elevados em PS na ostra e no mexilhão, enquanto que os conteúdos de GSH mostraram-se diminuídos em PS e PN para ostra na maior parte do ano e aumentados em PS durante a primavera para o mexilhão. As atividades da GST, GPx e GR apresentaram comportamento semelhante para ostras e mexilhões, geralmente aumentadas em PS. As respostas das defesas antioxidantes em *Perna perna* e *Crassostrea gigas* sugerem um maior estresse oxidativo em PS, coincidente com maior ação antrópica verificada através de uma maior concentração de coliformes neste sítio. Provavelmente em PS, onde há menor circulação de água e correntes coincide com maior nível de estresse oxidativo e níveis de coliformes na água em mar aberto, sugerindo que o padrão de circulação das águas pode influenciar as defesas antioxidantes destes moluscos concomitantemente com a sazonalidade.

Palavras chaves: moluscos, malacocultura, sazonalidade, bioindicadores, antioxidantes, biomarcadores, estresse oxidativo, contaminação aquática.

ABSTRACT

Several studies on bivalve mollusks have pointed out the importance of the bioindicators on aquatic pollution monitoring programs. The present study consists of a risk assessment of three mollusk-farming sites located at Santa Catarina Island using oxidative stress biomarkers in brown mussels and oysters. Adult individuals (n=10 each site) were sampled into three sites, south site (PS) = Ribeirão da Ilha, north site (PN) = Ponta do Sambaquí and reference site (PC) = Caieira da Barra do Sul, comprising 180 samples. More specifically, 120 samples of *Crassostrea gigas* were collected during spring (October/2003), summer (January/2004), fall (May/2004) and winter (July/2004), whilst 60 individuals of *Perna perna* were sampled during spring (November/2003) and winter (July/2004). Cell damage (TBARS), reduced and total glutathione (GSH e GT) and also the enzymatic activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) were evaluated spectrophotometrically. GSH contents and GST activity exhibited different responses within sampled sites in both bioindicators. TBARS contents were elevated at PS site in oyster and brown mussel compared to PC, whilst GSH contents were decreased at PS and PN comparatively to PC for the oyster most part of the year, and elevated during spring for the mussel. GPx and GR showed similar responses in both organisms. The responses of the antioxidant defenses in *Perna perna* and *Crassostrea gigas* suggest a higher oxidative stress in PS, which coincided with a higher anthropic influence verified through the higher coliform concentration found at this site. Apparently, PS is characterized by lower circulation pattern compared to PN and PC, and these might be correlated with higher oxidative stress and coliform contents in the water, therefore influencing the antioxidant defenses of these mollusk species together with seasonality.

Key words: Mollusks; Malacoculture; Seasonality; Bioindicators; Antioxidants; Biomarkers; Oxidative stress; Aquatic contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1: Municípios produtores de mexilhão no estado de Santa Catarina	10
2:: Gráfico que indica a evolução da produção de mexilhões (toneladas) em Santa Catarina.....	10
3: Quadro ilustrativo da redução do oxigênio `a água, mostrando as EROs provenientes das reações.....	20
4- Mapa da Ilha de Santa Catarina mostrando os sítios de coleta de amostras.....	35
5: <i>Crassostrea gigas</i> (ostra japonesa) e <i>Perna perna</i> (mexilhão)	36
6.1-A e B: Níveis de TBARS na glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> coletadas durante a primavera de 2003 e verão de 2004.....	48
6.1-C e D: Níveis de TBARS na glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> coletadas durante o outono e inverno de 2004.....	48
6.2-A e B: Níveis de GSH em glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> durante primavera de 2003 e verão de 2004.....	50
6.2-C e D: Níveis de GSH em glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> coletadas durante o outono e inverno de 2004.....	50
6.3-A e B: Níveis de glutaciona total na glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> coletadas durante a primavera de 2003 e verão de 2004.....	52
6.3-C e D: Níveis de glutaciona total na glândula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> coletadas durante o outono e inverno de 2004.....	52
6.4-A e B: Atividade enzimática da glutaciona redutase da ostra durante primavera de 2003 e verão de 2004	54
6.4-C e D. Atividade enzimática da glutaciona redutase na glândula digestiva da ostra durante o outono e inverno/2004.....	54
6.5-A, B, C e D: Atividade da GPx na glândula digestiva da ostra durante a	

primavera/ 2003, verão, outono e inverno/2004.....	56
6.6-A e B: Atividade da CAT na glândula digestiva da ostra durante a primavera/2003 e verão/2004.....	58
6.6-C e D: Atividade da CAT na glândula digestiva da ostra durante o outono e inverno/2004.....	58
6.7-A e B: Atividade da GST na glândula digestiva da ostra durante a primavera/2003 e verão/2004	60
6.7-C e D: Atividade da GST na glândula digestiva da ostra durante o outono e inverno/2004	60
6-8. Níveis de TBARS encontrados na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade	61
6-9. Níveis de GSH encontrados na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade.....	62
6-10. Níveis de GT encontrados na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade.....	63
6-11. Níveis da atividade específica da GST na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade.....	64
6-12. Níveis da atividade da GR na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade	65
6-13. Níveis da atividade específica da GPx na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade.....	66
6-14. Níveis da atividade da CAT na glândula digestiva da ostra com a influência da sazonalidade.....	67
6.15: Níveis de lipoperoxidação na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletado durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	68
6.16: Níveis de GSH em glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletado durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	69
6.17: Níveis de glutathiona total na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletado durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	70

6.18: Atividade enzimática da glutathione redutase na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletado durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	71
6.19: Atividade da glutathione peroxidase na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletadas durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	73
6.20: Atividade da catalase na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletado durante a primavera de 2003 e inverno de 2004	74
6.21: Atividade da glutathione na glândula digestiva de <i>Perna perna</i> coletadas durante a primavera de 2003 e inverno de 2004.....	75

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabelas e quadro	Página
01: Propriedades físicas da água dos sítios amostrados no inverno (27 a 28 de julho) de 2004 nos sítios de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.....	42
02: Propriedades físicas da água dos sítios amostrados no verão (07 a 20 de janeiro) de 2005 nos sítios de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.....	42
03: Propriedades químicas da água dos sítios amostrados no inverno (27 a 28 de julho) nas regiões de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.....	43
04: Propriedades químicas da água dos sítios amostrados no verão (07 a 20 de janeiro) de 2005 nas regiões de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CF	Coliformes fecais
CT	Coliformes totais
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GR	Glutathione redutase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
GT	Glutathione total
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO ⁻	Ácido hipocloroso
LOOH	Hidroperóxido lipídico.
NO [•]	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NMP	Número Mais Provável
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS E QUADRO	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo Geral.....	5
3.2 Objetivos Específicos	5
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
4.1 A MARICULTURA.....	7
4.1.1 O cultivo de mexilhões (Miticultura).....	7
4.1.2 O cultivo de ostras (Ostreicultura).....	12
4.1.3 A ação dos poluentes nas atividades de malacocultura	15
4.1.4 A geração de RLO e EROs em organismos aeróbios.....	19
4.1.5 Os danos oxidativos	21
4.1.6 As defesas antioxidantes	22
4.1.6.1 Defesas antioxidantes enzimáticas.....	23
4.1.6.2 Defesas antioxidantes não-enzimáticas	25
4.1.7 O estresse oxidativo.	26
4.1.7.1 O efeito dos poluentes e o estresse oxidativo em organismos aquáticos	26
4.1.8 A importância dos bioindicadores e dos biomarcadores em biomonitoramento e diagnóstico ambiental.....	28
4.1.9 Os moluscos como bioindicadores de estresse oxidativo.....	30

5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 Áreas de estudo.....	32
5.2 Material Biológico.....	35
5.3 Análises físico-químicas.....	36
5.4 Preparação das amostras.....	37
5.5 Análise das amostras.....	38
5.5.1 Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS).....	38
5.5.2 Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas.....	38
5.5.2.1 Glutationa Reduzida (GSH).....	38
5.5.2.2 Glutationa Total (GT).....	39
5.5.3 Análise das defesas antioxidantes enzimáticas.....	39
5.5.3.1 Glutationa Redutase (GR).....	39
5.5.3.2 Glutationa Peroxidase (GPx).....	39
5.5.3.3 Catalase (CAT).....	40
5.5.3.4 Glutationa S- Transferase (GST).....	40
5.6 Análise Estatística.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Análises físico-químicas.....	42
6.2 Análises Microbiológicas.....	45
6.3 Análise comparativa dos biomarcadores de estresse oxidativo em <i>Crassostrea gigas</i> nos distintos sítios.....	47
6.3.1 Análise da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS).....	47
6.4 Análise dos Antioxidantes não Enzimáticos.....	49
6.4.1 Glutationa reduzida (GSH).....	49
6.4.2 Glutationa Total (GT).....	55
6.5 Análise dos Antioxidantes Enzimáticos.....	51
6.5.1 Atividade da Glutationa Redutase (GR).....	53
6.5.2 Atividade da Glutationa Peroxidase (GPx).....	59
6.5.3 Atividade da Catalase (CAT).....	61
6.5.4 Atividade da Glutationa S-transferase (GST).....	63
6.6 Análise do efeito da sazonalidade sobre os biomarcadores de estresse oxidativo nos diferentes sítios de coleta em <i>Crassostrea gigas</i>	65
6.6.1 Dano por lipoperoxidação tecidual (TBARS).....	65
6.6.2 Glutationa reduzida (GSH).....	66
6.6.3 Glutationa total (GT).....	67

6.6.4 Glutathione S-transferase (GST).....	68
6.6.5 Glutathione reductase (GR).....	69
6.6.6 Glutathione peroxidase (GPx).....	70
6.6.7 Catalase (CAT).....	71
6.7 Análise comparativa dos biomarcadores de estresse oxidativo em <i>Perna perna</i> nos distintos sítios e a variação sazonal	72
6.7.1 Análise da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS).....	72
6.8 Análise dos Antioxidantes não Enzimáticos.....	73
6.8.1 Tióis Totais (GSH).....	73
6.8.2 Glutathione Total (GT).....	75
6.9 Análise dos Antioxidantes Enzimáticos	77
6.9.1 Atividade da Glutathione Redutase (GR).....	77
6.9.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx).....	78
6.9.3 Atividade da Catalase (CAT).....	79
6.9.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST).....	80
7. DISCUSSÃO	82
8. CONCLUSÕES	95
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
11. ANEXOS	112

1. INTRODUÇÃO:

O crescimento experimentado pela aqüicultura na atualidade parece decorrer do declínio das populações naturais de peixes marinhos, pois, estima-se que hoje, 70% do estoque de pescado encontra-se em fase de esgotamento (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2001). Além disso, existe uma tendência de modificação dos hábitos alimentares pela população em geral, no sentido de preferência por alimentos de origem aquática (em termos de moluscos). Essa preferência poderia ser explicada pelo elevado conteúdo protéico associado à presença de baixas quantidades de calorias, e teor mínimo de colesterol, característicos dos moluscos bivalves (ARANA, 2004).

No Brasil, o cultivo de moluscos, especialmente, é uma atividade relativamente recente e crescente. Os primeiros projetos experimentais iniciaram em 1974 com o mexilhão *Perna perna* e as ostras *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas* (JANERI, 1999; MANZONI, 2001). Quando o assunto é a maricultura brasileira, deve-se considerar também as características oceanográficas regionais. No estado de Santa Catarina, a maricultura tem encontrado terreno fértil. Cerca de 90% da produção nacional de moluscos concentra-se no estado. (ARANA, 2004). As condições favoráveis de temperatura das águas e baías abrigadas também fazem com que o estado se destaque na produção de ostras do pacífico (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*). Para estes, os imensos bancos naturais de sementes espalhados por toda a costa rochosa do litoral catarinense são fatores favoráveis, apesar dessa prática não ser estimulada e incentivada por especialistas em malacocultura. Além de apresentar condições ambientais adequadas e um litoral bastante recortado, com baías abrigadas, a pesquisa e a extensão universitária foram importantes no processo de crescimento dessa atividade (MANZONI, 2001). Ao mesmo tempo o litoral de Santa Catarina e particularmente cidades como Itajaí, Itapema, Balneário Camboriú e Florianópolis vem sendo cada vez mais ocupadas de forma intensa e desorganizadas pelo turismo e pela imigração de

peças provenientes de outros estados. Desta forma, Florianópolis e a Ilha de Santa Catarina, cercada de praias e ecossistemas exuberantes como dunas, manguezais e lagoas vêm sofrendo intensamente a ação antrópica. Florianópolis é uma cidade de grande potencial turístico e acaba atraindo mais pessoas e gerando um contínuo aumento no índice de impacto nos entornos da Ilha de Santa Catarina. De acordo com dados do IBGE (2002) o último censo em 2000 revelou que cerca de 1/3 da população do país, não recebe água tratada e cerca de apenas 37,3% que habita a região sul do país possuem sistemas ligados de esgotos. Desse modo, cada vez mais a ocupação urbana vem revelando ser forte contribuinte para o aumento da poluição, incluindo os ambientes marinhos e em estuários catarinenses principalmente através de efluentes industriais e domésticos, inclusive nas baías sul e no norte da Ilha de Santa Catarina. Dessa forma os ecossistemas costeiros aparecem em um contexto de forte pressão tecnocrática que se acentuou nas últimas décadas em forma de contaminação ambiental. Esse crescente desenvolvimento na zona costeira, alavancado pela expectativa de melhor qualidade de vida, abriga em sua calda, dezenas de milhares de produtos químicos, orgânicos e inorgânicos, tais como bifenilas policloradas, 2,3,7,8-ibenzotetracloro-p-dioxim (TCDD) e afins, dioxinas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), famílias FURAN, além de uma série de solventes orgânicos, metais-traço, tensoativos, pesticidas, entre outros. Várias evidências mostram que metais-traço e substâncias orgânicas causam danos através da formação de radicais livres de oxigênio (RLO) (WINSTON, 1991), podendo ocasionar peroxidação lipídica e conduzir a diversos processos patológicos diversos (VIARENGO *et al.*, 1991; DI GIULIO, 1995; PRAKASH, 1995; SOLE *et al.*, 1996; COSSU *et al.*, 1997; DOYOTTE *et al.*, 1997; CANOVA *et al.*, 1998; TORRES *et al.*, 2002; BAGCHI *et al.*, 2003; SHULKIN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003 e KAHLE & ZAUKE, 2003).

Este quadro atual sugere estudos com organismos aquáticos, através de uma avaliação visando um diagnóstico ambiental, baseado em estudos bioquímicos, e têm grande

importância na toxicologia aquática através de medições de índices sensitivos, ou sinais, que indicam indireta e precocemente a degradação do ecossistema, causada por diferentes contaminantes. Os biomarcadores bioquímicos mostram uma forte indicação de impacto biológico, auxiliando de uma forma preventiva e antes que alterações fisiológicas e morfológicas mais acentuadas tenham ocorrido, permitindo uma avaliação antecipada do ambiente estudado.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de biomarcadores para realização de diagnóstico ambiental e, a posteriori, no biomonitoramento de áreas que recebem poluentes de natureza diversas, é muito importante em estudos de ecotoxicologia, de caráter multi-disciplinar, pois envolve várias áreas de conhecimento.

O presente trabalho sobre defesas antioxidantes e o dano celular em espécies marinhas de moluscos bivalves de cultivo envolve áreas como meio ambiente, biologia, toxicologia aquática, aquicultura, medicina, nutrição, e até mesmo o setor econômico, de modo que a análise proposta é justificada pelas seguintes razões:

- permitir uma melhor compreensão sobre os mecanismos e respostas fisiológicas de moluscos expostos a xenobióticos de origem industrial ou doméstica;
- pela possibilidade de realizar diagnóstico ambiental de efluentes industriais e domésticos em regiões de maricultura;
- permitir, em longo prazo, que a estação de malacocultura possa ser biomonitorada de modo a permitir uma contínua avaliação da qualidade da água e do produto de cultivo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito nas principais defesas antioxidantes e em biomarcadores de estresse oxidativo presentes na glândula digestiva do mexilhão e da ostra da exposição a diferentes regiões de malacocultura das baías norte e sul da Ilha de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as eventuais diferenças quantitativas nas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, bem como nos níveis de lipoperoxidação (TBARS) na glândula digestiva do mexilhão e da ostra expostos em dois sítios de malacocultura (PS = Ribeirão da Ilha e PN = Ponta do Sambaquí), comparativamente com o sítio referência (PC = Caieira da Barra do Sul);
- Analisar as seguintes enzimas antioxidantes: Catalase; Glutathione Peroxidase; Glutathione Redutase e Glutathione S-Transferase na glândula digestiva do mexilhão e da ostra nos distintos sítios;
- Analisar as seguintes defesas antioxidantes não enzimáticas: Glutathione Reduzida e Glutathione Total na glândula digestiva do mexilhão e da ostra em diferentes sítios;
- Analisar os parâmetros físico-químicos (sulfeto, amônia, nitritos, temperatura, pH, salinidade, condutividade, e fósforo) da água coletada nos diferentes sítios de cultivo das ostras e mexilhões;

- Analisar eventuais correlações entre os níveis dos diferentes biomarcadores de estresse oxidativo com os indicadores de qualidade e microbiológicos da água dos distintos sítios de malacocultura;
- Verificar a contribuição da sazonalidade nestes biomarcadores bioquímicos;
- Verificar se ambas espécies de moluscos são bioindicadores úteis para o diagnóstico e biomonitoramento futuro de regiões de malacocultura.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 A MARICULTURA

Em Santa Catarina a maricultura tem se desenvolvido graças às características de localização geográfica do estado, havendo grande aproveitamento de áreas propícias para tal prática (ROZANSKI et al., 2000). O desenvolvimento da maricultura tem sido de grande interesse pelas possibilidades que representa em termos de fonte de alimentação de alto teor nutritivo e a geração de empregos diretos e indiretos, (MACHADO, 2002). Atualmente a grande maioria dos produtores desses municípios tem a atividade devidamente legalizada, uma vez que firmaram termo de ajuste de conduta com IBAMA/SC em 2004, sendo que 25 parques aquícolas na ilha de Santa Catarina estão cadastrados de acordo com o Instituto de Planejamento Urbano de Florianópolis (IPUF) e Escritório Municipal de Aqüicultura e Pesca (EMAPA). No entanto, a atividade de malacocultura é relativamente recente, pois existe apenas há pouco mais de uma década, e vem sendo desenvolvida desde a comercialização das primeiras sementes produzidas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jaime Ferreira.

4.1.1 O cultivo de mexilhões (Mitilicultura)

Dados arqueológicos e também registrados na literatura (MARQUES, 1997) revelam que desde a Antigüidade os mexilhões foram utilizados como fonte de alimento pelo homem. Todavia, a mitilicultura pela primeira vez foi utilizada de forma racional no século XIX na região da França, através de cultivos em balsas flutuantes e posteriormente em 1901 a técnica foi utilizada por espanhóis da Catalunha. No litoral da Galícia, o cultivo de mexilhões superou as metas de crescimento e apresentava excelentes condições ambientais. Pois, nessas regiões

situavam-se as famosas “rías galegas”, constituídas por vales profundos e inundadas pelo mar, com águas riquíssimas em fontes de nutrientes e de alimentos para o melhor crescimento dos mexilhões. Em 1976 a produção espanhola de cultivo de mexilhões alcançou o montante de 240 mil toneladas, sendo que 95% eram provenientes da região da Galícia. Essas cifras de produção foram aumentando a cada ano e o mercado mundial de exportação de mexilhões se concentrou nos principais países da Europa (Espanha, Holanda, Itália e França). Porém, a partir de 1985, o país líder e maior produtor de mexilhões deixou de ser localizado na Europa, e sim no continente asiático. De modo que em 1997 a China atingiu o primeiro lugar com cerca de 415 mil toneladas de mexilhões cultivados, chegando a 50% da produção total mundial (FAO, 1999). Esta alteração no quadro mundial na mitilicultura é justificada pelo simples fato de que a China, através de sua política de mercado fechada não divulgava esses resultados. Após a década de 80, houve uma abertura por parte do governo com relação à divulgação de informações para o mundo globalizado. Outro motivo consiste em dois problemas que a Europa vem enfrentando desde a década de 80 até hoje: o aumento da produção industrial em larga escala, fazendo com que elevada carga de poluentes seja descarregada nos mares europeus, e a falta de áreas disponíveis para ampliação da produção nas estações de mitilicultura. No Brasil, a mitilicultura desenvolveu-se de forma mais lenta com relação a outros países da América Latina (Chile, Argentina e Colômbia), de acordo com Hernandez (1990). As regiões mais favoráveis para a implantação de criações estão localizadas no litoral Sul e Sudeste, desde o Espírito Santo até Santa Catarina. Em 1970 os primeiros experimentos foram desenvolvidos pelo antigo Instituto de Pesquisas da Marinha (hoje já extinto) no município de Arraial do Cabo, situado no estado do Rio de Janeiro. Alguns destes projetos tiveram curta duração, sendo também prejudicados fundamentalmente pela constante falta de recursos, principalmente de ordem financeira. Destes resistem até os dias atuais os projetos de ostreicultura e mitilicultura mantidos pelo Instituto de Pesca do

Estado de São Paulo e pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). Somente a partir de 1987, o estado de Santa Catarina iniciou o desenvolvimento da mitilicultura através da iniciativa de pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) juntamente com recursos e suporte de alguns órgãos governamentais (ARANA, 2004).

Apesar de existir uma tecnologia disponível para cultivo, sabe-se que a maioria dos mexilhões que são produzidos no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, provêm do extrativismo. Essa prática além de ser muito agressiva ao meio ambiente apresenta algumas desvantagens: a) pela falta de fiscalização das regiões de extração, os mexilhões muitas vezes situam-se em locais contaminados química ou biologicamente, podendo ocasionar sérios problemas à saúde do consumidor; b) o esgotamento dos estoques naturais; c) menor rendimento em carne e um aspecto externo inferior ao dos mexilhões cultivados, além de conter resíduos de areia e detritos; e d) o próprio manuseio dos mexilhões extraídos, feito sem cuidados higiênicos, pode levar à contaminação dos mesmos, prejudicando ainda mais a qualidade de produto (MARQUES, 1997). Felizmente esse tipo de prática vem sendo abolida cada vez mais no estado de Santa Catarina através da iniciativa por parte dos maricultores e EPAGRI dos municípios de Florianópolis, Palhoça, Penha, Governador Celso Ramos e Bombinhas. De modo que o estado de Santa Catarina tornou-se líder no país na produção de mexilhões cultivados em relação aos outros estados produtores. A atividade hoje mobiliza cerca de 1,2 mil pessoas diretamente e outras 6 mil indiretamente, numa movimentação financeira que, em 2004, chegou a R\$ 30 milhões. (MACHADO, 2002). O estado de Santa Catarina é responsável por cerca de 94% da produção na maricultura nacional. Nestes dez anos de mitilicultura, cerca de 800 produtores ingressaram na atividade, foram demarcadas 102 áreas de cultivo (agrupadas em nove áreas principais, ocupando 93 hectares), criadas 13 associações de produtores, e construídas quatro unidades de processamento de moluscos. O número de

empregos diretos gira em torno de 4000 pessoas, e cada hectare de cultivo de mexilhão tem possibilitado a geração de até 52 empregos. (EPAGRI, 1998).

Os municípios de Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Penha são os principais produtores de mexilhão em Santa Catarina, sendo que a produção anual total em 1998 chegou a 7970 toneladas. (Fig. 1). Atualmente, a produção estimada de acordo com o relatório da EPAGRI (2002) e do EMAPA no estado já ultrapassou as 11500 toneladas (Fig.2).

Município	Produtores	Associados	Prod. de mexilhões (T.)
B. Camburiú	3	0	70
Bombinhas	100	48	1.255
Norte da Ilha	54	13	110
Sul da Ilha	108	20	190
Gov. Celso Ramos	249	55	2.800
Palhoça	98	18	1.890
Penha	79	29	1.300
Porto Belo	45	12	400
S. Francisco do Sul	57	9	155
Totais	793	204	7.970

Fig. 1: Municípios produtores de mexilhão no estado de Santa Catarina. Fonte: EPAGRI (1998)

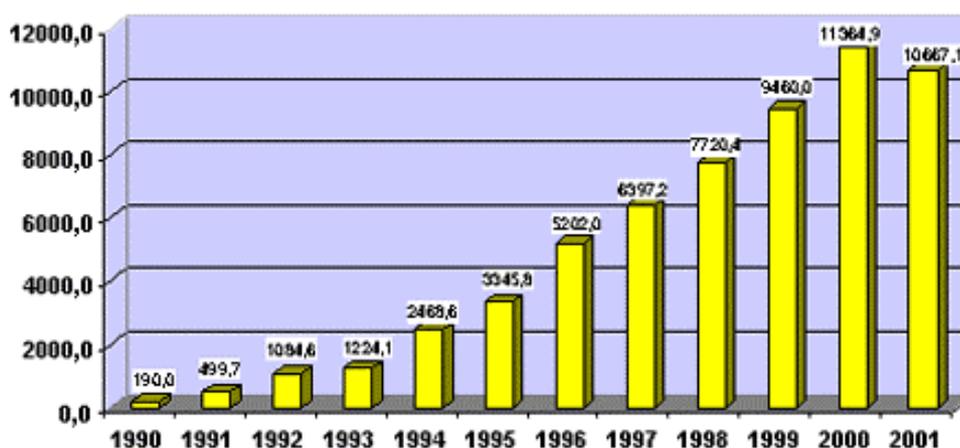


Fig.2: Gráfico que indica a evolução da produção de mexilhões (toneladas) em Santa Catarina.

Fonte: Epagri (2002).

Os mexilhões são moluscos bivalves pertencentes à família Mitilidae (justificando o termo mitilicultura: criação de mitilídeos). Dentro dessa família existem diversas espécies de mexilhões comestíveis e de importância comercial pertencentes a vários gêneros. O gênero *Mytilus* é o mexilhão cosmopolita, e é encontrado em todos os oceanos, sendo muito cultivados na Europa, particularmente as espécies *M. edulis* na Holanda, França e Itália, e *M. galloprovincialis* na Espanha. Para o gênero tropical, o *P. Perna*, distribui-se pelos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África) e Índico (África, Ásia e Oceania), além do Mar Mediterrâneo (costa africana), sendo que a espécie *P. viridis* e *P. perna* são nativas da Índia e do Brasil, respectivamente. Por outro lado, habitando regiões subtropicais e no oceano Pacífico (costa do Chile) e Índico (África do Sul e Oceania) existe o gênero *Choromytilus* e *Aulaconija* e vários outros. E finalmente, o gênero *Crenomytilus*, que habita regiões de água mais temperada e distribui-se nos mares Negro e Báltico. No Brasil, as principais espécies de mitilídeos que possuem interesse comercial são: o *Perna perna*, sendo a espécie nativa de águas costeiras que ocorre desde o estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul; o *Mytilus edulis platensis*, porém muito restrita ao litoral do Rio Grande do Sul; a *Mytella guyanensis*, comumente conhecido como “marisco-do-mangue” concentra-se em águas salobras e ocorre em manguezais e estuários desde o Amapá até o litoral de Santa Catarina; e a *Mytella falcata*, espécie distribuída desde o Amapá até o Rio Grande do Sul (MARQUES, 1997). No entanto, a espécie nativa *Perna perna* é a mais comercializada e apresenta o maior interesse, uma vez que a mesma possui a melhor adaptação frente a variações de temperatura e se adaptam facilmente às mais diversas condições ambientais (MAGALHÃES, 1998).

4.1.2 O cultivo de ostras (Ostreicultura).

Uma das atividades mais crescentes e rentáveis entre os cultivos de moluscos bivalves, é a ostreicultura ou criação de ostras. As ostras possuem um rápido crescimento, rusticidade de cultivo e alto valor comercial, chegando a representar 36% da produção mundial de moluscos em 1997 (FAO, 1999). Considerando todas as espécies comerciais de ostras, a produção mundial gira em torno de 800 mil toneladas anuais, sendo que 75% provem de cultivo e o restante é de extrativismo (COSTA, 1998). Os principais países produtores de ostra do Pacífico são: Estados Unidos, Japão, França e México. Estes países concentram cerca de 90% da produção mundial, sendo que os Estados Unidos representam 50% da produção total. Porém, nos últimos anos houve uma queda elevada (cerca de 1/3) na produção, basicamente por problemas de contaminação. Atualmente a produção mundial de ostras por espécie está composta por: 94% de *Crassostrea gigas*; 4% de *C. virginica* e *C. angulata*; e 2% de *Ostrea* (também chamadas de ostras planas) (TIRELLI, 2004). No cenário de comércio internacional ironicamente, o maior produtor é também o maior importador, uma vez que os Estados Unidos importam para subsidiar a demanda interna da população, cerca de 10 mil toneladas de ostras, basicamente *Crassostrea gigas* provenientes da Coreia, Japão (HERNANDEZ, 1990).

A ostra pertence à família Ostreidae e caracteriza-se por ter um corpo mole, protegido por duas valvas distintas alongadas na direção dorso-ventral e unidas na região do umbo pelo ligamento articular, que é desprovido de dentes (WALNE, 1979; COSTA, 1998). As espécies de ostras geralmente encontradas nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico são: a *Crassostrea rhizophorae* que geralmente se adapta a climas mais temperados e tropicais tal que ela se constitui como uma espécie nativa para regiões da América do Sul; a *Ostrea pulchana* que habita principalmente mares da Argentina e algumas regiões do Brasil; a *Crassostrea columbiensis* que habita o litoral do Pacífico, sendo que se constitui como uma espécie nativa

na Colômbia; a *Ostrea chilensis* que é uma espécie nativa dos mares do Chile; a *Crassostrea virginica* é proveniente do litoral da Índia e regiões da Austrália; e a principal e mais cultivada no mundo (contribui atualmente com 94% da produção mundial de ostras) é a *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1797), também denominada “ostra do Pacífico” ou “ostra japonesa”, apresenta-se com uma ampla distribuição geográfica, é encontrada em baías e áreas protegidas do Japão, estendendo sua distribuição a mares abertos e regiões costeiras da Coreia, China e Indonésia (AKABOSHI, 1979; IMAI, 1982; VINATEA, 1999). Ela desenvolve-se bem em águas com temperatura entre 11 e 25 ° C e salinidade entre 14 e 35%(AKABOSHI, 1979). Por essa razão, países com mares apresentando temperatura e salinidade variando nessa faixa estão cada vez mais produzindo sementes, investindo no cultivo e comercialização desse tipo de espécie exótica que se adaptou bem a climas tropicais e subtropicais. Particularmente o Chile vem investindo e pesquisando melhorias das técnicas de produção desde 1977 e atualmente apresenta uma estrutura e tecnologia de cultivo bem dominada, fazendo com que se tornasse o maior produtor de ostras da espécie *Crassostrea gigas* da América do Sul. Além disso, ostreicultores desse país vêm desenvolvendo desde 1980 um intercâmbio com outros países produtores (França e Canadá) para capacitação e melhoria do conhecimento nas técnicas de cultivo (HERNANDEZ, 1990). Em consequência desse aprimoramento, no final dos anos 90 estabeleceu-se um acordo internacional para a certificação das águas através do Memorandum de Entendimento entre o FDA (Food and Drug Administration,) e a Subsecretaria de Pesca do governo chileno (HERNANDEZ, 1990). Desse modo o Chile passou a comercializar internacionalmente ostras frescas para os principais países consumidores. No Brasil, infelizmente a ostreicultura, assim como a mitilicultura, ainda caminha a passos lentos, uma vez que o país não apresenta uma câmara setorial e estratégica que possa fiscalizar, coordenar e fixar normas e leis modernas e mais específicas para a comercialização de ostras no mercado nacional. Segundo Tirelli (2004),

nenhuma estação de ostreicultura no país apresenta-se de forma legalizada, sendo que em sua maioria são administradas por antigos pescadores artesanais ou autônomos que viram nesse ramo da maricultura uma atividade de baixo custo de mão-de-obra e alta rentabilidade. No entanto, tentativas louváveis e esforços em estudos e pesquisas no desenvolvimento no cultivo de ostras em regiões do Brasil vêm ocorrendo desde a década de 70. A ostra *Crassostrea gigas* no Brasil foi introduzida em 1974 pelo Instituto de Pesquisa Marinha em Cabo Frio, Rio de Janeiro. Técnicas e estudos experimentais de cultivo das espécies de ostras nativa *Crassostrea rhizophorae* e ostra-dos-mangues *Crassostrea brasiliana* foram desenvolvidas no litoral norte de São Paulo, na região lagunar de Cananéia. No estado de Santa Catarina a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* japonesa chegou em 1987 através do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), do Departamento de Aqüicultura da UFSC, que foi pioneiro na larvicultura para cultivo em escala comercial visando complementar a renda de pescadores artesanais e populações tradicionais das comunidades (LCMM, 1995; COSTA, 1998; POLI *et al.*, 1999). A partir de 1991, muitos produtores de mexilhões começaram a cultivar ostras, iniciando o cultivo de *C. gigas* em Santa Catarina em escala de produção comercial e principalmente diversificaram a oferta de moluscos cultivados, passando de 48000 dúzias em 1992 para 1.592.213 dúzias em 2002 (ARANA, 2004). Atualmente a ostreicultura, seja em escala comercial ou em fase experimental, faz parte da realidade de vários estados brasileiros, entre eles: Bahia, Pernambuco, Sergipe, Ceará, Maranhão e, especialmente Santa Catarina. Santa Catarina detém o título de maior produtor da espécie exótica *Crassostrea gigas* (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2001; GLOBO RURAL, 2005). A costa litorânea de Santa Catarina, associada a uma elevada e diversificada produtividade do mar, favorece e muito o desenvolvimento e o cultivo de moluscos bivalves (mexilhões, ostras e vieiras) (ROZANSKI *et al.*, 2000). Atualmente o município de Florianópolis contribui com cerca de 90% da produção de ostras *C. gigas* e existem cadastrados em torno de 120 produtores na Ilha

de Santa Catarina, sendo subdivididos em várias associações e fortalecidos por algumas entidades civis e municipais, tais como a Associação dos Maricultores do Sul da Ilha (AMASI), Associação dos Maricultores do Norte da Ilha (AMANI), a Associação dos Maricultores de Palhoça (AMAP), e o Escritório Municipal de Pesca e Aqüicultura (EMAPA), subordinado à Prefeitura Municipal de Florianópolis. Todavia, apesar do grande volume de ostras comercializadas muitas entraves ainda persistem em ocorrer no setor de ostreicultura por falta de uma melhor organização e logística dos produtores e comerciantes. Existe interesse por parte da indústria de pescado, principalmente pelo mexilhão, como alternativa para diminuir a ociosidade de seus parques de acondicionamento, esbarrando todavia, na efetivação dos planos de “origem garantida”, do produto, livre da contaminação ambiental, enfim, em condições sanitárias confiáveis (citado por OSTINI em HERNANDEZ, 1990). Do total do volume movimentado no mercado interno, 90% é aparentemente ainda feito de forma irregular, pois, falta certificação de origem, beneficiamento, produção e assim a comercialização é realizada de forma clandestina e de maneira totalmente empírica, sendo que o eixo de mercado interno distribui-se entre os estados Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (MACHADO, 2002).

4.1.3 A ação dos poluentes nas atividades de malacocultura.

Além da malacocultura (criação de ostras, mexilhões, vieiras e petínídeos) ser uma atividade geradora de renda e emprego nas comunidades pesqueiras, apresenta-se como fixadora das populações tradicionais, diminuindo a pesca predatória, favorecendo o retorno de espécies de peixes aos locais de cultivo. Um fator positivo além de outras já existentes, desta atividade é a recuperação dos estoques pesqueiros e a formação e/ou recuperação da biodiversidade. A outra vantagem é que diferente da piscicultura marinha, a alimentação das

ostras e mexilhões é feita naturalmente, não sendo lançado nenhum tipo de alimento no mar, existindo facilidade de manejo dos animais.

Porém, existem fatores negativos que a maricultura pode trazer em relação à alteração antrópica ao meio ambiente, apesar de que no litoral brasileiro ocorre o contrário (MAGALHÃES, comunicação pessoal). No Brasil, não existem estudos sobre os efeitos de cultivos marinhos suspensos sobre o sistema bêntico. Mas sabe-se que os cultivos em Santa Catarina são desenvolvidos em sua maioria em águas com menos de 4 m de profundidade (chegando no máximo a 9 m), onde predominam sedimentos finos, o que sugere pouca circulação de água, e aptos para acúmulo de detrito orgânico. Soma-se a isto recentes políticas de incentivo econômico para o desenvolvimento da maricultura no Brasil sem estudos de impacto ambiental futuro, que podem acelerar um processo de deterioração ambiental. Portanto, é recomendável adotar um programa de monitoramento ambiental para avaliar tanto a qualidade das áreas de cultivo como áreas potencialmente cultiváveis. A extensão dos danos causados no meio ambiente pela maricultura depende de vários fatores, em especial a capacidade de assimilação, que compreende a capacidade do ambiente em diluir e estabilizar os dejetos oriundos dos cultivos, e da capacidade suporte do ambiente, ou seja, o tamanho máximo estável da população de organismos cultivados, determinado pela quantidade de recursos disponíveis e demanda mínima individual. Atualmente no Brasil, os esforços estão centrados no desenvolvimento tecnológico para o aumento de produção. Porém, o desenvolvimento sustentável desta atividade é completamente dependente da qualidade do ambiente. Infelizmente, pouca ou quase nenhuma atenção tem sido dada para os efeitos dos cultivos nos sistemas costeiros. O comprometimento das áreas de cultivo traria como consequência final um prejuízo para a própria produção, primeiramente diminuindo o crescimento, e posteriormente inviabilizando o cultivo.

Dados levantados pela EPAGRI e Shmitt (1998), revelaram que a maioria das estações de malacocultura no estado de Santa Catarina está em contato com áreas como rios, microbacias e estuários, onde ocorre o lançamento indiscriminado e não controlado de esgotos. Atualmente, os 2 sítios que na Ilha de Santa Catarina que se encontraram nestas condições foram recentemente desativados. Entende-se aqui como esgoto os despejos provenientes das diversas modalidades de uso das águas, como o doméstico, o industrial o comercial, o uso de utilidades públicas, etc. Nas criações localizadas em locais poluídos por esgotos domésticos, principalmente próximos a grandes centros urbanos, os moluscos bivalves podem, por meio da filtração e magnificação, reter e concentrar microorganismos patogênicos em seu trato intestinal. Uma vez ingeridos crus, mal cozidos ou manipulados sob péssimas condições de higiene, esses moluscos podem constituir vetores de doenças transmissíveis pela água tais como febre tifóide, salmonelose, cólera e hepatite viral do tipo A (TIRELLI, 2004). Muitos autores estudaram a relação entre os organismos filtradores marinhos como moluscos bivalves com os microorganismos contaminantes (WOOD, 1977; NISHIO *et al.*, 1981; ZOFFMANN, 1989; REEVE *et al.*, 1989; RAISUDDIN *et al.*, 2003; TIRELLI, 2004). Porém, a contaminação biológica pode ser eliminada dos mexilhões e ostras através de um método conhecido como depuração. Esta técnica, segundo Marques (1997) consiste em manter os mexilhões recém-colhidos em água do mar esterilizada circulante (por processos de cloração, ozonização ou irradiação) até que, através da filtração, o trato intestinal dos animais fique livre de microorganismos e a contaminação orgânica desapareça, ou seja, reduzida a níveis que não causam riscos à saúde. Embora não se tenha no país uma legislação mais específica e precisa com relação aos valores padrões da água do mar para o cultivo de moluscos, desde 1946 nos Estados Unidos, a Federal Security Agency (FSA) classifica, desde 1946, as áreas de cultivo ou extração de bivalves, como sendo:

a) Livres: quando o NMP (número mais provável) de organismos coliformes fecais na água é menor que 70 por 100 ml. Nesse caso, os moluscos extraídos ou cultivados podem ser comercializados sem depuração.

b) Restritas: quando o NMP (número mais provável) de organismos coliformes fecais na água varia de 70 a 700 por 100 ml. Os moluscos extraídos ou cultivados nessas áreas devem necessariamente ser submetidos à depuração antes de serem comercializados.

c) Proibidas: quando o NMP (número mais provável) de organismos coliformes fecais na água é superior a 700 por 100 ml. Nesse caso, não é permitida a extração ou o cultivo de moluscos bivalves.

A contaminação química é provocada pela ingestão, pelos mexilhões e ostras, de óleo, resíduos de defensivos agrícolas e despejos industriais. A contaminação por óleo é causada por derramamento acidental ou proposital de petróleo, ou vazamento nos motores de barcos pesqueiros na água do mar. Em determinadas ocasiões, o mar agitado pode transportar a película formada pelo óleo na água e levar a áreas aonde existem cultivos de moluscos bivalves, fazendo com que os mesmos adquiram o sabor do xenobiótico. A contaminação por outros produtos químicos tais como resíduos de defensivos agrícolas e efluentes industriais contendo metais pesados, torna-se mais grave ainda quando ingeridos pelos organismos aquáticos, pois, esses compostos ao se acumularem nos tecidos (brânquias, hepato-pâncreas, fígado ou glândula digestiva) de peixes e moluscos, não podem ser mais eliminados. Um agravante maior é que os moluscos bivalves, por serem bioacumuladores, filtradores e depuradores, eles podem receber e armazenar a carga de poluentes em seus tecidos, gerando conseqüentemente, efeitos cumulativos na cadeia trófica. Estudos revelam que em áreas com grande concentração de metais-traço, estes podem ser bioacumulados por diversos moluscos como o marisco-do-mangue (*Mytella guyanensi*, TORRES, 2002), a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*, SEIBERT, 2002), o mexilhão nativo (*Perna perna*, SEIBERT, 2002)

assim como o berbigão (*Anomalocardia brasiliiana*, PEREIRA, 2003). Como será justificada na seção a seguir, essas alterações podem ser medidas através de biomarcadores de estresse oxidativo, os quais respondem às condições dos organismos que habitam as regiões poluídas frente ao dano causado pelos RLO.

4.1.4 A geração de RLO, EROs em organismos aeróbios.

O oxigênio é uma molécula que tem grande afinidade por elétrons (eletrofílico) e, por isso, pode tornar-se extremamente reativo e altamente tóxico, porque as reações de oxidação que ele produz podem interagir com moléculas biologicamente importantes. No entanto, tal reatividade também fornece uma fonte muito eficaz de energia química através da cadeia de transporte de elétrons dependente de O₂. Dessa forma os organismos aeróbios são capazes de oxidar completamente moléculas ingeridas como alimento (ALBERTS *et al.*, 1997). Assim sendo, a utilização do oxigênio representa um eficiente mecanismo para obtenção de energia em organismos aeróbios, contudo, durante este processo, são produzidas as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Nas quatro últimas décadas vêm sendo estudados os efeitos destas ERO sobre os organismos aeróbios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As espécies químicas (átomos, íons ou moléculas) que possuem um número ímpar de elétrons em sua camada de valência, e que, por apresentarem extrema instabilidade são altamente reativas, são chamadas de radicais livres de oxigênio (RLO). As EROs incluem outras moléculas não radicais que também são reativas, tais como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. Estima-se que 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbios é reduzido à água sem a concomitante geração de EROs, permitindo que a principal via de transferência de elétrons e de energia para síntese de ATP celular participe apenas parcialmente da citotoxicidade dessas formas deletérias (BOVERIS & CHANCE, 1973; CHANCE *et al.*, 1979; FRIDOVICH, 1979). A redução completa do oxigênio molecular à

água requer 4 elétrons (dada pela Eq D na Fig. 3), e esta redução produz seqüencialmente, do começo ao fim, 3 produtos de redução. Estes produtos são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) (BOVERIS & CHANCE, 1973; CHANCE *et al.*, 1979; DI GIULIO *et al.*, 1995).

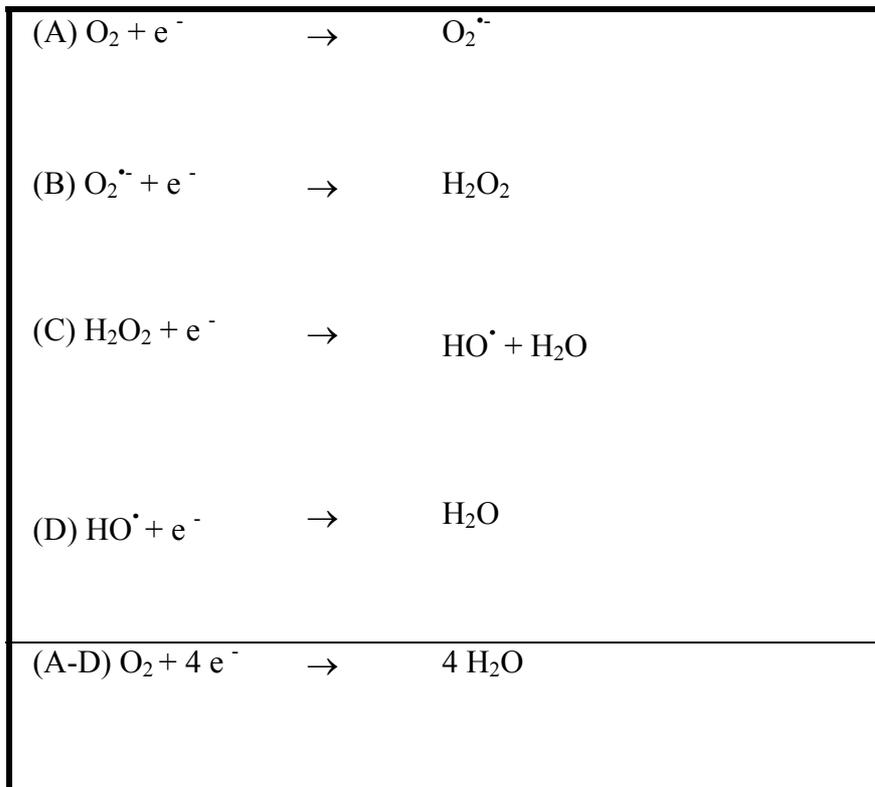


Figura 3: Quadro ilustrativo da redução do oxigênio a água, mostrando as EROs provenientes das reações (DI GIULIO *et al.*, 1995 - quadro modificado), sem o rigor estequiométrico devido.

Na figura acima se pode notar que, quando uma molécula de O_2 ganha um elétron, forma-se um radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (dada pela EqA), uma forma intermediária, que é reativa e irá rapidamente recolher outros três elétrons adicionais em qualquer lugar onde possa encontrá-los (ALBERTS *et al.*, 1997). O principal sítio de formação endógena do ânion superóxido, segundo Boveris & Chance (1973), estaria localizado na cadeia mitocondrial e

conforme já mencionado, correspondendo a aproximadamente 2% do total de oxigênio consumido. A produção do ânion superóxido, portanto, é quase diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido ao nível mitocondrial. O ânion superóxido e o radical hidroxil são os principais radicais livres de oxigênio formados nas reações de iniciação; e o radical hidroxil (HO^\bullet) (dado na Eq C) é muito reativo e o mais deletério aos sistemas biológicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A redução de dois elétrons do oxigênio molecular ou a dismutação do ânion superóxido, determinam a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (dada pela Eq B), que não pode ser considerado um verdadeiro radical livre, por possuir sua órbita externa pareada. porém, por ser uma substância altamente hidrossolúvel e por penetrar rápida e facilmente na célula, age como precursor na formação de outros RLO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Ao reagir com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ via reação de Haber-Weiss, serve como um importante precursor de HO^\bullet (CHANCE *et al.*, 1979; DI GIULIO *et al.*, 1995).

Os efeitos ocasionados pela presença exacerbada das EROs sobre as estruturas biológicas são processos contínuos, estando presentes mesmo em condições de normóxia em organismos aeróbios sadios e dotados de diferentes e específicas defesas antioxidantes (DA) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

4.1.5 Os danos oxidativos

Dentre os processos de oxidação induzidos pelas EROs, a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é um dos processos mais importantes. As membranas celulares são extremamente susceptíveis às reações de peroxidação envolvendo as EROs. As EROs, reagindo com lipídios presentes nas membranas, inicializam um processo de lipoperoxidação

que irá produzir uma cascata de reações, incluindo a formação do malondialdeído, que é muito tóxico (LIPPMAN, 1983).

As conseqüências mais comuns da lipoperoxidação envolvem a perturbação ou destruição da função das membranas das células e organelas essenciais, incluindo o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER & FITZGERALD, 2000).

4.1.6 As defesas antioxidantes

Os sistemas biológicos defendem-se de agressão das EROs e outros derivados do oxigênio convertendo essas espécies em oxigênio por fenômenos de oxidação ou em água por fenômenos de redução (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A definição de antioxidantes segundo Halliwell & Gutteridge (1999), é de qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparados com um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Todo organismo que utiliza o metabolismo oxidativo, seja protista, animais invertebrados ou vertebrados, vegetais, ou fungos, são portadores de um complexo sistema de proteção antioxidante (WILHELM FILHO, 1994, 2001; GONZÁLEZ-FLECHA & BOVERIS, 1994). Estas defesas incluem principalmente a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), agindo como detoxificadores do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, respectivamente. A célula é também protegida por vários antioxidantes não enzimáticos, que agem como varredores de EROs, entre eles, os antioxidantes endógenos principais como, glutathione, ácido úrico, ubiquinóis, alguns hormônios e os exógenos ou nutricionais, como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (principalmente vitamina E), carotenóides e flavonóides entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Alguns poluentes, através de sua capacidade de catalisar reações oxidativas podem levar à geração de EROs (YU,

1994). Há necessidade, então, desses organismos aeróbios se adaptarem à presença de EROs, oriundas não somente do uso do oxigênio atmosférico, como também de substâncias que constituem os poluentes.

4.1.6.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

As enzimas antioxidantes atuam na remoção dos EROs, estando presentes nos tecidos, órgãos e estruturas de todos os organismos aeróbios (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). As concentrações celulares relativamente reduzidas de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são mantidas graças à ação combinada das três enzimas SOD, CAT e GPx (CHANCE *et al.*, 1979).

Superóxido Dismutase (SOD)

Esta é uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização dos RLO de todos os organismos eucarióticos. Tem a função de catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999):



Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima amplamente difundida entre os seres aeróbios, localizada principalmente em organelas membranosas chamadas peroxissomos. Nos animais está presente na maioria dos tecidos, concentrando-se principalmente no fígado e eritrócitos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Está composta por quatro subunidades protéicas, cada qual ligada a uma molécula de NADPH, que ajuda na estabilização da estrutura

enzimática. Age na decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (FABER; KYLE; COLEMANN, 1990), como indica abaixo:

CAT



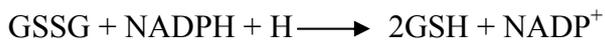
Glutationa Peroxidase (GPx)

Esta é a mais importante das peroxidases e atua na redução do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 , utilizando como doador de elétrons o tripeptídeo tiólico glutaciona reduzida (GSH). Também age na redução de outros peróxidos orgânicos, como, por exemplo, os lipoperóxidos resultantes da peroxidação lipídica, aos seus álcoois equivalentes (DI GIULIO *et al.*, 1995). A GPx dismutando hidroperóxidos (H_2O_2 e $t\text{-BuOOH}$) acaba gerando uma ponte de dissulfeto entre duas GSH (GS-GS), que por sua vez, volta ao estado reduzido (2GSH), pela ação da glutaciona redutase (GR). A GR age mediante a oxidação de NADPH, como pode ser vista abaixo:

GPx

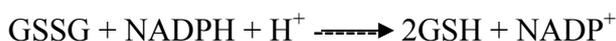


GR



Glutationa Redutase (GR)

A glutaciona redutase realiza a manutenção celular normal de GSSG/GSH, catalisando a reação de regeneração da glutaciona reduzida, utilizando a glutaciona oxidada através da oxidação do NADPH (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999):



4.1.6.2 Defesas antioxidantes não-enzimáticas

Além dos antioxidantes enzimáticos, existem substâncias não enzimáticas que possuem caráter antioxidante de grande importância biológica.

Glutationa Reduzida (GSH) e total (GT)

A GSH, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cistenil-glicina), é o principal tiol celular não protéico presente em altas concentrações intracelulares em todos organismos aeróbios (WILHELM FILHO *et al.*, 2000) associado a uma variedade de funções celulares, tais como integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e DNA, “scavenger” de EROs, defesas contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente perigosos (PEÑA-LLOPIS; FERRANDO, PEÑA, 2002). Este tiol é um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos e também é considerado como uma primeira linha de defesa, devido à sua alta concentração e habilidade de ser um “scavenger” generalista, atuando contra todos as EROs, e ser pronta e continuamente recuperado pelo ciclo da GSH ou por síntese *de novo*. A GSH atua doando hidrogênio nas reações promovidas pela ação da GPx, em que há a redução de hidroperóxidos. Na biotransformação de xenobióticos, a GSH é transferida pela GST para grupamentos bioativos, resultantes da ação de monooxigenases (MONKS *et al.*, 1990; KOOB; DEKANT, 1991). Após estas reações, a GSH constitui-se na forma oxidada GSSG, com exceção da conjugação com a GST. Segundo Kosower & Kosower (1978), altos níveis desta forma oxidada consistem em um excelente marcador de estresse oxidativo, já que quanto maior for a utilização da GSH nas reações enzimáticas da GPx, bem como na biotransformação de xenobióticos, maiores serão os níveis de GSSG. A relação da concentração entre GSH/GSSG dever ser alta para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1987).

4.1.7 O estresse oxidativo

Quando há desvios no estado de equilíbrio dinâmico intracelular entre as proteções antioxidantes e a geração das EROs, ocorre o chamado estresse oxidativo (SIES, 1985). Os níveis de enzimas antioxidantes podem aumentar na célula em uma situação de início do estresse oxidativo, ou, em situações mais graves, concomitantemente a um aumento da concentração das EROs, há uma depleção paralela das defesas antioxidantes (SIES, 1985; AMSTAD; CERUTTI, 1990). O estresse oxidativo pode estar relacionado com vários processos, tais como: mutagênese (oxidação de bases púricas e pirimídicas), carcinogênese, lipoperoxidação, oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (SIES, 1985).

4.1.7.1 O efeito dos poluentes e o estresse oxidativo em organismos aquáticos

A partir da década de 80 surgiram vários estudos envolvendo a participação de agentes poluentes relacionados com a geração de EROs e suas conseqüências patológicas, muitos deles visando o diagnóstico e o biomonitoramento ambiental, destacando-se os trabalhos realizados em peixes dulcícolas e moluscos bivalves (MATKOVICS *et al.*, 1977; RADI; MATKOVICS, 1988; MALINS *et al.*, 1988; WASHBURN & DIGIULIO, 1988; VÍG & NEMCSOK, 1989; KLAASSEN, C. & ROZMEN, 1991; ROCHE & BOGÉ, 1993; BAINY *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 2001; WILHELM FILHO *et al.*, 2001a; WILHELM FILHO *et al.*, 2002).

Muitos dos poluentes que são despejados nos mananciais hídricos podem potencialmente induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). A constante exposição dos seres humanos e animais a um número crescente de xenobióticos constituem atualmente umas das principais causas do estabelecimento de vários processos mutagênicos e carcinogênicos (DI GIULIO *et al.*, 1995). Os xenobióticos são uma

classe de poluentes usualmente encontrados em ambientes aquáticos e podem ficar altamente concentrados na coluna d'água. São contaminantes orgânicos, lipofílicos e, por isso, são rapidamente incorporados pelos tecidos animais, onde podem ser biotransformados (GOSLING, 1992). Uma exposição contínua às moléculas lipofílicas pode resultar em sua acumulação no organismo aquático, exceto se estes possuírem mecanismos efetivos de eliminação das mesmas, já que, geralmente, estes compostos lipofílicos são facilmente absorvidos pelas vias de entrada de um organismo como o tegumento e brânquias (VIARENGO; CANESI, 1991). Dependendo do grau de solubilidade em água, os compostos serão eliminados com maior ou menor facilidade. Sendo assim, com o intuito de facilitar a excreção destes compostos, os organismos desenvolveram mecanismos bioquímicos capazes de transformar os xenobióticos lipofílicos em mais hidrofílicos (COMPORTI, 1989).

O tecido hepático é o principal responsável pelo processo de biotransformação de compostos orgânicos, sendo realizado em sua maioria por uma superfamília de proteínas constituídas pelo citocromo P450 (CYP) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A biotransformação pode ser dividida em duas partes, nas reações de Fase I, o CYP 450 participa na introdução de um grupo polar na molécula, aumentando a hidrossolubilidade do xenobiótico (bioativação), transformando-o numa forma adequada para as reações de conjugação da Fase II. Nas reações de fase II ocorre a conjugação com um substrato endógeno, produzindo compostos conjugados hidrossolúveis, que são mais facilmente excretados (DI GIULIO *et al.*, 1995).

A Glutathione S-transferase (GST) é uma das enzimas mais importantes da fase II de biotransformação, executando a função de conjugação e excreção (BOON *et al.*, 1992). Ela é capaz de formar ligações covalentes com epóxidos ativos derivados das reações da fase I, impedindo que os mesmos se liguem ao DNA ou a outras moléculas (DI GIULIO *et al.*, 1995).

4.1.8 A importância dos bioindicadores e dos biomarcadores em biomonitoramento e diagnóstico ambiental

Em uma definição mais específica para ambientes aquáticos, os bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (WALKER *et al.*, 1996). Outra definição mais ampla é dada por Salanski (1986), que indica que bioindicadores são organismos ou comunidades, cujas funções vitais se correlacionam tão estreitamente com determinados fatores ambientais, que podem fornecer informações sobre as condições de um ecossistema. Os processos bioquímicos básicos são essencialmente os mesmos em organismos eucarióticos e, por isso, parece ser razoável utilizar organismos como bioindicadores, que reagem mais rapidamente do que o homem, frente a contaminantes ambientais (SALANSKI, 1986; JEFFREY; MADDEN, 1991).

Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição. Além disso, o uso dos bioindicadores é mais eficiente do que as medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos (p.ex., temperatura, pH, oxigênio dissolvido, teores totais e dissolvidos de nutrientes, etc.), que são normalmente medidos no campo e utilizados para avaliar a qualidade das águas. A Agência de Controle Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency – USEPA) e a Diretriz da União Européia (94C 222/06, 10/08/1994), recomendam a utilização de bioindicadores como complemento às informações sobre a qualidade das águas, pois dentre os bioindicadores há grupos de espécies diretamente relacionados a um determinado agente poluidor ou a um fator natural potencialmente poluente. Além disso, são importantes ferramentas para a avaliação da integridade ecológica condição de “saúde” de um rio, avaliada através da comparação da qualidade da água e diversidade de organismos entre áreas impactadas e áreas de referência, ainda naturais e a montante. Os bioindicadores mais utilizados são aqueles capazes de

diferenciar entre fenômenos naturais (p.ex. mudanças de estação e ciclos de chuva-seca) e estresses de origem antrópica, relacionados a fontes de poluição pontuais ou difusas. Para utilizar bioindicadores de qualidade de água é necessário saber quais são as comunidades biológicas que devem ser monitoradas em um ecossistema aquático, como monitorá-las, analisar estatisticamente e interpretar os dados, e também qual será o custo do monitoramento (financeiro, recurso técnico e infra-estrutura).

Os programas de monitoramento de contaminação aquática, de um modo geral, têm se preocupado com a quantificação dos principais tipos de contaminantes presentes na água, no sedimento e em alguns organismos de importância econômica. Embora esse ponto de vista seja importante, essas análises químicas não fornecem informações dos efeitos tóxicos provocados por estas substâncias (SCHLENK, 1999; BENASSI, 2004).

Atualmente os programas de monitoramento de poluição ambiental incorporam às análises físico-químicas, testes biológicos que visem diretamente resposta ou efeito de um poluente sobre os organismos. Estes testes incluem a avaliação da toxicidade aguda da água utilizando organismos indicadores, a determinação da concentração de biomoléculas, além da atividade de enzimas e proteínas transportadoras.

Segundo Walker *et al.* (1996), os biomarcadores são definidos como alterações biológicas ao nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental, que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente, apresentando um grande potencial para uma real compreensão dos efeitos dos poluentes nos componentes biológicos. Por serem freqüentemente os primeiros a sofrer alteração, devido à grande suscetibilidade, boa sensibilidade e relativa especificidade, os biomarcadores são considerados recursos úteis em programas de monitoramento, detectando precocemente alterações ambientais (STEGEMAN *et al.*, 1992; WILHEM FILHO *et al.*, 2001a).

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição ou de efeito. Um biomarcador de exposição será qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente. Um exemplo desse tipo de marcador é a atividade de enzimas antioxidantes. Biomarcadores de efeito serão aqueles que evidenciem, como o próprio nome sugere, algum efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente, como por exemplo, a peroxidação de lipídeos ou dano ao DNA. Enzimas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos são bons biomarcadores, pois fornecem informações importantes da capacidade de defesa dos organismos, bem como da capacidade de excreção dos compostos tóxicos (LIVINGSTONE *et al.*, 1990; VIDAL *et al.*, 2002).

4.1.9 Os moluscos como bioindicadores de estresse oxidativo

Moluscos bivalves são considerados bons bioindicadores de poluição aquática associada à produção de EROs, e apresentam, nessas condições, mudanças em suas DAs (LIVINGSTONE *et al.*, 1990; RODRÍGUEZ-ARIZA *et al.*, 1993; VIDAL *et al.*, 2002; PEÑA-LLOPIS *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2002).

Dentre os moluscos bivalves, os mexilhões apresentam vantagens na utilização em programas de biomonitoramento porque são praticamente cosmopolitas, sendo encontrados em grande abundância, são sedentários, refletindo mais fielmente o local de amostragem que animais que se locomovem, são relativamente tolerantes (não sendo insensíveis) a diferentes fatores ambientais como salinidade, disponibilidade de oxigênio, pH, entre outros (DAME, 1996). São termoconformistas e apresentam capacidade de bioacumulação, ou seja, por serem filtradores, possibilitam a acumulação de contaminantes em seus tecidos em concentrações significativamente maiores que as observadas no ambiente e aquático, sendo a glândula digestiva o principal local de metabolização e acumulação desses xenobióticos (PHILLIPS; RAINBOW, 1989; TORRES *et al.*, 2001; WILHELM FILHO *et al.*, 2001a). Além disso, por

serem animais resistentes, têm facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais, apresentando, portanto, grande habilidade em sobreviver em ambientes poluídos por agentes tóxicos (VIARENGO; CANESI, 1991; DAME, 1996; SHEEHAN; POWER, 1999), além de apresentarem forte correlação entre a concentração de poluentes no seu interior e sua concentração no ambiente. Moluscos podem acumular xenobióticos em concentrações diretamente proporcionais ao seu desenvolvimento e às encontradas no sedimento adjacente, sendo a glândula digestiva o local de metabolização e principal acumulação desses xenobióticos (PHILLIPS & RAINBOW, 1989; TORRES *et al.*, 2001; WILHELM FILHO *et al.*, 2001a). Esta, adicionada a outras particularidades, como ampla distribuição geográfica, hábito sésil, resistência fisiológica, sensibilidade face às diferentes oscilações de parâmetros ambientais, tornam estes organismos excelentes bioindicadores (GOLBERG, 1975; GOSLING, 1992; WILHELM FILHO *et al.* 2001b).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Áreas de estudo

Os locais de estudo e coleta das amostras dos bioindicadores situam-se próximas a três regiões estuarinas da Ilha de Santa Catarina. Os sítios referência (PC) e sítio PS estão localizados na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, enquanto que o sítio PN encontra-se na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. A Baía Norte e Sul são descritas como ecossistemas extremamente dinâmicos, totalmente influenciáveis pelas correntes de maré, correntes de deriva, fluxo de entrada de águas doces. A disposição longitudinal da Ilha de Santa Catarina, quase em paralelo ao continente, estabelece no seu centro um aprofundamento, que de certa maneira atua como canal das correntes que nela ingressam (CERUTTI, 1997).

a) Caracterização da Baía Norte conforme atividade antrópica.

As principais fontes de poluição em que a Baía Norte recebe basicamente são provenientes de efluentes domésticos, uma vez que os planos diretores do município de Florianópolis, como dispõe as Leis Municipais nº 1440, de 1976, nº 1851, de 1982 e nº 2193, de 1985, em artigos e incisos específicos, proíbe a instalação de indústrias de grande porte, ou indústrias nocivas ou perigosas no município, permitindo apenas aquelas de pequeno e médio-porte e que, reconhecidamente, não causem danos ambientais (CERUTTI, 1997). Essas exigências foram estabelecidas para preservar as características de cidade com vocação excepcionalmente turística pela presença de grandes quantidades de praias, lagoas, lagoas e áreas de preservação. Logo, os efluentes lançados na Baía Norte provêm de residências, edifícios comerciais, bares e restaurantes, instituições públicas ou privadas, e são compostos basicamente da água de banho, urina, fezes, restos de alimentos, papel, sabão, detergentes e águas de lavagem e cisternas. O sítio PN, é caracterizado por uma estação de cultivo de ostras e mexilhões localizado no distrito de Ponta do Sambaquí (27°28'S, 48°33'W), ao norte da Ilha de Santa Catarina, na Enseada do Ratonos (conforme descrito na Fig.4). Os dados

microbiológicos da água do mar avaliados pela Fundação de Amparo à Tecnologia e Meio Ambiente (FATMA) foram considerados àqueles da região da Ponta do Sambaqui, considerando que a instituição citada realiza anualmente o monitoramento da quantidade de coliformes fecais na água do mar nas regiões do Sambaquí, e estão registrados desde 1990. O sítio (PN) foi escolhido como área de estudo por se encontrar a menos de 1 Km da foz do Rio Ratonés, em que a mesma banha uma área de preservação assegurada pelo Instituto de Meio Ambiente (IBAMA), constituída pela Estação Ecológica de Carijós. Ao mesmo tempo o rio recebe despejo de efluentes domésticos da população que habita a região de Ratonés e de Sambaquí, desaguando na Baía Norte, aonde localiza-se o sítio PN. Conforme as análises microbiológicas realizadas entre os períodos de 2003 a 2004, constatou-se que o sítio PN apresenta-se com uma menor atividade antrópica em relação ao sítio PS, pois foram encontrados baixos níveis de coliformes fecais (CF) na água do mar na região da Ponta do Sambaquí (vide Anexo B), porém os valores foram acima do sítio referência.

a) Caracterização da Baía Sul conforme atividade antrópica.

Já a Baía Sul recebe efluentes provenientes das regiões com maior atividade urbana e desenvolvimento industrial de maior porte, no caso dos municípios de São José e Palhoça, e de pequeno porte em Biguaçu. As atividades de serviços mais presentes na região de São José e Biguaçu são no ramo dos setores primário e secundário, e constituem indústria metal-mecânica, química, processamento de ração para aves, e postos de gasolina. Na região de Palhoça, as atividades de médio porte constituem principalmente o setor primário de agroalimentos e hortifrutigranjeiro. Além disso, os efluentes industriais e domésticos são jogados na microbacia do rio Cubatão do Sul, localizado na região da Grande Florianópolis, desaguando na Baía Sul continental que, influenciada pelo regime de correntes marítimas, acaba levando os poluentes para Baía Sul insular, onde está localizado o distrito do Ribeirão da Ilha. O sítio PS é uma estação de malacocultura e encontra-se a menos de 1 Km da foz do

Rio Ribeirão, ao sul da Ilha de Santa Catarina, na localidade do Ribeirão da Ilha (27°42'S, 48°33'W) (vide Fig.4). Além disso, o rio Ribeirão da Ilha sofre influência da bacia do Rio Tavares, que, de acordo com estudos desenvolvidos por Araújo (1993) uma crescente urbanização alterou o funcionamento dos manguezais da Tapera e do Rio Tavares, recebendo aterros, despejos domésticos e resíduos. Nas imediações do sítio PS soma-se a presença de vários tipos de fontes poluidoras tais como resíduos alimentares e despejos de restaurantes à beira-mar, bares, óleo do motor de barcos, um posto de gasolina, residências que não apresentam sequer sistema de rede coletora de efluentes ou uma estação de tratamento de esgoto. Nota-se também que a atividade antrópica na região do sítio PS é bastante acentuada, sendo caracterizada uma maior ocupação urbana e exploração imobiliária, de acordo com dados do IBGE (2002), o que confirmam os elevados índices de coliformes fecais (CF) encontrados em análises microbiológicas realizadas entre os períodos de 2003 a 2004 (Anexo A).

O sítio referência (PC) está localizado na Ponta da Tapera, no extremo sul da Baía Sul (Fig.4), na comunidade da Caieira da Barra do Sul (27°48'S, 48°33'W), e apresentou menor índice de coliformes fecais em relação aos outros dois (PS e PN) de acordo com as análises microbiológicas da água do mar analisadas pelo Laboratório de Saneamento (CEFET), no período de 14 de abril a 31 de julho de 2003 (Anexo C). A outra característica que fez com que este sítio fosse classificado como referência é sua baixa influência antrópica devido a menor ocupação urbana e presença de residências ou atividades exploratórias, nenhuma presença de indústria ou atividade poluente nos arredores. Além disso, a Caieira da Barra do Sul apresenta um forte regime de correntes marítimas, comunicando-se com o Oceano Atlântico e uma maior circulação de água, fazendo com que ocorra uma maior renovação da água do mar e conseqüentemente um aumento na aeração no meio (PRUDÊNCIO, 2003).

O mapa (Fig.4) a seguir indica os sítios de coleta dos animais, na Ilha de Santa Catarina:

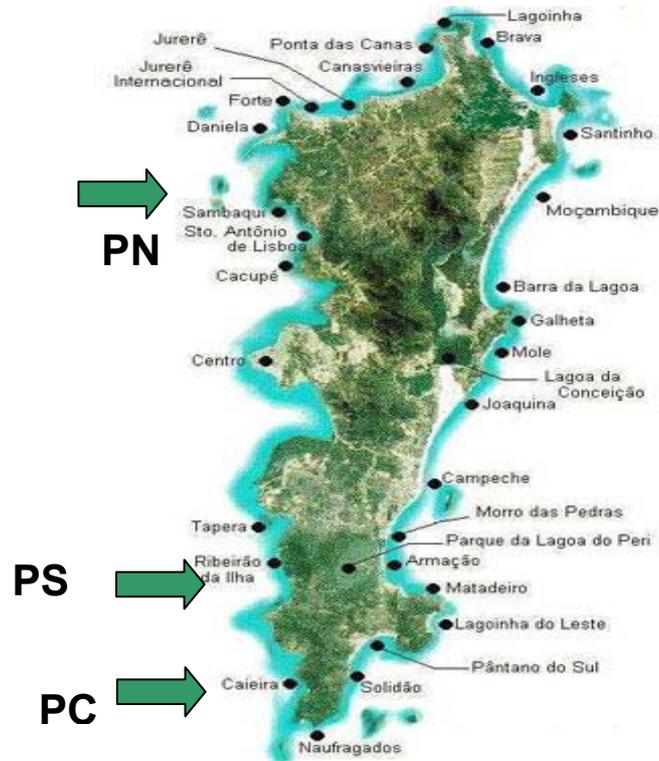


Figura 4: Mapa da Ilha de Santa Catarina mostrando os sítios de coleta de amostras: PN (Sítio Norte) – Ponta do Sambaquí PS (sítio sul) – Ribeirão da Ilha e PC (Sítio referência) – Caieira da Barra do Sul.

5.2 Material Biológico

As espécies de moluscos bivalves estudadas foram a ostra *Crassostrea gigas* e o mexilhão *Perna perna*, pois ambas apresentam elevada resistência e sensibilidade face às diferentes oscilações de parâmetros ambientais, e a segunda mostrou excelentes respostas de biomarcadores de estresse oxidativo (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Os animais adultos, independente do sexo, foram coletados em 3 regiões de cultivo, sendo que as coletas das ostras foram realizadas durante as quatro estações e as do mexilhão em 2 estações do ano. As coletas das ostras foram realizadas em outubro de 2003 (primavera), janeiro de 2004 (verão), maio de

2004 (outono), e julho de 2004 (inverno). Foram coletados 10 indivíduos em cada sítio, perfazendo um total de 40 animais por sítio e 120 considerando a variação sazonal. Já para o mexilhão as coletas foram realizadas durante duas estações, um período quente (novembro de 2003) e um período frio (julho de 2004). Em cada sítio igualmente foram coletados 10 animais adultos, perfazendo um total de 30 indivíduos por sítio e 60 no total das análises. Os períodos referentes às quatro estações do ano foram utilizados no sentido de verificar a influência sazonal nos mesmos (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b).

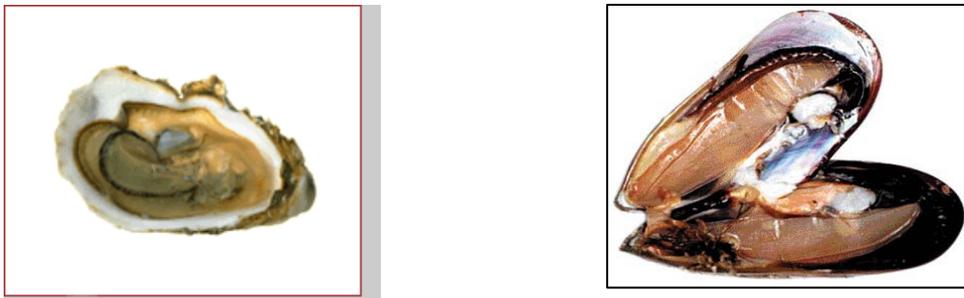


Figura 5: *Crassostrea gigas* (ostra japonesa) e *Perna perna* (mexilhão).

5.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas da água das áreas estudadas foram realizadas segundo normas estabelecidas por Standard Methods for The Examination of Water na Waste Water, através dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, temperatura, condutividade, salinidade, amônia, nitrito, fósforo e sulfeto, (descritas nas tabelas 1 e 2), respectivamente. O pH das amostras foi medido através de equipamento dotado de sonda polarográfica com calibração externa em padrões de pH 4,0 e 7,0, utilizando pHmetro marca Orion, modelo 210A, com medições em campo e em tempo real.

A análise de STD (Sólidos Totais Dissolvidos), Salinidade e Condutividade foi realizada, em equipamento Condutímetro com funções acopladas para salinidade e STD, marca Orion,

modelo 115, dotado de sonda polarográfica desenvolvido para medições em campo; temperatura da água foi avaliada por meio de equipamento termopar acoplado em medidor de oxigênio, marca Orion modelo 835; turbidez das amostras analisado através de equipamento Turbidímetro, dotado de sistema nefelométrico para medições de turbidez, marca Hach, modelo DR4000U; e, finalmente, o parâmetro cor, analisado por meio de comparador de cor Pt/Co marca Elige, modelo Nessler Quanti. As amostras de água dos três sítios foram coletadas em dois períodos do ano, sendo, que o primeiro foi entre os dias 21 e 27 de julho de 2004 e o segundo período, entre os dias 07 a 20 de janeiro de 2005, e analisadas pelo Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica do Departamento de Bioquímica (CCB/UFSC).

5.4 Preparação das amostras

As ostras e os mexilhões foram transportados ao laboratório e dissecados logo após a coleta. Após a biometria, suas glândulas digestoras foram dissecadas, pesadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-180°). Para a preparação de extratos ácidos, uma porção de aproximadamente 120 mg foi homogeneizada e precipitada em solução de ácido tricloroacético TCA a 12% (diluição 1:4). Para preparação de homogenatos, uma outra porção de aproximadamente 100 mg foi homogeneizada com solução-tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio (diluição 1:19), sendo constantemente mantida em gelo. Foram empregados cerca de 20s em homogeneizador tipo “tissue tearor” seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 min. Através do uso da espectrofotometria, o sobrenadante do homogenato foi utilizado para as análises das diferentes atividades enzimáticas e de peroxidação lipídica (TBARS), bem como o extrato ácido utilizado para as análises da glutathiona reduzida e total (GSH e GT), respectivamente.

5.5 Análise da amostras

A leitura da atividade dos marcadores do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes foi feita seguindo as seguintes metodologias que serão descritas a seguir.

5.5.1 Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS)

O homogenato foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitado vigorosamente durante cerca de 5s. Em seguida, incubadas em tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100°C. Após, o material foi resfriado durante 15 min a 5°C e centrifugado (5min a 5000g), e a absorbância do cromóforo de cor rósea foi medida em 535nm, sendo os valores expressos em nmol g^{-1} . A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, com monofeixe, através da detecção em A_{535} dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984).

5.5.2 Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas

5.5.2.1 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Para avaliar a concentração tecidual de tióis não protéicos em precipitado ácido (ácido tricloroacético 12%, 1:9, p:v), foi empregado o método de Beutler (1963). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL 0.2M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permitia, após cerca de 3 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, feita em duplicatas foi mensurável em A_{412} .

5.5.2.2 GLUTATIONA TOTAL (GT)

Para esta análise utilizou-se o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH (1,5 mM) usada na redução da glutatona oxidada (0,0327 g/50ml) catalisada pela glutatona redutase (0,3 U/ml), permitiu avaliar indiretamente a concentração da glutatona total presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio, bem como do ensaio citado acima, foram feitas em duplicatas e expressas em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

5.5.3 Defesas antioxidantes enzimáticas:

5.5.3.1 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

O método utilizado para a análise desta atividade foi o de Carlberg e Mannervich (1985), onde se verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH, devido à redução da glutatona oxidada pela glutatona redutase (5 U/ml) presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; glutatona oxidada (30,6 mg/50ml de meio de reação) e DPTA (ácido dietilenotriaminopentacético) 5mM. O ensaio das amostras foi realizado em duplicatas e os valores e desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

5.5.3.2 GLUTATIONA PEROXIDASE (GP_x)

Para este ensaio, segundo Flohé e Gunzler (1984), utilizou-se 10 μl de amostra e 10 μl de ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH), colocados em 1 ml de um meio de reação composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 0,005 M pH 7,0, 15 ml de água destilada, 0,024 g de glutatona reduzida, e 5 U de glutatona redutase colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorvância (340 nm) do NADPH por 1 min, promovendo a redução da GSSG, catalisada pela GR. A velocidade de oxidação de NADPH é

proporcional à velocidade de produção de GSH a partir de GSSG, em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os ensaios para a atividade da GPx foram realizados em duplicatas, e os valores foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

5.5.3.3 CATALASE (CAT)

Para análise da atividade desta enzima foi utilizado o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 30 s, em monofeixe, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

5.5.3.4 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da glutathione S-transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, em duplo feixe, de acordo com Habig et al. (1976). A amostra adicionada em um meio contendo 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μl de glutathione redutase, 0,1 M (GSH) e 970 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

5.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados da comparação entre os diferentes sítios, tanto para a ostra como para o mexilhão, foi realizada pelo Programa Estatístico Graph-Pad Prism, utilizando análise de variância (ANOVA). Para as análises de ANOVA com os grupos sazonais de *Perna perna*, foi utilizado o pós- teste de Tukey, enquanto que para *Crassostrea gigas*, foi empregado o pós-teste de Bonferroni, considerando as quatro estações, e que cada grupo foi representado por um período do ano (primavera, verão, outono e inverno). Para todos os testes utilizou-se um nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Análises físico-químicas

A análise da água dos diversos sítios de coleta presentes (PC = Caieira da Barra do Sul; PS=Ribeirão da Ilha e PN=Ponta do Sambaqui) das amostras de *Crassostrea gigas* e *Perna perna*, constituiu-se da determinação de seus principais parâmetros físicos (pH, temperatura, condutividade, salinidade) e químicos (amônia, nitrito, fósforo e sulfeto), e estão descritas nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1: Propriedades físicas da água dos sítios amostrados em uma única coleta no inverno (27 a 28 de julho) de 2004 nos sítios de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.

PARÂMETRO	PC	PS	PN
FÍSICO	(referência)	(sul)	(norte)
Condutividade (mS cm ⁻¹)	35,0	49,0	31,2
pH	6,8	6,7	6,1
Temperatura (°C)	18,0	17,0	18,0
Salinidade (%)	35,0	36,0	36,0

Tabela 2: Propriedades físicas da água dos sítios amostrados em uma única coleta no verão (07 a 20 de janeiro) de 2005 nos sítios de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.

PARÂMETRO	PC	PS	PN
FÍSICO	(referência)	(sul)	(norte)
Condutividade (mS cm ⁻¹)	32,0	48,0	29,2
pH	6,6	6,7	6,1
Temperatura (°C)	27,0	26,3	29,3
Salinidade (%)	35,0	36,0	34,0

Tabela 3: Propriedades químicas da água dos sítios amostrados em uma única coleta no inverno (27 a 28 de julho) nas regiões de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.

PARÂMETRO QUÍMICO	PC (referência)	PS (sul)	PN (norte)	(*)
Sulfeto (mg L^{-1})	0,12	0,18	0,09	0,002
Amônia (mg L^{-1})	0,10	0,13	0,12	0,40
Nitrito (mg L^{-1})	0,002	0,02	0,001	1,0
Fósforo (mg L^{-1})	0,26	ND	ND	0,26

(*) indica valores máximos tolerados segundo CONAMA (1986) para a água do mar, classe 5 (Águas salinas).

Tabela 4: Propriedades químicas da água dos sítios amostrados em uma única coleta no verão (07 a 20 de janeiro) de 2005 nas regiões de cultivo de ostras e mexilhões da Ilha de Santa Catarina.

PARÂMETRO QUÍMICO	PC (referência)	PS (sul)	PN (norte)	(*)
Sulfeto (mg L ⁻¹)	0,12	0,18	0,09	0,002
Amônia (mg L ⁻¹)	0,11	0,14	0,09	0,40
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,009	0,01	0,04	1,0
Fósforo (mg L ⁻¹)	0,26	0,56	0,26	0,26

(*) indica valores máximos tolerados segundo CONAMA (1986) para a água do mar, classe 5 (Águas salinas).

De acordo com os critérios do modelo de classificação de Strahler, o clima da Ilha de Santa Catarina é do subtipo subtropical úmido, inserido na região de clima temperado de categoria subquente, com temperatura média oscilando entre 18 e 15°C no inverno e entre 26 e 24° C no verão, com temperatura média anual de 20,4°C (NIMER, 1989). O valor médio da temperatura para todas águas amostradas durante o período de julho de 2004,(Tabela 1) encontrou-se na faixa de 17,6°C, indicando que não houve grande alteração neste parâmetro nos três sítios amostrados. Observou-se que para todos outros parâmetros físicos acima (Tabela 1) analisados para os três sítios amostrados, também estiveram de acordo com os permitidos pelos padrões estabelecidos pelo CONAMA (1986) e APHA (1992) , para fins comparativos. Houve uma exceção apenas, uma vez que o dado obtido para a condutividade

da água do mar no sítio localizado no sul da ilha ($PS = 49,0 \text{ mS cm}^{-1}$) apresentou-se bem mais elevado em comparação ao sítio referência ($PC = 35,0 \text{ mScm}^{-1}$).

Com relação aos parâmetros químicos, observa-se pela tabela 3, que os índices de sulfetos foram muito maiores para as amostras de água dos três sítios ($PC = 0,12 \text{ mg L}^{-1}$, $PS=0,18 \text{ mg L}^{-1}$ e $PN = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$), valores cerca de duas ordens de grandeza maiores quando comparados com o teor máximo dado pela tabela 3. Todas as águas amostradas apresentaram em média, valor de amônia total ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$), cerca de quatro vezes menores que o máximo ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) estabelecido pelo CONAMA (Tab. 3), (1986). No entanto, não houve diferença significativa entre os sítios amostrados. Os resultados encontrados para os íons nitrito apresentaram valores, em média cerca de treze vezes menores que o máximo tolerado ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ determinado pela APHA (1992), sendo que a água amostrada no sítio PS apresentou valor de NO_2^- cerca de três vezes maior que o valor médio em todos os sítios. O teor de fósforo foi detectado apenas no sítio referência no inverno de 2004, e ao contrário, foram encontrados nos sítios amostrados no verão de 2005 elevados índices de fósforo, principalmente no sítio sul ($PS = 0,56 \text{ mg.L}^{-1}$), representando um valor acima em relação aos padrões do CONAMA (Tab. 3), (1986).

6.2 Análises Microbiológicas

Para melhor caracterizar os sítios com maior ação antrópica fez-se uso dos parâmetros microbiológicos fornecidos pela FATMA (2004) e CEFET (TIRELLI, 2004), (Anexos A, B e C).

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. O uso da bactéria coliforme fecal para indicar poluição sanitária mostra-se mais significativo que o uso da bactéria coliforme total, porque as bactérias fecais estão restritas ao trato intestinal de animais endotermos. A determinação da concentração dos

coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de microorganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifóide, febre paratifóide, desintéria bacilar e cólera (JUNKES, 2003; TIRELLI, 2004).

A qualificação dos sítios estudados no presente trabalho das amostras de água seguiu os padrões microbiológicos estabelecidos pela Legislação Federal Brasileira, e estiveram dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA (1986). Segundo esta resolução (nº 20/1986), o uso de criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana e que serão ingeridas cruas, não deverá ser excedida uma concentração média de 14 coliformes fecais por 100 mililitros de água do mar, em pelo menos 70% das amostras, além da isenção total de matérias graxas e contaminantes químicos. No caso de não haver, na região, meios disponíveis para o exame, número de coliformes totais por 100 mililitros não deverá exceder em 80% ou mais de pelo menos 5 amostras mensais colhidas em qualquer mês, do permitido pela Resolução 274/2000 do CONAMA (800 NMP/100mL para *Escherichia coli*).

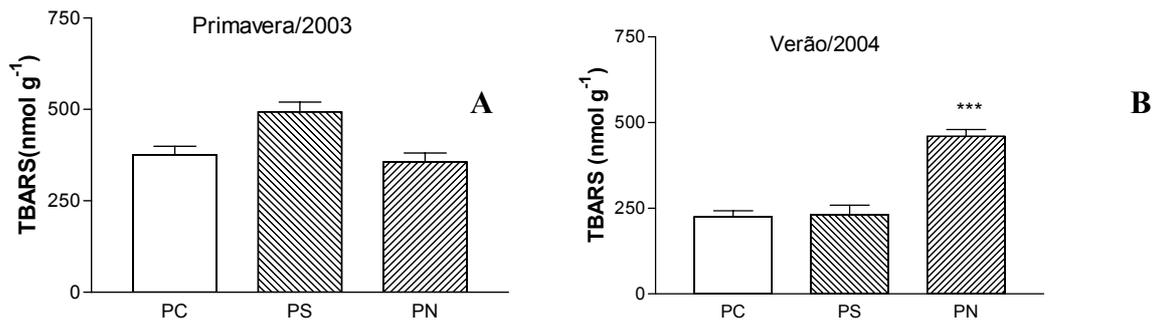
Verificando os resultados para os parâmetros microbiológicos para os três sítios, foi observado que o sítio localizado no sul da Ilha (PS= Ribeirão da Ilha) apresentou os maiores índices de coliformes fecais (CF) e totais (CT), indicando uma maior ação antrópica. Esses dados (Anexo A-C) confirmam outros estudos realizados em sítios de ostreicultura (SILVA, 2000; TIRELLI, 2004). Naqueles contaminantes, em cinco sítios de ostreicultura localizados na Baía Sul, constatou-se que o sítio PS apresentou índices de coliformes mais elevados (TIRELLI, 2004), em relação ao mesmo sítio referência considerado no presente estudo.

6.3 Análise comparativa dos biomarcadores de estresse oxidativo em *Crassostrea gigas* nos distintos sítios.

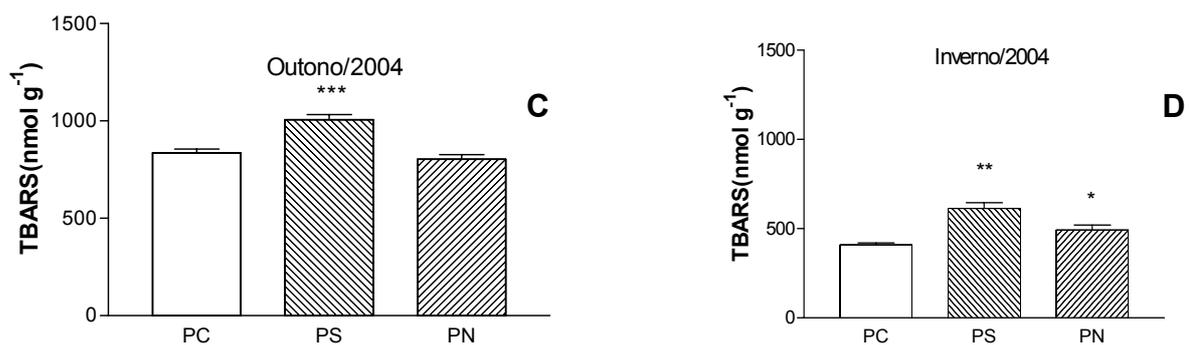
6.3.1 Análise da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)

As figuras Fig. 6.1-A, B, C e D, exibem os resultados para os níveis de TBARS na glândula digestiva da ostra dos dois sítios experimentais em relação ao sítio referência, de acordo com a ação antrópica na primavera de 2003, verão, outono e inverno de 2004. Em relação ao sítio referência ($PC = 376,00 \pm 22,81 \text{ nmol g}^{-1}$) constataram-se níveis mais elevados ($p < 0,05$) de TBARS no sítio PS ($493,73 \pm 26,88 \text{ nmol g}^{-1}$ de TBARS) (Fig. 6.1-A). Por outro lado, comparativamente aos animais coletados no mesmo período do ano no sítio localizado no norte da Ilha de Santa Catarina ($PN = 356,51 \pm 24,12 \text{ nmol g}^{-1}$ de TBARS) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao sítio referência. Para o período do verão, (Fig. 6.1-B) níveis de TBARS mais elevados (cerca de 2 vezes) foram encontrados em ambos os sítios ($PS = 388,30 \pm 7,15 \text{ nmol g}^{-1}$ e $PN = 459,95 \pm 19,95 \text{ nmol g}^{-1}$) em relação ao sítio referência ($PC = 225,48 \pm 17,02 \text{ nmol g}^{-1}$ de TBARS). Para o período de outono, obteve-se perfil semelhante ao encontrado em animais coletados no verão, sendo o valor médio dos níveis de TBARS significativamente superior apenas no sítio sul ($PS = 1006,52 \pm 27,00 \text{ nmol g}^{-1}$) em relação à referência ($PC = 803,41 \pm 23,40 \text{ nmol g}^{-1}$), enquanto que para o sítio norte ($PN = 835,02 \pm 21,19 \text{ nmol g}^{-1}$) não houve diferença significativa (Fig. 6.1-C). Já para o período de inverno, (Figura 6.1-D) o resultado para o dano oxidativo na glândula digestiva da ostra seguiu perfil semelhante ao encontrado na primavera/2003 e outono/2004, apesar dos níveis de TBARS estarem aumentados, tanto no sul ($PS = 613,53 \pm 32,17 \text{ nmol g}^{-1}$) como no norte ($PN = 521,88 \pm 36,27 \text{ nmol g}^{-1}$), em relação ao sítio referência ($PC = 409,73 \pm 26,68 \text{ nmol g}^{-1}$). Notou-se também que houve variação sazonal dos valores de TBARS no local do sítio referência entre primavera ($PC = 376,00 \pm 22,81 \text{ nmol g}^{-1}$), verão ($PC = 225,48 \pm 17,02$

nmolg⁻¹), outono (803,41 ± 23,40 nmolg⁻¹) e inverno (PC = 409,73 ± 26,68 nmolg⁻¹), os quais são mostrados na seção 6.6.1 (figura 6-8).



Figuras. 6.1-A e B: Níveis de TBARS na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10) coletadas em três sítios da Ilha de Santa Catarina durante a primavera de 2003 e verão de 2004. Os valores foram expressos pela média ± erro padrão. O símbolo *** indica diferença estatística significativa (p<0,01) em relação ao sítio referência.

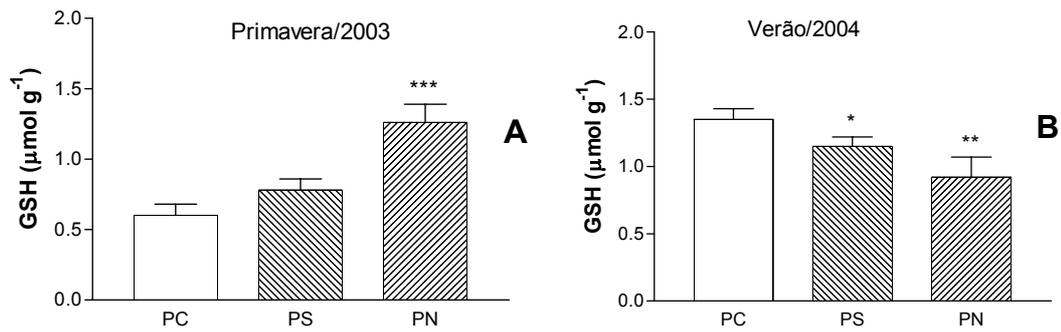


Figuras 6.1-C e D: Níveis de TBARS na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10) coletadas em três sítios da Ilha de Santa Catarina durante o outono e inverno de 2004. Os valores foram expressos pela média ± erro padrão. Os símbolos ***, ** e * indicam diferenças estatísticas significativas (p<0,001, p<0,01 e p<0,05) em relação ao sítio referência.

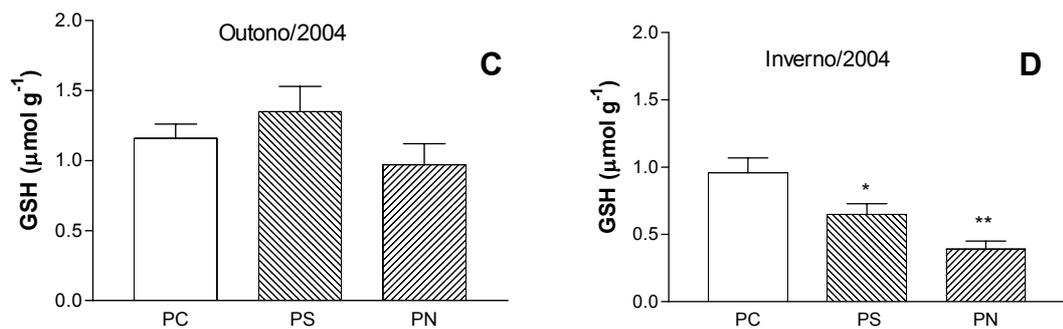
6.4 Análise dos Antioxidantes não Enzimáticos

6.4.1 Glutationa reduzida (GSH)

Os resultados dos níveis de tióis totais do tripetídeo glutaciona reduzida (GSH) na glândula digestiva da ostra nos dois sítios experimentais (PS e PN) em relação ao sítio referência PC são dados pelas figuras 6.2-A, B, C e D para as quatro estações. Sendo que a figura 6.2-A mostra o resultado para os níveis de GSH na glândula digestiva da ostra coletada na primavera de 2003. Observa-se que os níveis de tióis totais foram cerca de 2 vezes maior ($p < 0,05$) no sítio localizado no norte da Ilha de Santa Catarina ($PN = 1,26 \pm 0,13 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH) em relação ao sítio referência ($PC = 0,60 \pm 0,08 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH), enquanto que as concentrações de GSH do sítio sul ($PS = 0,78 \pm 0,08 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH) não apresentaram diferenças significativas em relação ao sítio referência. A figura 6.2-B exibe os níveis de GSH na glândula digestiva da ostra, coletada no período de verão de 2004. Pode-se notar que os valores para GSH foram significativamente menores no sítio norte ($PN = 0,92 \pm 0,15 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH), enquanto que no sítio sul ($PS = 1,15 \pm 0,07 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH), não houve diferença estatística em relação ao sítio referência ($PC = 1,35 \pm 0,08 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH). Na figura 6.2-C verifica-se que os níveis de GSH encontrados na glândula digestiva da ostra coletada no outono não apresentaram diferenças significativas em PN ($0,92 \pm 0,15 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH), e em PS ($1,35 \pm 0,19 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH) em relação ao sítio referência ($1,16 \pm 0,10 \mu\text{mol g}^{-1}$). O perfil dos níveis de tióis GSH na glândula digestiva da ostra coletada no período de inverno (Figura 6.2-D) foi semelhante ao apresentado no verão, e onde tanto o sítio norte ($PN = 0,39 \pm 0,06 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH) como o sítio sul ($PS = 0,65 \pm 0,08 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH), revelaram valores menores em relação ao sítio referência ($PC = 0,96 \pm 0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$ de GSH).



Figuras 6.2-A e B. Níveis de GSH em glândula digestiva de *Crassostrea gigas* em três (03) sítios da Ilha de Santa Catarina durante a primavera de 2003 e verão de 2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10). Os símbolos ***, ** e * indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$) em relação ao sítio referência.



Figuras 6.2-C e D: Níveis de GSH em glândula digestiva de *Crassostrea gigas* em três (03) sítios da Ilha de Santa Catarina durante outono e inverno de 2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10). Os símbolos ** e * indicam diferença estatística significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em relação ao sítio referência.

É possível notar uma variação sazonal no sítio referência, onde as concentrações de GSH na glândula digestiva da ostra mostrou aumentos, notadamente durante o verão e outono relativamente às amostras coletadas durante a primavera.

6.4.2 Glutationa Total (GT)

As concentrações de glutaciona total na glândula digestiva da ostra (Figura 6.3-A) coletada na primavera foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) no sítio em PN = $1,08 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) em relação ao sítio referência (PC = $0,72 \pm 0,09 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT). Enquanto que os valores nos animais coletados no mesmo período do ano no sítio localizado no sul (PS = $0,59 \pm 0,05 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao sítio referência. Durante o verão, os valores encontrados para os níveis de GT foram estatisticamente menores em ambos sítios experimentais (PN = $1,15 \pm 0,19 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT e PS = $1,86 \pm 0,17 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) em relação ao sítio referência (PC = $2,76 \pm 0,14 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT). Durante o outono (Figura 6.3-C) houve diferenças estatísticas entre PS ($0,84 \pm 0,14 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) e PC ($1,46 \pm 0,15 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT). Porém, o sítio PN ($1,02 \pm 0,18 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) no outono não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$), em relação à referência. Pode-se igualmente notar no sítio PC níveis mais elevados de GT durante o verão e outono em relação à primavera, repetindo o perfil encontrado no verão. As concentrações de glutaciona total (Figura 6.3-D) em ostras coletadas no período do inverno foram maiores no sítio norte (PN = $0,65 \pm 0,09 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) em relação à referência ($0,27 \pm 0,03 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT), enquanto que o sítio que se localiza ao sul da Ilha de Santa Catarina (PS = Ribeirão da Ilha, $0,51 \pm 0,07 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT)) apresentou diferença significativa em relação ao sítio referência.

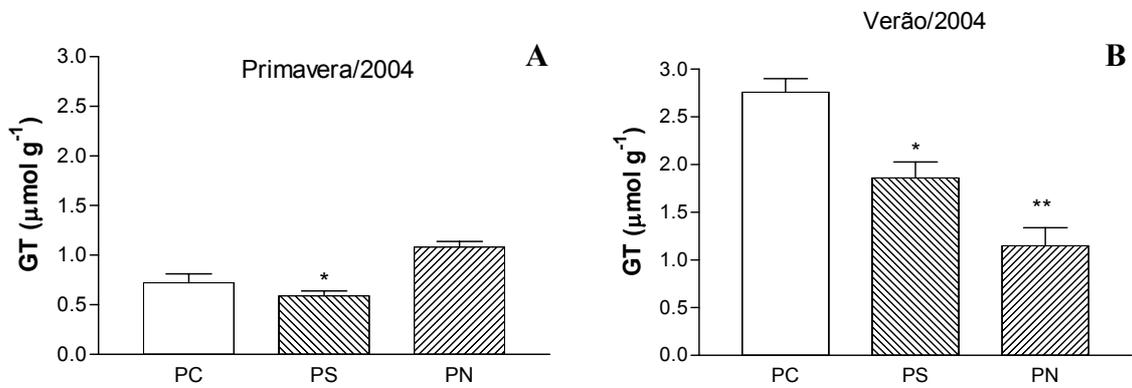


Fig. 6.3-A e B. Níveis de glutatona total (GT) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* coletadas em três (03) sítios da Ilha de Santa Catarina durante a primavera de 2003 e verão de 2004. Os valores foram expressos pela média ± erro padrão com (n=10). Os símbolos ** e *** indicam diferenças estatísticas significativas (p<0,01 e p<0,001) em relação à referência.

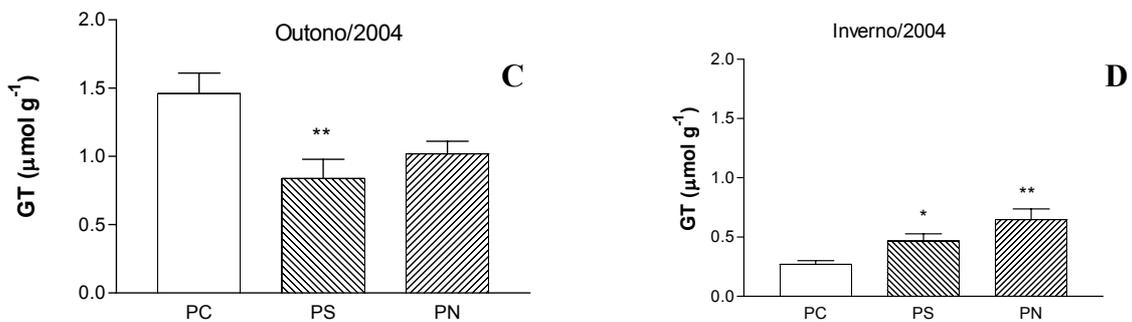


Fig. 6.3-C e D: Níveis de glutatona total (GT) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* coletadas em três (03) sítios da Ilha de Santa Catarina durante outono e inverno de 2004. Os valores foram expressos pela média ± erro padrão com (n=10). O símbolo ** indica diferenças estatísticas significativas (p<0,01) em relação à referência.

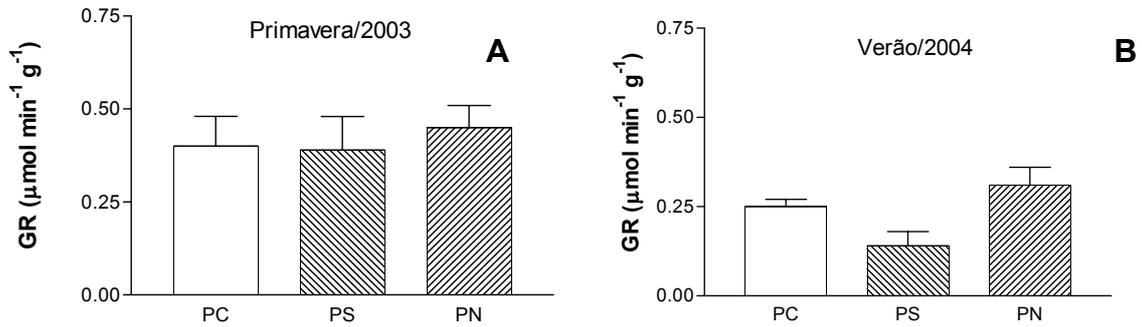
6.5 Análise dos Antioxidantes Enzimáticos

6.5.1 Atividade da Glutathione Redutase (GR)

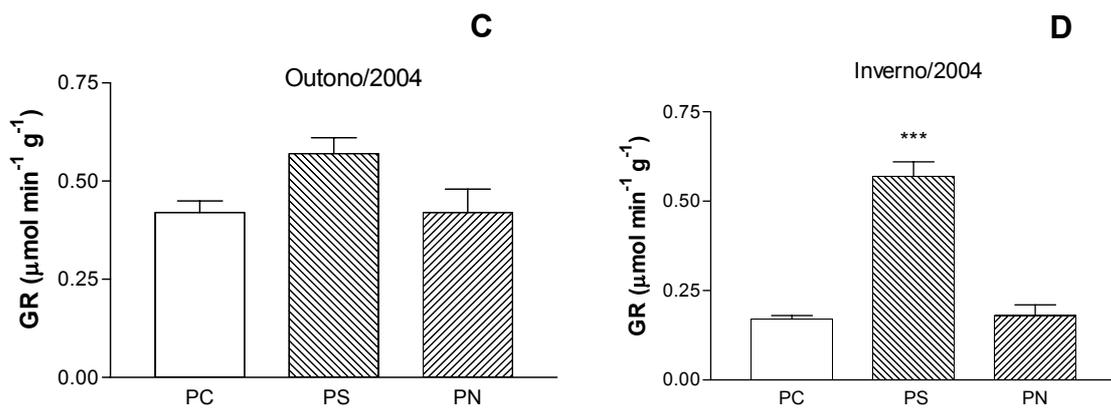
A atividade da GR presente na glândula digestiva de ostras coletadas na primavera de 2003 nos dois sítios experimentais (PS = $0,39 \pm 0,09$ e PN = $0,45 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não foi distinta ($p > 0,05$) daquela obtida no sítio referência (PC = $0,40 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), como mostra a figura 6.4-A. Da mesma forma no verão (figura 6.4-B), a atividade da GR para o sítio localizado no sul (PS = $0,14 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e no norte (PN = $0,31 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à referência (PC = $0,25 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

Durante a coleta de outono (figura 6.4-C) a atividade enzimática da GR neste período do outono nos sítios PS ($0,57 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e PN ($0,42 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não foi significativamente diferente em relação ao sítio referência (PC = $0,42 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, para as amostras coletadas durante o inverno (figura 6.4-D) a atividade da GR para o sítio PS ($0,57 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi significativamente maior (cerca de 2 vezes) em relação ao sítio referência (PC = $0,17 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que para o sítio PN ($0,18 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não houve diferença significativa em relação ao sítio referência.

No sítio referência, novamente durante o inverno exibiu-se valores menores da atividade da GR na glândula digestiva de ostras, comparativamente aos animais coletados nos outros períodos do ano, independentemente da contribuição dos contaminantes.



Figuras 6.4-A e B. A atividade enzimática da glutatona redutase na glândula digestiva de *Crassostrea gigas*, durante a primavera/ 2003 e verão/2004.

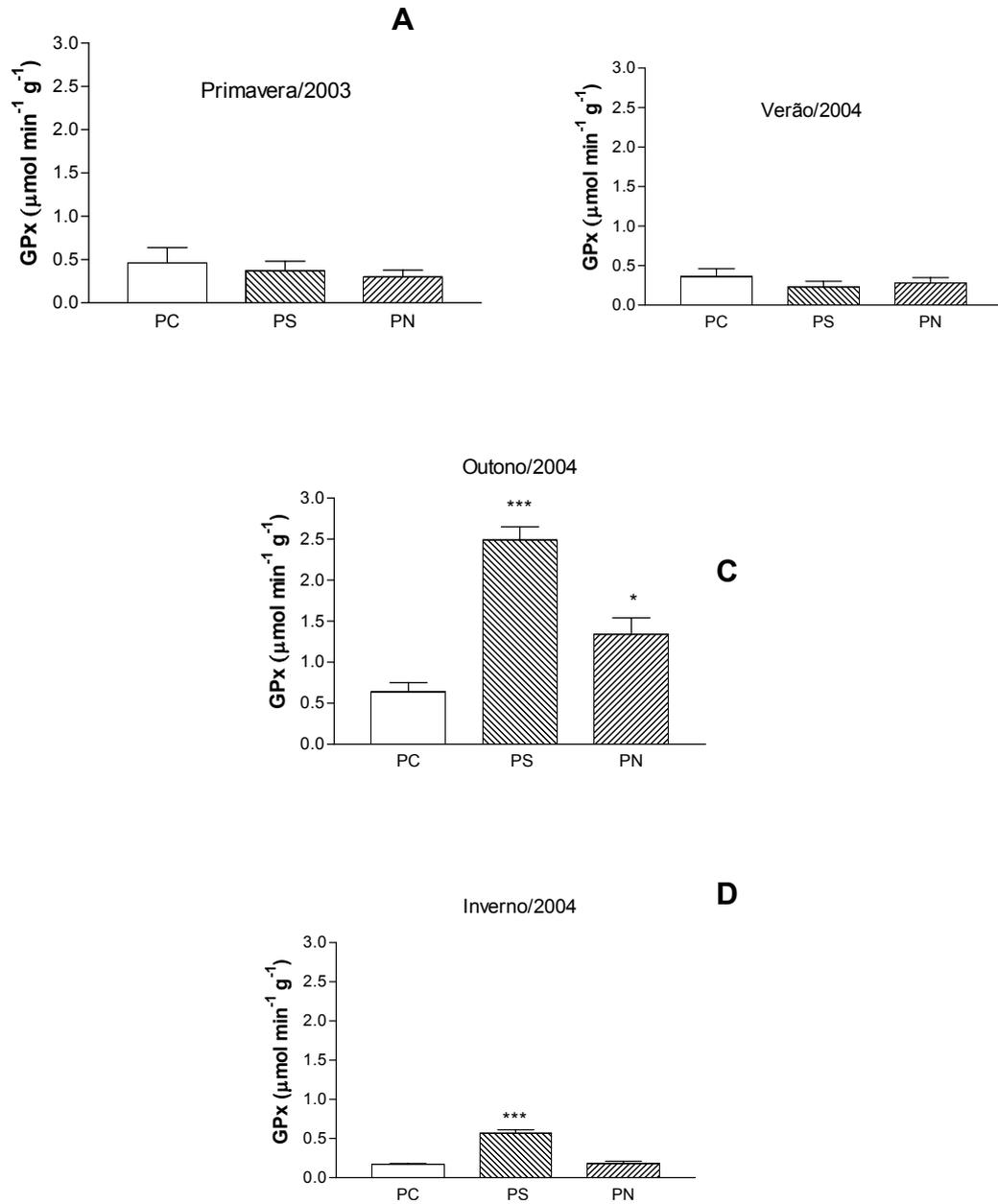


Figuras 6.4-C e D. A atividade enzimática da glutatona redutase na glândula digestiva de *Crassostrea gigas*, durante o outono e inverno/2004. O símbolo *** indica diferença estatística ($p < 0,001$), em relação ao sítio referência.

6.5.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx na glândula digestiva de ostras coletadas na primavera de 2003 (figura 6.5-A) para o sítio sul PS ($0,37 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e norte PN ($0,30 \pm 0,11 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC = $0,46 \pm 0,18 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) não mostrou diferenças significativas entre eles ($p>0,05$). Do mesmo modo os valores para a atividade de GPx (figura 6.5-B) em PS ($0,23 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e para o sítio no norte (PN.= $0,28 \pm 0,07 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) não apresentaram-se estatisticamente diferentes ($p>0,05$) em relação ao sítio referência (PC = $0,36 \pm 0,10 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, a atividade da glutathione peroxidase (figura 6.5-C) em ostras no período do outono de 2004 mostrou valores elevados para ambos os sítios amostrados PS ($2,49 \pm 0,16 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e PN ($1,34 \pm 0,20 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência ($0,64 \pm 0,11 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). A glândula digestiva da ostra durante o inverno também mostrou o sítio localizado no sul (PS = $0,25 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) com atividade superior de GPx (figura 6.5-D) em relação ao sítio referência (PC = $0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que para o sítio norte (PN = $0,080 \pm 0,02 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) não houve diferença significativa em relação ao sítio referência.

Os níveis da atividade da GPx dos animais coletados no sítio referência não mostraram diferenças sazonais, exceção das amostras coletadas durante o inverno, repetindo o padrão encontrado nos outros parâmetros examinados (GSH, GT e GR).



Figs. 6.5-A, B, C e D: Atividade da glutathiona peroxidase GPx na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* em três sítios durante a primavera/ 2003, verão, outono e inverno/2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n =10). Os símbolos *, ** e *** indicam, respectivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, em relação ao PC (sítio referência).

6.5.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase na glândula digestiva da ostra durante a primavera de 2003 (Fig.6.6-A) nos sítios experimentais (PS= $0,37 \pm 0,08 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e (PN = $0,30 \pm 0,11 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não mostrou diferenças significativas em relação ao sítio referência (PC = $0,46 \pm 0,18 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Já para o verão, a atividade da catalase (Fig. 6.6-B) no sítio sul (PS = $1,39 \pm 0,13 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi significativamente superior ao sítio referência (PC = $0,42 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, o sítio norte não apresentou diferença estatística na atividade da catalase (PN = $0,48 \pm 0,05 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). No outono, a atividade da catalase (Fig. 6.6-C) apresentou o mesmo perfil daquela das ostras coletadas no verão, uma vez que PS ($0,96 \pm 0,14 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) se manteve aumentado (cerca de quatro vezes mais) em relação ao sítio referência (PC = $0,23 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$). Em contrapartida, o sítio norte (PN= $0,43 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença significativa em relação ao sítio referência. Novamente no inverno esse comportamento foi semelhante aos períodos de verão e outono, pois, a atividade da CAT detectada na glândula digestiva das ostras no sítio sul (PS = $0,61 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) também se manteve maior em relação ao sítio referência (PC = $0,16 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$) e PN ($0,18 \pm 0,03 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença estatística em relação ao PC, como está indicada na figura 6.6-D.

Repetindo uma tendência verificada nos parâmetros anteriores, também a catalase apresentou menores atividades nas coletas de inverno no sítio referência, comparativamente aos demais períodos do ano. O perfil das atividades da CAT e GPx mostrou muita semelhança durante os diferentes períodos do ano.

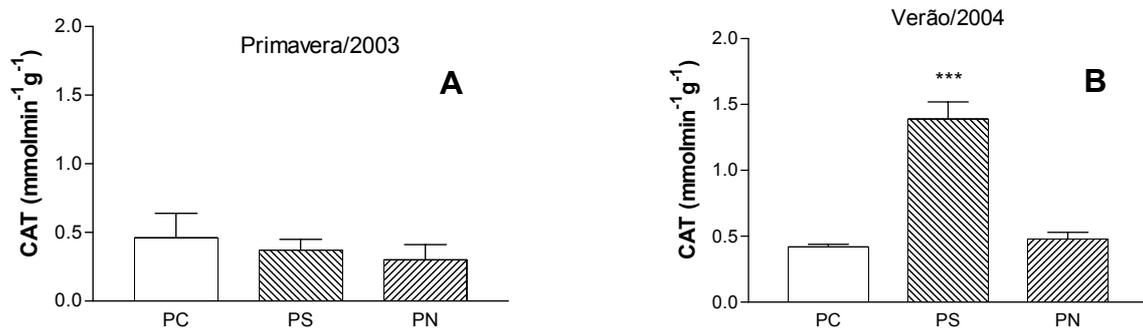


Figura 6.6-A e B: Atividade da catalase (CAT) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* durante a primavera/2003 e verão/2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10). O símbolo *** indica $p < 0,001$, em relação ao sítio referência (PC).

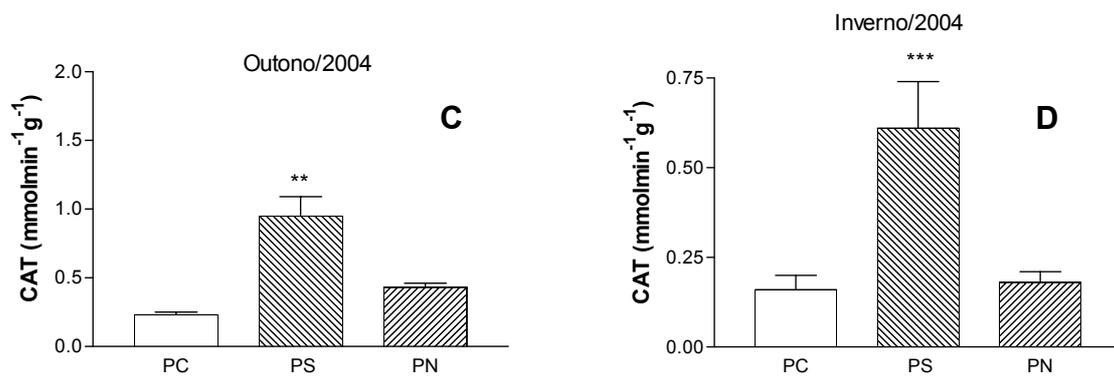
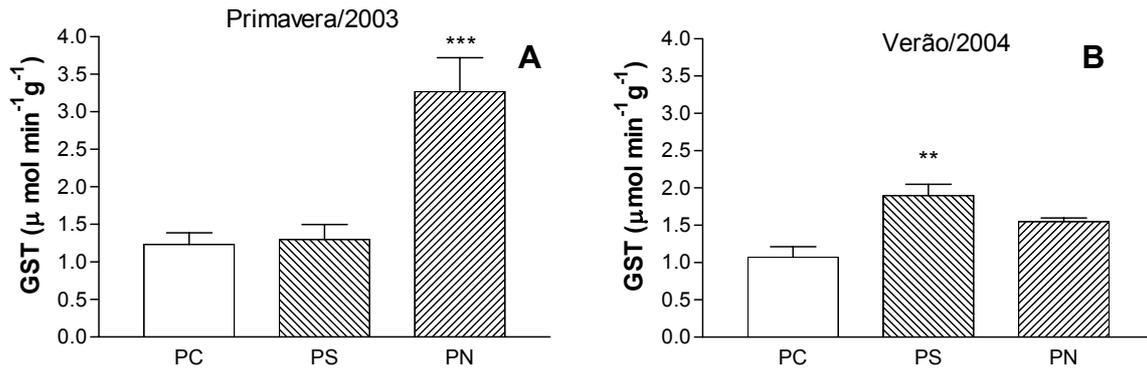


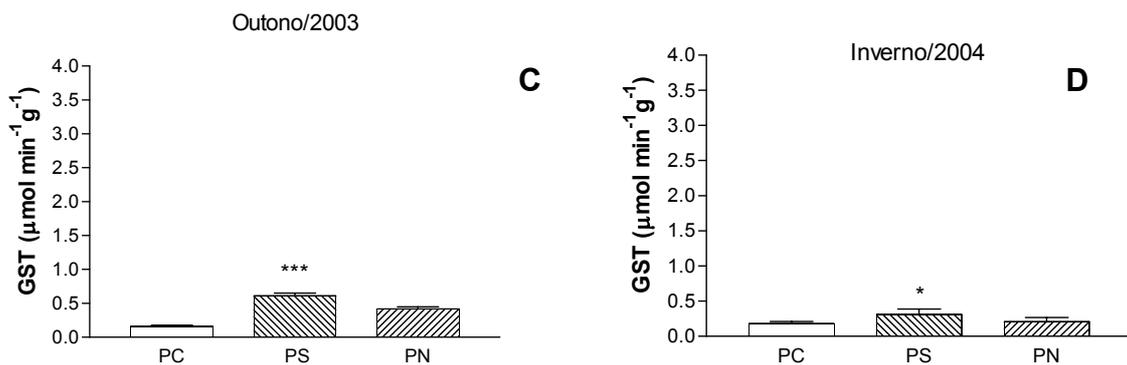
Figura 6.6-C e D: Atividade da catalase (CAT) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* durante o outono e inverno/2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10). Os símbolos ** e *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em relação ao sítio referência (PC).

6.5.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

Na primavera a maior atividade enzimática (Fig.6.7-A) foi encontrada em PN ($3,27 \pm 0,45 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC = $1,23 \pm 0,16 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que o sítio sul (PS = $1,30 \pm 0,20 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença estatística. Para o verão, (Fig. 6.7-B) o valor para a atividade da glutathione S-transferase no sítio localizado no sul (PS = $1,90 \pm 0,15 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi significativamente maior em relação ao sítio referência (PC = $1,07 \pm 0,14 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), o mesmo acontecendo para o sítio localizado no norte (PN = $1,59 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência. No outono a GST (Fig. 6.7-C) na glândula digestiva da ostra em PS ($0,61 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e PN ($0,42 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) novamente apresentou atividades mais elevadas comparativamente ao sítio referência (PC = $0,16 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Igualmente no inverno, o perfil da GST dos mexilhões coletados no sítio PS foi semelhante ao do outono, uma vez que PS ($0,31 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi superior em relação ao sítio referência (PC = $0,18 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que o PN ($0,21 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença significativa. Durante a primavera e o outono as atividades da GST nas ostras coletadas no sítio referência foram muito menores daqueles verificadas durante a primavera e o verão.



Figs. 6.7-A e B: Atividade da glutathione S-transferase (GST) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* durante a primavera/ 2003 e verão/2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10), sendo que os símbolos * e *** indicam, respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,001$, em relação ao sítio referência (PC).



Figs. 6.7-C e D: Atividade da glutathione S-transferase (GST) na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* durante o outono e inverno/2004. Os valores foram expressos pela média \pm erro padrão com (n=10), sendo que os símbolos * e *** indicam, respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,001$, em relação ao sítio referência (PC).

6.6 Análise do efeito da sazonalidade sobre os biomarcadores de estresse oxidativo nos diferentes sítios de coleta em *Crassostrea gigas*.

No sentido de melhor visualizar a análise da contribuição sazonal, independente da análise comparativa das diferenças obtidas entre os diferentes sítios, os valores dos biomarcadores de estresse oxidativo foram agrupados em seqüência temporal, contemplando as amostras obtidas nas quatro estações do ano, conforme os gráficos a seguir.

6.6.1 Dano por lipoperoroxidação tecidual (TBARS)

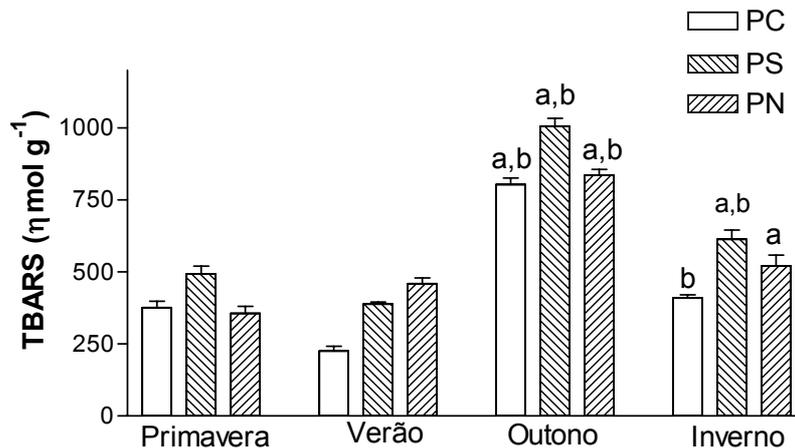


Fig. 6-8. Níveis de TBARS (nmol g⁻¹) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas (p<0,001) comparando-se outono e inverno com a primavera e (b) denota diferenças significativas (p<0,001) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores forma expressos como média ± erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Pela fig. 6-8 pode-se notar que houve uma elevação do nível de lipoperoxidação na glândula digestiva de ostras coletadas no período de outono (média dos três sítios = 881,33 ± 23,8 nmol g⁻¹) e inverno (média dos três sítios = 514,33 ± 26,3 nmol g⁻¹) em relação a períodos mais quentes do ano; primavera (média dos três sítios = 408,74 ± 24,5 nmol g⁻¹) e

verão (média dos três sítios = $357,91 \pm 14,8 \text{ nmol g}^{-1}$), destacando que a diferença entre os valores dos níveis de TBARS obtidos em ambos os sítios PS para animais amostrados durante o outono foi cerca de duas vezes maior em relação ao período quente do ano. No sítio referência também houve um aumento nos níveis de TBARS durante o outono.

6.6.2 Glutathiona reduzida (GSH)

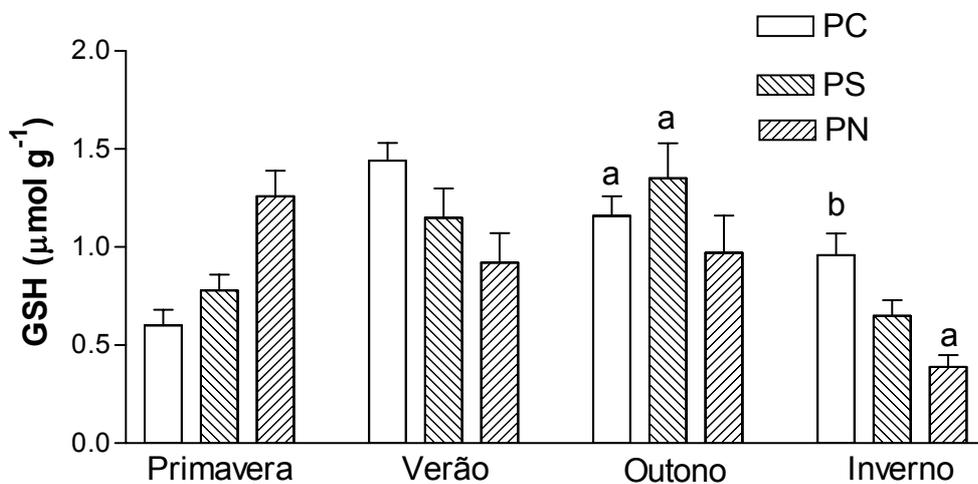


Fig.6-9. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera. (b) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Para a quantidade de glutathiona reduzida encontrada da glândula digestiva de *Crassostrea gigas* não houve diferença significativa entre os períodos frios do ano em relação aos períodos quentes (Fig. 6-9).

Apesar disso, as concentrações de GSH da glândula digestiva das ostras coletadas no sítio PS durante o outono (média dos três sítios = $1,35 \pm 0,18 \text{ μmolg}^{-1}$) foram superiores (cerca de duas vezes maiores) comparativamente àquelas no período da primavera (média dos

três sítios = $0,78 \pm 0,08 \mu\text{molg}^{-1}$) no mesmo sítio experimental. Houve porém menores conteúdos de GSH durante a primavera, comparativamente aos demais períodos do ano.

6.6.3 Glutationa total (GT)

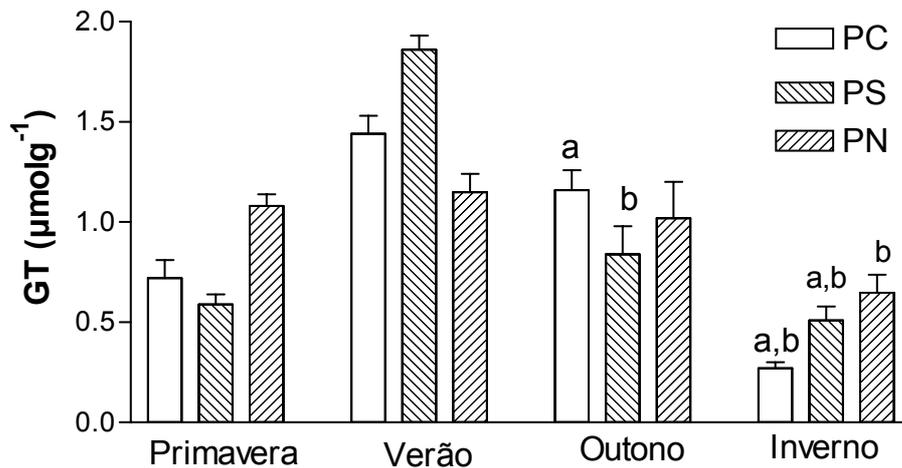


Fig. 6-10. Níveis de glutathione total (GT) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera. (b) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Os resultados apresentados acima (Fig. 6.10) para as concentrações de GT na glândula digestiva em *Crassostrea gigas* coletada no sítio PS apresentou-se significativamente superior durante o outono (média dos três sítios = $1,35 \pm 0,18 \mu\text{mol g}^{-1}$) e inverno (média dos três sítios = $1,86 \pm 0,07 \mu\text{mol g}^{-1}$), quando comparados com os animais coletados durante o período da primavera (média dos três sítios = $0,59 \pm 0,05 \mu\text{molg}^{-1}$) e verão (média dos três sítios = $1,15 \pm 0,18 \mu\text{mol g}^{-1}$), sendo que foi significativamente maior no sítio PS (cerca de duas vezes mais). Por outro lado, notou-se que o sítio PN exibiu valores de GT no inverno significativamente menores ($0,51 \pm 0,07 \mu\text{molg}^{-1}$) em relação aos períodos quentes do ano; primavera ($1,08 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$) e verão ($0,92 \pm 0,18 \mu\text{molg}^{-1}$). O perfil sazonal da GT

encontrado foi muito semelhante ao da GSH, tanto no sítio referência como nos sítios experimentais.

6.6.4 Glutathione S-transferase (GST)

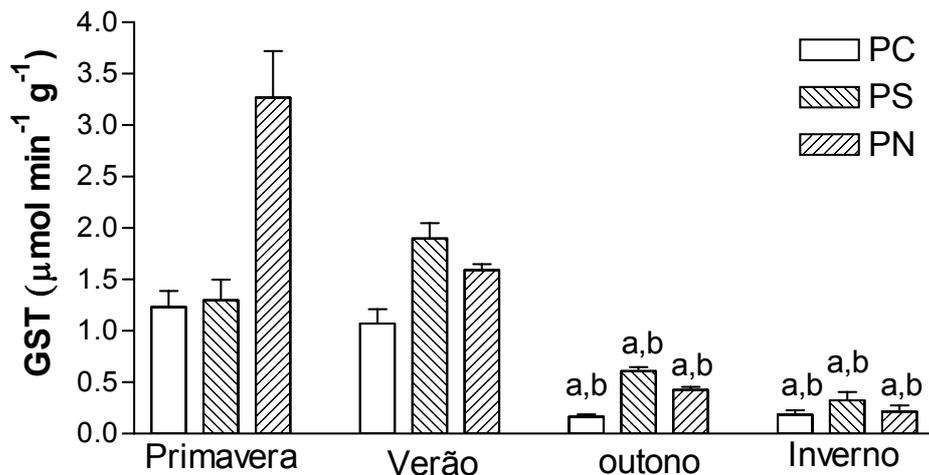


Fig. 6-11. Níveis da atividade específica da glutathione S-transferase (GST) encontrados na glândula digestiva em *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera e (b) representa diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão para as amostra através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

A atividade enzimática de GST, o qual está indicada na fig. 6.11, de animais coletados durante o outono e inverno no sítio sul (PS = $1,34 \pm 0,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) foi estatisticamente menor, comparativamente aos valores encontrados nas ostras coletadas nos períodos quentes (PS = $3,42 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Da mesma forma para PN, também os valores da atividade da GST foram inferiores nos períodos frios ($0,65 \pm 0,10 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação as valores encontrados nos animais coletados durante a primavera e verão ($4,83 \pm 0,38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$).

As atividades da GST nas ostras coletadas no sítio referência foram menores durante os meses mais quentes, comparativamente aos meses mais frios.

6.6.5 Glutationa redutase (GR)

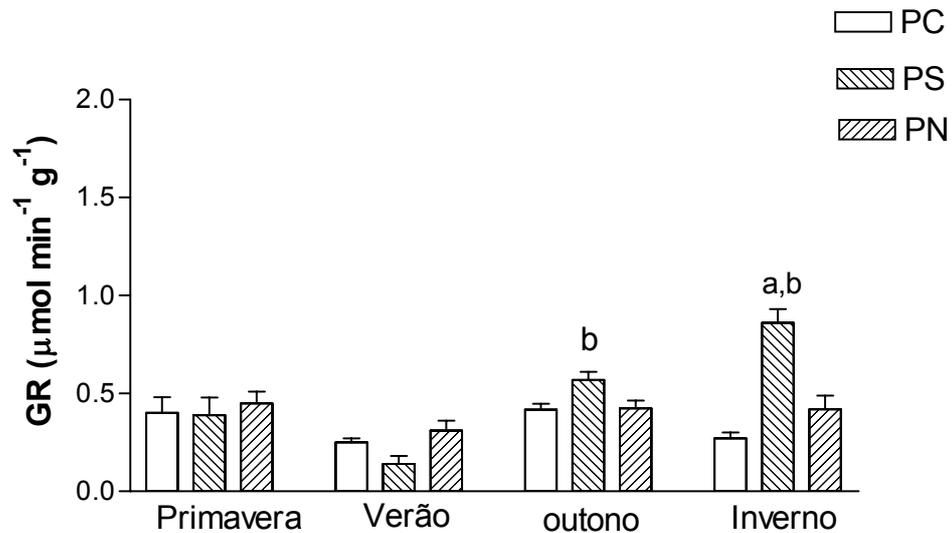


Fig. 6-12. Níveis da atividade da glutathione redutase (GR) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera. (b) representa diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Verificou-se que os valores para a atividade da glutathione redutase na fig. 6.12 encontrou-se bastante elevada no sítio PS durante a coleta feita no inverno ($1,86 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação a atividade da mesma medida na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* medida nos períodos quentes ($0,54 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Para o sítio PN não foi constatada diferença significativa na atividade da GR entre os períodos de meses quentes e frios.

Não houve maiores oscilações sazonais da atividade da GR nos animais coletados no sítio referência.

6.6.6 Glutationa peroxidase (GPx)

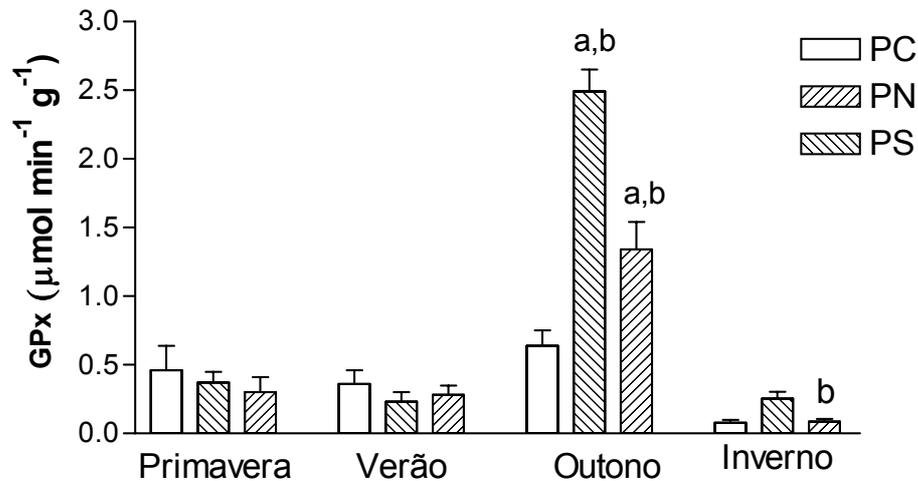


Fig. 6-13. Níveis da atividade específica da glutathione peroxidase (GPx) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* (n=10). (a) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera. (b) representa diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão para as amostras através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Os valores para a atividade da glutathione peroxidase (Fig. 6.13) apresentaram-se maiores durante o período de outono, tanto para os sítios PS, como para o PN ($3,83 \pm 0,36 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação à primavera de 2003 ($0,77 \pm 0,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Para o período de inverno ($0,32 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) verificou-se que os níveis apresentaram diferenças significativas apenas para o sítio norte da Ilha (PN = $0,087 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação ao verão, mas não durante a primavera. Com relação à sazonalidade do sítio PC, não houve diferenças significativas entre as médias dos períodos quentes e frios, apesar do acentuado aumento dos sítios experimentais (PN e PS). Novamente, os níveis da atividade da GPx durante o inverno foram menores em ostras coletadas durante o inverno no sítio referência, comparativamente aos demais períodos do ano.

6.6.7 Catalase (CAT)

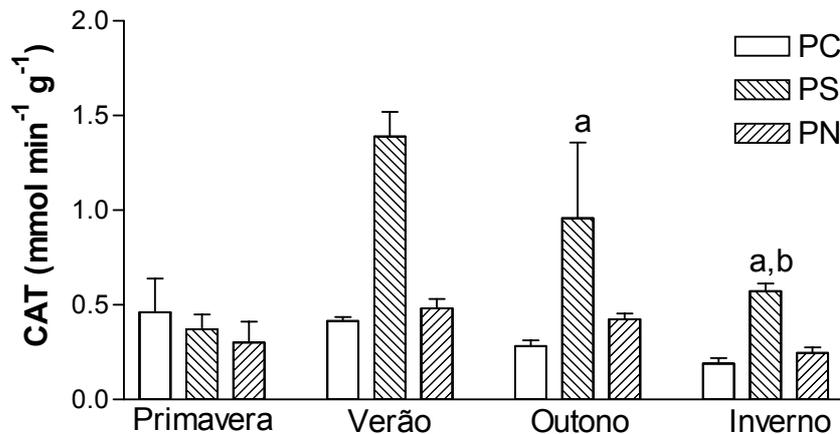


Fig. 6-14. Níveis da atividade da CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) encontrados na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* ($n=10$). (a) indica diferenças significativas ($p<0,05$) comparando-se outono e inverno com a primavera. (b) representa diferenças significativas ($p<0,01$) comparando-se outono e inverno com o verão. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Os resultados (Fig.6.14) mostraram que houve alteração significativa para a atividade da catalase na glândula digestiva de *Crassostrea gigas* coletadas no sítio sul (PS), no período de verão ($1,35 \pm 0,18 \text{ mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) de outono ($1,05 \pm 0,32 \text{ mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) e no inverno ($0,54 \pm 0,13 \text{ mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação ao período da primavera ($0,34 \pm 0,11 \text{ mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$).

Por outro lado, o valor da atividade específica da catalase no sítio PN não apresentou diferença significativa entre os períodos quentes e frios. As atividades da CAT em ostras coletadas no sítio referência exibiram valores decrescentes da primavera ao inverno, e novamente o inverno mostrou valores mais baixos.

6.7 Análise comparativa dos biomarcadores de estresse oxidativo em *Perna perna* nos distintos sítios e a variação sazonal.

6.7.1 Análise da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)

Os resultados para os níveis de TBARS na glândula digestiva do mexilhão dos dois sítios experimentais em relação ao sítio referência para os períodos da primavera de 2003 e inverno de 2004 estão representados na figura 6.15. Constataram-se níveis mais elevados de TBARS na primavera de 2003 nos dois sítios experimentais (PS = $470,47 \pm 23,36 \text{ nmol g}^{-1}$ e PN = $432,94 \pm 40,52 \text{ nmol g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC = $280,00 \pm 38,23 \text{ nmol g}^{-1}$). Para o período do inverno, os níveis de TBARS seguiram um perfil semelhante ao encontrado na primavera (PS = $694,63 \pm 74,22 \text{ nmol g}^{-1}$; e PN = $490,31 \pm 20,94 \text{ nmol g}^{-1}$), sendo também significativamente maiores em relação ao sítio referência (PC = $220,00 \pm 29,09 \text{ nmol g}^{-1}$), resultando o valor médio em PS mais de três vezes, e o de PN duas vezes maior, em relação ao sítio referência. Verificou-se que o perfil foi semelhante ao da ostra quanto à análise sazonal (Fig.6-8).

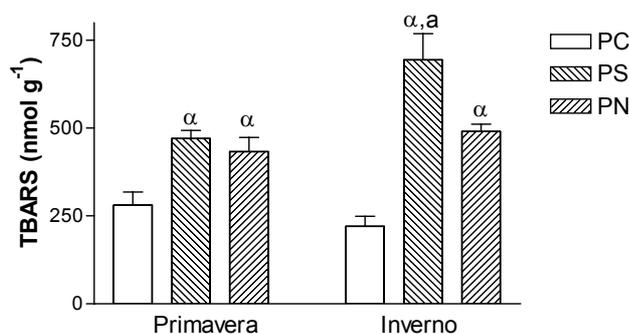


Fig. 6.15: Níveis de TBARS encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (n=10). O símbolo (α) indica diferença estatística (p<0,05) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças significativas (p<0,01) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média ± erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Por outro lado, não houve diferença estatística entre os níveis de TBARS para glândula digestiva dos mexilhões coletados em PN entre as estações quente e fria.

6.8 Análise dos Antioxidantes não Enzimáticos

6.8.1 Tióis Totais – Glutationa reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida (figura 6.16) para os mexilhões coletados na primavera no sítio sul (PS = $1,52 \pm 0,19 \mu\text{mol g}^{-1}$) apresentaram-se duas vezes maiores em relação ao sítio referência (PC = $0,75 \pm 0,10 \mu\text{mol g}^{-1}$), enquanto que em PN ($0,57 \pm 0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$) não houve diferença estatística. Os níveis de GSH (figura 6.16) na glândula digestiva dos mexilhões coletados no inverno não apresentaram diferenças estatísticas nos dois sítios (PN = $1,10 \pm 0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$ e PS = $1,37 \pm 0,14 \mu\text{mol g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC = $0,94 \pm 0,20 \mu\text{mol g}^{-1}$).

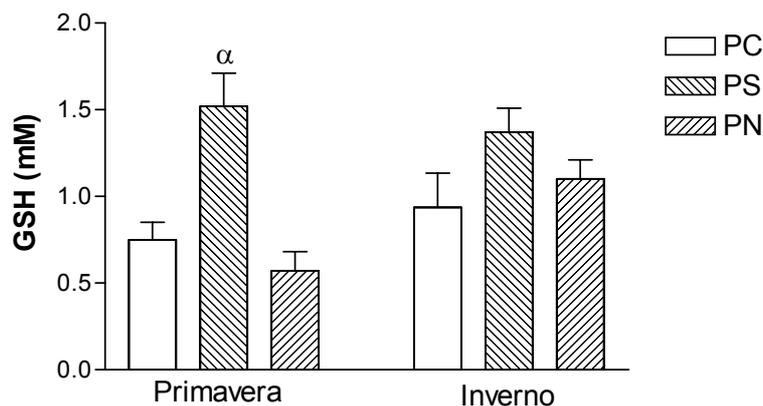


Fig. 6.16: Níveis de glutathiona reduzida (GSH) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência, complementada pelo teste de Bonferroni.

Através do gráfico acima (Fig.6.16) pode ser observado que não houve diferença significativa do nível de glutathiona reduzida na glândula digestiva de mexilhão *Perna perna* coletado no inverno (PS = $1,37 \pm 0,14 \mu\text{mol g}^{-1}$ e PN = $1,10 \pm 0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$), em relação aos animais coletados na primavera (PS = $1,52 \pm 0,19 \mu\text{mol g}^{-1}$ e PN = $1,10 \pm 0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$) nos dois sítios. Os níveis de GSH (Fig. 6.16) encontrados em *Perna perna* e em *Crassostrea gigas* (Fig.6.9) mostraram respostas diferentes para este parâmetro nas duas distintas espécies;

no sítio PS para a ostra os níveis de GSH não estiveram aumentados, enquanto que para o mexilhão os níveis de GSH estiveram mais elevados na primavera e no inverno.

6.8.2 Glutationa Total (GT)

Verificou-se que os valores encontrados para os níveis de GT (figura 6.17) nos animais coletados na primavera, o sítio PS ($0,95 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$) e PN ($1,03 \pm 0,15 \mu\text{molg}^{-1}$) não apresentou diferenças significativas em relação ao sítio referência (PC = $0,76 \pm 0,05 \mu\text{molg}^{-1}$). Por outro lado, os valores das concentrações de GT dos mexilhões coletados no inverno no sítio sul (PS = $1,42 \pm 0,13 \mu\text{molg}^{-1}$) exibiu valores estatisticamente maiores em relação ao sítio referência (PC = $1,00 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$), enquanto que no PN ($1,12 \pm 0,15 \text{ mM}$ de GT) não houve diferença significativa. Verificou-se que os valores encontrados para os níveis de GSH nos animais coletados na primavera, o sítio PS ($0,95 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$) e PN ($1,03 \pm 0,15 \mu\text{molg}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao sítio referência (PC = $0,76 \pm 0,05 \mu\text{molg}^{-1}$). Por outro lado, os valores das concentrações de GT (figura 6.17) dos mexilhões coletados no inverno no sítio sul (PS = $1,42 \pm 0,13 \mu\text{molg}^{-1}$) exibiu valores maiores em relação ao sítio referência (PC = $1,00 \pm 0,06 \mu\text{molg}^{-1}$), enquanto que no PN ($1,12 \pm 0,15 \mu\text{molg}^{-1}$ de GT) não houve diferença.

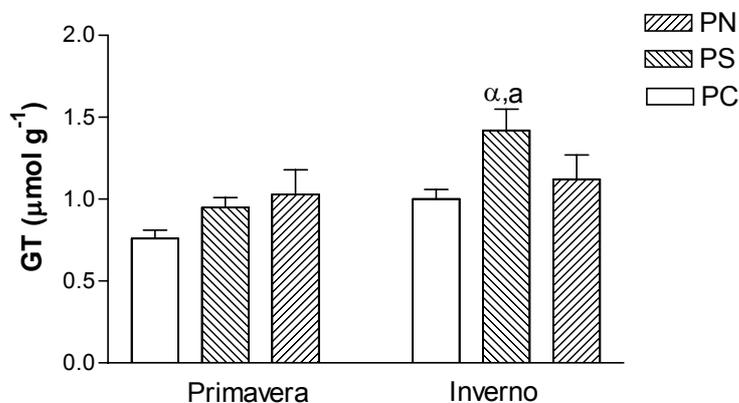


Fig.6.17: Níveis de glutaciona total (GT) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças

significativas ($p < 0,01$) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Os perfis dos níveis de GT (Fig. 6.24) em *Perna perna* e de *Crassostrea gigas* (Fig.6.10) apresentaram-se distintos, pois os níveis de glutathiona total no sítio PS para as ostras ficaram diminuídas no inverno, enquanto que o mexilhão exibiu um aumento no período mais frio.

6.9 Análise dos Antioxidantes Enzimáticos

6.9.1 Atividade da Glutathiona Redutase (GR)

A atividade enzimática da GR na primavera para os dois sítios (PS= $0,25 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e PN= $0,25 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC= $0,41 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferenças significativas (Figura 6.18). Entretanto, no inverno a atividade enzimática da glutathiona redutase presente na glândula digestiva do mexilhão no sítio sul (PS= $0,31 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi significativamente maior (cerca de três vezes) em relação ao sítio referência (PC = $0,11 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que no sítio localizado no norte (PN = $0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência, não houve diferença significativa.

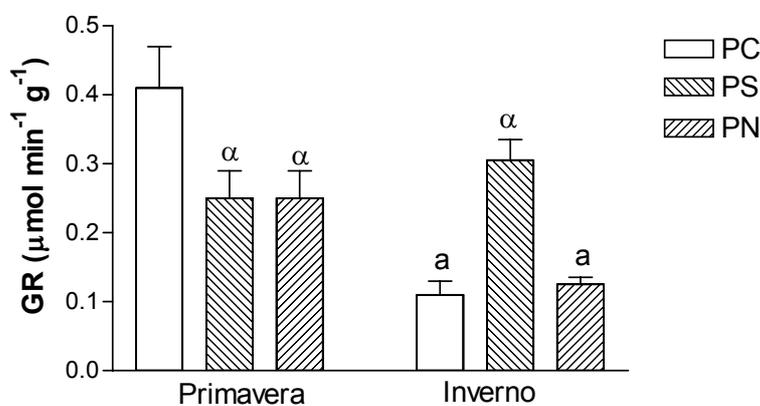


Fig. 6.18: Atividade da glutathione redutase (GR) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Nota-se que não houve diferença significativa para a glutathione redutase na glândula digestiva de mexilhões coletados no inverno no sítio Ribeirão da Ilha (PS = $0,31 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que em PN ($0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) houve diminuição em relação aos animais coletados na primavera (PS = $0,25 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e PN = $0,25 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), diferentemente do encontrado em *Crassostrea gigas* (Fig.6.13), onde a atividade da GR para as ostras ficou induzida no outono com diferenças significativas em relação aos demais períodos do ano. De modo semelhante à ostra, durante o inverno a atividade da GR mostrou-se diminuída relativamente à primavera.

6.9.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da glutathione peroxidase durante a primavera de 2003 (Fig.6.19) foi maior no sul (PS = $7,11 \pm 1,35 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) do que no norte (PN = $4,55 \pm 1,07 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). No entanto, em relação ao sítio referência (PC = $6,29 \pm 0,77 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) constatou-se que houve diferenças significativas entre os sítios PS e PN. Para o período mais frio, a atividade da GPx no sítio localizado no sul (PS = $3,80 \pm 0,75 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) mostrou-se bastante elevada (cerca de cinco vezes mais) em relação ao sítio referência (PC = $0,843 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Entretanto, para o sítio norte (PN = $2,28 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não houve diferenças significativas em relação ao sítio referência (Fig. 6.19).

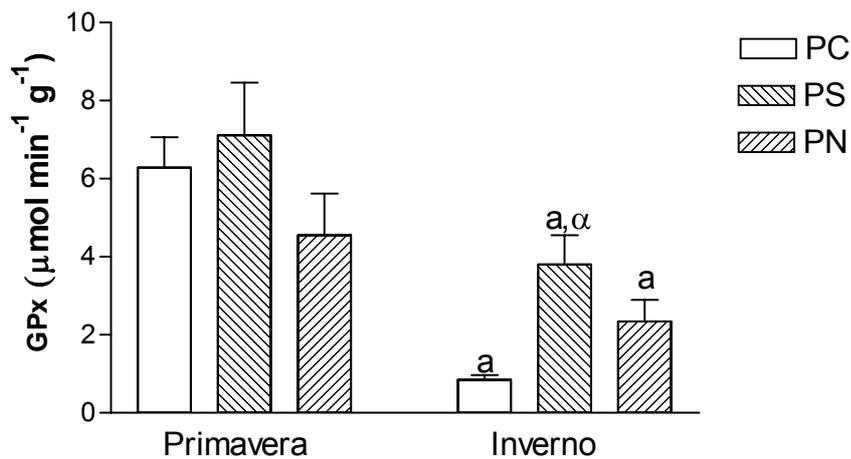


Fig. 6.19: Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

Novamente a exemplo do que foi constatado para a ostra, a atividade da GPx de mexilhões coletados no sítio referência durante o inverno foi muito menor (cerca de oito vezes) que na primavera.

Distintamente aos resultados apresentados para *Crassostrea gigas* (figura 6.13), onde a atividade da GPx ficou bastante aumentada durante o período de outono, em *P. perna*, a GPx estava induzida durante a primavera comparativamente ao inverno, inclusive nos mexilhões coletados no sítio referência.

6.9.3 Atividade da Catalase (CAT)

A Fig.6.20 mostra que a atividade da catalase detectada nos mexilhões coletados durante a primavera de 2003 nos dois sítios (PS = $0,63 \pm 0,15 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e PN = $0,95 \pm 0,32 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao sítio referência (PC = $0,55 \pm 0,19 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi semelhante. Já para o inverno a atividade da catalase no sítio sul (PS = $0,31 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foi significativamente maior que o sítio referência (PC = $0,21 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, o sítio norte (PN) não apresentou diferença estatística em seus valores da atividade da catalase (PN = $0,13 \pm 0,03 \text{ mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação à referência.

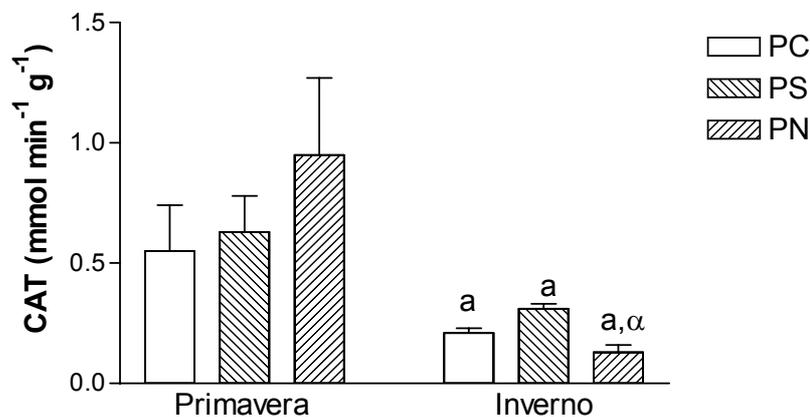


Fig. 6.20: Atividade da catalase (CAT) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

A atividade da CAT de mexilhões coletados no sítio referência durante o inverno foi maior daqueles coletados durante a primavera, igual tendência dos outros parâmetros examinados nesta espécie e também na ostra. Entretanto, em *Crassostrea gigas* (Fig.6.14) ocorreu um aumento significativo da CAT no sítio PS, enquanto que no mexilhão houve um decréscimo de sua atividade.

6.9.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

Constatou-se que a maior atividade da GST (Fig.6.21) nos mexilhões coletados durante a primavera foi no sítio sul (PS = $1,83 \pm 0,23 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), em relação ao sítio referência (PC = $1,05 \pm 0,18 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, em relação ao sítio referência, o sítio localizado no norte (PN = $1,03 \pm 0,23 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não apresentou diferença estatística. Para o inverno (Fig.6.21) os valores para a atividade da glutathione S-transferase no sítio PS ($0,93 \pm 0,23 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) foram novamente significativamente maiores (cerca de duas vezes) em relação ao sítio referência (PC = $0,45 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), enquanto que para o sítio no norte (PN = $0,44 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) não houve diferença significativa.

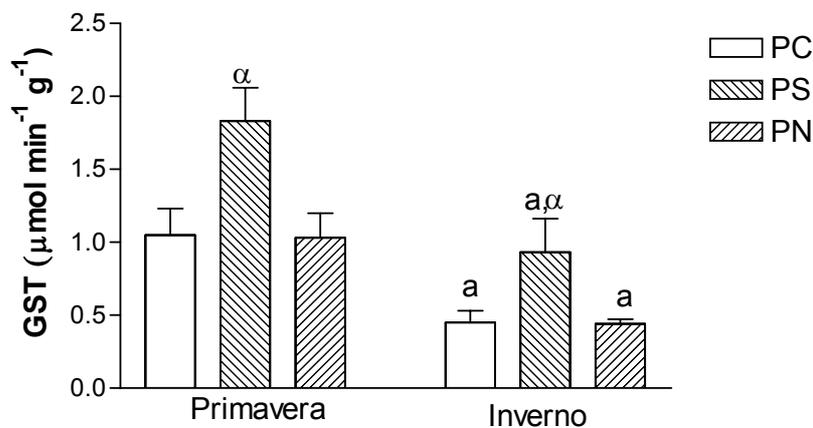


Fig. 6.21: Atividade da glutathione S-transferase (GST) encontrados na glândula digestiva de *Perna perna* (N=10). O símbolo (α) indica diferença estatística ($p < 0,05$) dos sítios PN e PS em relação ao sítio referência. (a) denota diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando-se inverno com primavera. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão através de ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni.

A atividade da glutathione S-transferase na glândula digestiva de mexilhões coletados nos sítios referência e os experimentais durante o inverno foram menores em relação aos animais coletados na primavera, resultado semelhante ao de *Crassostrea gigas* (Fig.6.11).

7. DISCUSSÃO

As análises físico-químicas mostraram que o único parâmetro que apresentou alteração com relação aos valores permitidos pelo CONAMA (1986) foi o índice de sulfeto total medido na água do mar em diferentes locais de cultivo de ostras e mexilhões. A presença de níveis elevados de íons sulfetos no meio aquático sugere que eles poderiam ser formados somente na ausência de oxigênio (BAIRD, 1999), ou quando há criação intensiva em aquicultura, principalmente de peixes, crustáceos e moluscos (BRAZ, 2000). Os processos de cultivos podem freqüentemente levar a uma acumulação de detritos orgânicos dos próprios organismos e, conseqüentemente, podem acarretar hipóxia severa e prolongada em sedimentos de fundo, principalmente em águas rasas, situação predominante na maioria das estações de malacocultura na Ilha de Santa Catarina (SIERRA DE LEDO, 1989; CERUTTI, 1997). Por outro lado, o gás sulfídrico pode ser proveniente de regiões que tenham combinações presentes de enxofre oxidadas como subproduto de metabolismo anaeróbico de bactérias heterotróficas, muito comum em manguezais ou próximos a despejos de materiais orgânicos (como efluentes domésticos), ou até mesmo em áreas aonde ocorre baixa circulação de marés (lagunas, enseadas e baías), caso dos manguezais de Tapera e de Ratonés localizados, respectivamente, próximos aos rios Ribeirão da Ilha (Baía Sul) e Ratonés (Baía Norte), segundo estudos de Cerutti (1997). Estes resultados estão em concordância com estudos desenvolvidos por Prudêncio (2003) em regiões da Baía Sul através de modelos de simulação para as correntes marítimas. No trabalho citado anteriormente, foi possível estabelecer condições para o padrão de circulação e dinâmica das águas pelas marés, bem como a migração dos poluentes nas baías. De modo que foi identificada uma grande dificuldade que as correntes de marés tem em “limpar” a baía. A maioria das substâncias presentes na água do mar (resíduos orgânicos, efluentes domésticos e industriais, defensivos agrícolas, etc.) encontram-se concentradas na foz do Rio Cubatão (localizado na região

continental da Baía Sul), e mostrando que a dinâmica se dá pelo fluxo das correntes marítimas no sentido da Baía Sul continental para Baía Sul insular, e vice-versa, mais precisamente entre as baías do Cubatão e do Ribeirão da Ilha. Cerutti (1997) também observou que, à medida que as águas do mar retornam pelas correntes de refluxo ou pelo efeito da maré vazante, estas águas carregam consigo sedimentos, lodos, partículas diversas (alguns contaminantes), e bactérias que vão sendo lentamente depositadas no fundo. A deposição é sempre maior nos bolsões ou sacos, uma vez que estes estão ao abrigo das correntes, dos ventos e do mar aberto. O sítio PS apresenta este perfil, pois é caracterizado por uma enseada, águas calmas e com baixa profundidade (no máximo 4m), apresentando pouca ou nenhuma renovação de água, e demonstrando um comportamento lagunar, pela ausência de ventos e correntes marítimas, com exceção das provenientes da região do continente. Essas observações estão em concordância com estudos desenvolvidos por Seibert (2002), em que foram detectados elevados níveis de metais pesados (Cd estando acima dos padrões internacionais permitidos) presentes nas partes moles de *Perna perna* e *Crassostrea gigas* nas coletadas nos cultivos do sítio PS (Ribeirão da Ilha). Por outro lado, os xenobióticos provenientes da foz do Rio Cubatão poderiam ser também transportadas para o extremo da Baía Sul, em regiões com correntes mais fortes e áreas mais abertas, comunicando-se com o Oceano Atlântico, fazendo com que os poluentes se dispersem devido à grande renovação das águas. O sítio referência, por localizar-se no extremo sul da Baía Sul, apresenta esse comportamento frente à dinâmica dos poluentes, e os dados microbiológicos analisados confirmaram esse padrão de circulação. Observações feitas por Prudêncio (2003) e Cerutti (1997), mostraram que, ao contrário da Baía Sul (com exceção de sua parte mais extrema), a Baía Norte é influenciada fortemente pelas correntes de maré, correntes de deriva, fluxo de entrada de águas doces pelo Rio Ratonés e Rio Vermelho. De modo que, por ocasião da preamar, estas águas ingressam na Baía Norte, sob forma de uma corrente salgada e quente, que segue em direção sul, até

encontrar as barreiras naturais descritas pelo estrangulamento da Ponte Hercílio Luz. Isso permite sugerir que as águas marinhas no sítio PN apresentaram, possivelmente, menores índices de CF, vindo ao encontro da hipótese de que houvesse menor concentração de contaminantes, justificada pela presença de correntes de deriva mais fortes que no sítio PS.

Correlação entre elevação dos indicadores microbiológicos (CF e CT) e as alterações associadas às defesas antioxidantes de peixes em regiões poluídas por dejetos domésticos já foi demonstrada anteriormente (OAKES, 2004). Coerentemente, neste estudo esse perfil apresentou-se de forma semelhante para ostras e mexilhões nos sítios PN, caracterizado por menores quantidades CF (NMP/100ml) e menor indução das enzimas de DAS, e os, onde maiores níveis de CF e maior indução das enzimas de DAS foram encontrados em relação ao sítio referência.

O aumento significativo encontrado nos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) em *Crassostrea gigas* no sítio PS permite inferir que estes animais estariam enfrentando um maior desafio oxidativo, uma vez que esses valores se apresentaram sempre elevados em todos os períodos do ano, relativamente ao sítio referência. Os dados de TBARS estão de acordo com os níveis de CF mais elevados de PS relativamente a PN e o sítio referência (vide Anexo C). Essa alteração também corroborou os resultados das análises microbiológicas feitas em oito sítios localizados na Baía Norte neste período (CERUTTI, 1997). Entretanto, a alta concentração de turistas devido à temporada é muito mais intensa na Baía Norte, comparativamente à Baía Sul, principalmente pela existência de uma quantidade maior de praias e residências, e, apesar da estação de tratamento de esgotos local estar atuando desde 1997 (CERUTTI, 1997), provavelmente desencadeia um aumento de efluentes domésticos jogados no mar por residências sem ligações de esgotos. Vários estudos demonstraram que o aumento da lipoperoxidação tecidual em organismos aquáticos está associado a elevadas concentrações de xenobióticos. No molusco do mangue *Mytella guyanensis* (TORRES *et al.*,

2002) observou-se elevados níveis de TBARS nas duas regiões consideradas potencialmente contaminadas por metais-traço, enquanto que no berbigão *Anomalocardia brasiliana* (PEREIRA, 2003), obteve-se esta correlação com os conteúdos de coliformes fecais. Em espécie de molusco de água doce (*Unio tumidus*) transplantada para rios poluídos da França, também mostrou aumento dos níveis de dano oxidativo ocasionado pela exposição aguda de xenobióticos (COSSU *et al.*, 1997). É importante salientar que, independentemente do grau de poluição existente nos dois sítios, a elevação da temperatura possui papel fundamental para os organismos aeróbios termoconformistas alterarem suas respostas fisiológicas e acarretarem uma maior produção de EROS, elevando assim os níveis de TBARS, (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Porém, no presente trabalho mexilhões coletados no sítio sul (PS) apresentaram maior elevação de níveis de TBARS, enquanto que as ostras provenientes do mesmo sítio, mantiveram seus níveis mais elevados no outono. O mexilhão *Perna perna* mostrou correlação entre as concentrações oxigênio dissolvido e os níveis de TBARS, estando relacionados com picos de atividade reprodutiva daquela espécie (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). No presente trabalho, os mexilhões *Perna perna* coletados nos sítios amostrais não foram selecionados conforme seu desenvolvimento gonadal (estádios I, II e III). O período gonadal no estágio III A do ciclo reprodutivo por Magalhães (1998), indica o período prévio de eliminação de gametas, o qual coincide com a alta taxa de metabolismo desses moluscos, e também com a elevação de suas defesas antioxidantes (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Mesmo assim, os resultados do presente trabalho para os níveis de TBARS e as defesas antioxidantes na glândula digestiva de *Perna perna*, sugerem que estes biomarcadores estejam fortemente associados à variação sazonal, e, em consequência, com os aumentos da taxa metabólica devido ao aumento da temperatura, e provável coincidência com picos reprodutivos da espécie entre o metabolismo e variáveis ambientais (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Comparando os níveis sazonais de TBARS de *P. perna* no sítio referência,

verifica-se que estiveram quase dobrados no sítio sul no inverno comparado com a primavera, e este aumento foi similar ao obtido para esta espécie cultivada em sítio de aparente ausência de ação antrópica (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Para o caso de *Crassostrea gigas*, a diferença sazonal nos níveis de TBARS e de GSH ocorreu entre outono e primavera, ao contrário com os conteúdos de GT, que apresentaram elevação no verão. Estas correlações já foram estabelecidas em outras espécies aquáticas termoconformistas, incluindo peixes (WILHELM FILHO *et al.*, 1993; WILHELM FILHO & BOVERIS, 1993; WILHELM FILHO *et al.*, 1997; BAINY *et al.*, 1996; WILHELM FILHO *et al.*, 2001a). Assim, aumentos do metabolismo via aumentos da temperatura associados com fases do ciclo reprodutivo provocariam uma maior geração de EROs e, ao mesmo tempo, indução de alguns antioxidantes enzimáticos, independentemente da presença de outros fatores indutores das DAs, como a presença de xenobiontes. A persistente elevação dos antioxidantes enzimáticos, verificados tanto em *P. perna* como em *C. gigas*, durante os meses mais quentes relativamente ao inverno viriam confirmar este paralelismo e interdependência entre temperatura, metabolismo e níveis das defesas antioxidantes enzimáticas (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Adicionalmente, a fase reprodutiva desta espécie de molusco bivalve poderia vir exarcebar o dano decorrente da exposição de xenobióticos, pelo aumento da sensibilidade à toxicidade (SHEEHAN, 1999). Por outro lado, a inibição do sistema de DA, poderia induzir um estado precário que tornaria o organismo mais suscetível aos agentes tóxicos (COSSU *et al.*, 1997; COSSU *et al.*, 2000). Esses dois tipos de respostas não são opostos e dependem tanto da intensidade e duração do estresse aplicado, quanto da suscetibilidade do organismo exposto ao estresse (COSSU *et al.*, 2000; OAKES *et al.*, 2004).

Com relação aos animais cultivados no sítio localizado no norte da Ilha (PN), não foram observadas elevações tão acentuadas como em PS nos níveis de lipoperoxidação tecidual na glândula digestiva, tanto de *Perna perna* como *Crassostrea gigas*. Este resultado

estaria de acordo com os dados microbiológicos disponíveis (vide Anexo A-C), confirmando que PS estaria antropicamente mais impactado em comparação com PN. Entretanto, *Perna perna* nos períodos mais frios exibiu níveis de TBARS inferiores aos detectados no sítio sul (PS) e aos do sítio referência (PC). Esses resultados são semelhantes aos apresentados em *Anomalocardia brasiliiana* (PEREIRA, 2003) em estudos realizados em cinco sítios da Lagoa da Conceição, onde o sítio com menor índice de coliformes fecais e totais apresentou também níveis mais baixos de TBARS. Níveis inferiores de TBARS com relação a um sítio referência também foram constatados em *Chamaelea gallina* (RODRIGUEZ-ARIZA *et al.*, 2003) e *Crassostrea gigas* (RODRIGUEZ-ARIZA, 1993) na costa espanhola, onde verificou-se menor lipoperoxidação tecidual para sítios poluídos em relação à referência. De acordo com a interpretação dos autores destes trabalhos, isto consistiria numa resposta de organismos saudáveis submetidos à exposição de xenobióticos, aumentando os níveis das defesas antioxidantes para atenuar o estresse oxidativo e os níveis de TBARS. Outra explicação possível a respeito dessa variação, seria pela alteração nos diferentes níveis de ácidos graxos insaturados via efeito de contaminantes (WINSTON *et al.*, 1991).

Interpretação análoga poderia ocorrer em *Crassostrea gigas* no sítio PN, onde os níveis elevados de GSH no período da primavera coincidiram com os níveis de TBARS diminuídos, exibindo uma espécie de efeito compensatório. Para *Perna perna* este efeito compensatório poderia ocorrer no período mais frio também no sítio PN, onde baixos níveis de lipoperoxidação tecidual foram encontrados. Os valores de GSH encontrados na glândula digestiva de *P. perna* no sítio controle, foram muito semelhantes aos encontrados nesta espécie no mesmo sítio de cultivo em trabalho anterior (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Baixos níveis do antioxidante GSH poderiam evidenciar, em curto prazo (exposição aguda; poucas horas ou dias), uma primeira resposta do organismo frente ao aumento das EROs, e indiretamente, à presença de xenobióticos ou por agentes abióticos que possam induzir

estresse oxidativo (COSSU *et al.*, 1997; WILHELM FILHO *et al.*, 1997). Por outro lado, exposições muito prolongadas (crônica; muitos meses, anos), quando o organismo já se encontra com comprometimento no seu sistema antioxidante, igualmente níveis diminuídos de GSH são detectados (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b; TORRES *et al.*, 2002; LIMA, 2004; ZOTTIS *et al.*, 2004). Contrariamente, para situações aonde se tenha exposição em fase intermediária (sub-crônica; alguns dias, poucas semanas), o organismo pode utilizar, como principal estratégia para tentar compensar o consumo inicial de GSH, manter os seus níveis elevados e um alto poder redutor nos tecidos (WILHELM FILHO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2003). É importante frisar que os níveis de GSH e do metabolismo da glutathiona são regulados por várias enzimas, e em consequência, a concentração intracelular de GSH não é constante, e depende do balanço entre a sua síntese, a sua conjugação, a sua oxidação e a redução de GSSG à GSH (PEÑA-LLOPIS *et al.*, 2002). Embora a GSH atue centralmente nos sistemas antioxidantes, somente seus níveis não são suficientes para refletir o estresse oxidativo ao qual está submetido um organismo, porque qualquer alteração nas vias de consumo e regeneração da GSH pode dar início à síntese de novo do tripeptídeo (COSSU *et al.*, 2000).

Um elevado índice de GT presente em sítios poluídos e com maior influência antrópica poderia significar que o organismo está reagindo para atenuar o consequente estresse oxidativo (DI GIULIO, 1992; WILHELM FILHO *et al.*, 1997; TORRES *et al.*, 2002; PEREIRA, 2003). Este tripeptídeo é componente-chave para determinados sistemas antioxidantes enzimáticos, servindo como importante cofator para as enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase (HAND, 1999). Esse comportamento possivelmente ocorreu em Perna perna, durante os períodos da primavera e do inverno, uma vez que o mexilhão no sítio mais impactado (PS) apresentou elevados níveis de GT, e concomitantemente, apresentou atividades mais elevadas de GST. Essa situação também foi

descrita por Pereira (2003) quando realizou estudos com o berbigão, com indução de GST nos sítios mais poluídos na Lagoa da Conceição, juntamente com uma elevação das quantidades de GT.

Quanto à influência da sazonalidade nas defesas antioxidantes, o presente estudo apresentou concordância com resultados provenientes de outro trabalho desenvolvido com *Perna perna* (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b), onde verificou-se que o nível de GT acompanhou os valores de GSH e também de GST, sendo que essa enzima de biotransformação de fase II apresentou-se mais induzida no final de primavera no sítio menos impactado (PN). Esse perfil também se repetiu para o início de outono com o aumento dos níveis de GT, GSH e também de GST para o sítio mais impactado (PS). Comparando as atividades de GST de *P. perna* no sítio referência, verifica-se que na primavera as atividades foram cerca de duas vezes maiores, relativamente ao inverno. Em estudo anterior, esta relação foi inversa, estando a GST mais induzida no inverno do que na primavera. Provavelmente as diferentes épocas de coleta (maio x julho) relativamente ao inverno, foram determinantes para esta diferença. Estudos realizados com mexilhões no hemisfério norte (VIARENGO *et al.*, 1991a; SOLÉ *et al.*, 1995; CANCIO *et al.*, 1999) revelaram resultados semelhantes aos de *Perna perna*, tanto no presente trabalho como em outro anterior (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b) onde o aumento das defesas antioxidantes estaria sendo influenciado pelas variações próprias do metabolismo. Naqueles trabalhos houve a identificação da intensa atividade reprodutiva coincidir com os meses de verão e outono, o mesmo ocorrendo com *Perna perna* no hemisfério sul (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Desse modo, é importante levar em conta o ciclo reprodutivo do mexilhão, particularmente considerando o desenvolvimento gonadal e a atividade da glândula digestiva (SHEEHAN; POWER, 1999). As gônadas de *Perna perna* exibem no outono níveis mais elevados de lipídeos, mobilização de carboidratos e síntese de proteínas, e assim, necessita de um período mais longo para recuperar a atividade

metabólica durante o ciclo reprodutivo em que ocorre a grande eliminação de gametas, aspectos que são refletidos na glândula digestiva (SANTOS, 2001). Assim, a alta taxa metabólica poderia ser o maior responsável pelos elevados níveis de lipoperoxidação tecidual, independente do sítio se encontrar impactado ou não. Dessa forma, as enzimas antioxidantes como a CAT, a GPx e GST também estariam induzidas em função do comportamento sazonal. Por outro lado, para a *Crassostrea gigas*, verificou-se que a GST e a CAT, bem como dos conteúdos de GSH apresentaram-se aumentados no sítio PS em comparação com o sítio referência (PC), durante os meses de outono e verão, sugerindo que o organismo adotou a estratégia de elevar seu sistema de defesa antioxidante para minimizar o efeito do estresse oxidativo e para compensar os níveis elevados de TBARS durante os períodos sazonais referidos. Em *Perna perna*, a maior indução das DAs ocorreu nos sítios experimentais indistintamente durante a primavera e o inverno, e no sítio referência durante os meses mais quentes (primavera). O sítio PN, apesar de menos impactado, também apresentou indução da GST em *Crassostrea gigas* durante a primavera de 2003, acompanhada pela elevação dos níveis de GSH. Apesar de não constar na literatura estudos desenvolvidos com *Crassostrea gigas*, a respeito da influência da sazonalidade nas defesas antioxidantes e no ciclo reprodutivo, sugere-se que as ostras também possam ativar seu sistema metabólico e alterar sazonalmente as respostas antioxidantes, de modo semelhante a *Perna perna*. Especialistas em ostreicultura mostraram que o período de menor reprodução coincide com o final de primavera e verão (MAGALHÃES, 1998). Nesse período a atividade da GST mostrou-se significativamente bem superior em comparação com o período frio do ano (maio e julho). O fato da ostra do Pacífico ser espécie exótica originalmente adaptada a temperaturas mais baixas, poderia contribuir para este desempenho de produtividade durante os meses mais frios. É interessante notar que o sistema antioxidante é aparentemente exigente em termos energéticos e se caracteriza por prioridade funcional e por elevada demanda de síntese

protéica (HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999; WILHELM FILHO *et al.*, 2004). Desta forma, fatores ambientais e fisiológicos como a baixa disponibilidade de oxigênio e o próprio ciclo reprodutivo (WILHELM FILHO *et al.*, 2001a) podem afetar a manifestação das DAs, e diminuir o crescimento e o ganho de peso, caracterizando um balanço funcional interdependente destes fatores (WILHELM FILHO *et al.*, 2004).

A glutathione redutase é uma enzima muito importante para a proteção antioxidante no organismo, uma vez que é responsável em regenerar a glutathione reduzida, a partir da forma oxidada (GSSG), e a baixa atividade desta enzima poderia levar a uma deficiência nos níveis da GSH, e assim, seria esperada uma indução desta enzima em situação de estresse oxidativo. Para *Perna perna* coletados nos sítios PS e PN no período mais frio do ano, constataram-se atividades aumentadas da GR, comparativamente ao sítio referência, sendo que os mexilhões coletados em PN apresentaram níveis inferiores em relação ao PS, concomitantemente com a indução de GST e a elevação nos níveis de glutathione reduzida. Isto sugere que os animais estariam respondendo de forma adequada quanto ao processo de regeneração da glutathione. Paralelo a isso, verificou-se que a glutathione peroxidase apresentou também uma indução relacionada com o processo de detoxificação de hidroperóxidos, uma vez que nesse período os animais coletados no sítio PS apresentaram níveis elevados de TBARS. Trabalho realizado por Torres (2002) com marisco-do-mangue (*Mytella guyanensis*) coletado em sítios com presença de metais pesados e índices mais elevados de coliformes fecais e totais, demonstraram fortes correlações entre as atividades das enzimas GST, GPx e GR, associadas a níveis elevados de TBARS. No presente trabalho, esse efeito ficou evidenciado na indução nas atividades da GR, GST e da CAT em *Perna perna* coletados no sítio PS durante o inverno. Apesar de não ter havido uma diferença estatística entre PS em relação ao sítio referência no inverno, notou-se que houve uma tendência de indução na GST no período frio (final de outono) nas amostras coletadas do sítio PS. Em *Crassostrea gigas*, estas adaptações

sazonais ficaram bem evidenciadas no período de outono para os animais coletados no sítio PS, quando ocorreu indução das atividades da GPx, a CAT, enquanto que a GST apareceu induzida durante os meses mais quentes. A maior indução da GST em ostras coletadas no PS, comparativamente ao sítio referência, permite inferir que o sítio de ostreicultura do Ribeirão da Ilha estaria sofrendo maior impacto comparativamente ao norte (PN). Já em *Perna perna*, a GST esteve induzida no sítio PS nos períodos de primavera e inverno, em relação ao sítio referência (PC), sendo acompanhada também com o aumento nos níveis de GSH, além do aumento nos níveis da GT em mexilhões coletados durante o período do inverno. Para o sítio norte (PN), a GST não apresentou indução, quando comparados PS e o sítio referência, exibindo atividades semelhantes ao sítio referência. A atividade da GR não atingiu a mesma condição da sazonalidade, pois houve indução no período frio do ano, relativamente aos períodos mais quentes. Por outro lado, berbigões da espécie *Anomalocardia brasiliana* coletados em lagoa contaminada por metais pesados (PEREIRA, 2003), não apresentaram mudanças na atividade da GST, enquanto que *M. galloprovincialis*, quando exposto experimentalmente a metais pesados, apresentou decréscimo nas atividades da GST (CAVALETTO *et al.*, 2002), sugerindo uma inibição por estes xenobiontes. Em estudos com *Corbicula fluminea*, demonstrou-se que a GST, bem como a CAT, não apresentam alterações em face da sazonalidade, mostrando serem bons biomarcadores de poluição aquática independentes das variações sazonais (VIDAL *et al.*, 2002). Regoli *et al.* (2002) também sugere as enzimas CAT e GST como bons biomarcadores em diversos organismos marinhos, em vista da sensibilidade de tais enzimas em revelar a perturbação oxidativa desde seu início. Entretanto, a GST parece apresentar-se como um bom biomarcador de estresse oxidativo apenas em organismos específicos (TORRES *et al.*, 2002).

No presente estudo realizado com a glândula digestiva de *Perna perna*, pode-se apontar os níveis de GSH, conjuntamente com as atividades da GST e a GR como bons

biomarcadores de estresse oxidativo associados aos resultados dos sulfetos dos parâmetros físico-químicos e os dados microbiológicos para o sítio PS. Os valores obtidos em PN para a *Crassostrea gigas* sugerem que os organismos ali coletados encontram-se menos expostos ao estresse oxidativo do que em PS, uma vez que apresentaram poucas alterações nas atividades da GST, CAT e GR, comparativamente ao do sítio referência e a PS. Assim sendo, os resultados deste trabalho sugerem que o impacto antrópico causado nos sítios de amostragem estaria afetando o sistema de defesas antioxidantes dos mexilhões estudados os quais provavelmente estão associados a um maior impacto antrópico.

A não alteração dos parâmetros físico-químicos, exceção aos níveis de sulfetos, sugere que os efluentes domésticos estariam associados à alteração das defesas antioxidantes, além do componente sazonal e fases do ciclo reprodutivo. O efeito de marés, correntes marinhas, depósitos de sedimentos e influência dos estuários também merecem estudos mais detalhados a serem conduzidos no futuro, a respeito da dinâmica das águas e o ambiente em que são cultivados ostras e mexilhões.

Medidas são aparentemente necessárias para a reversão do estado ambiental das regiões de maricultura, notadamente a região do Ribeirão da Ilha, enquanto a situação ainda não é crítica, uma vez que a maricultura vem se desenvolvendo há muitos anos nos mesmos locais, sem obedecer a um rodízio no sentido de minimizar a própria contribuição dos organismos de cultivo.

Para uma melhor análise, principalmente no que se refere aos parâmetros ambientais, fazem-se necessários estudos mais detalhados quanto aos níveis de contaminantes, como metais pesados, análises dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água obedecendo a sazonalidade, sendo acompanhados por projetos de biomonitoramento, associados aos biomarcadores de estresse oxidativo de *Perna perna* e *Crassostrea gigas*.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- Os níveis de TBARS da glândula digestiva de *Crassostrea gigas* e de *Perna perna* no sítio localizado no sítio sul (PS) apresentaram-se aumentados nas quatro estações do ano, indicando dano oxidativo nos tecidos dos animais;
- Os níveis de GSH para *Crassostrea gigas* em PS não mostraram alterações, e para *Perna perna* encontraram-se elevados nos dois períodos estudados, sugerindo que houve resposta compensatória, através da diminuição dos níveis de TBARS;
- Houve indução de GST no sítio com maior ação antrópica (PS) em *Crassostrea gigas* durante as quatro estações, mostrando ser um bom biomarcador, pois o mesmo ocorreu para o *Perna perna* para os períodos quentes e frios deste sítio;
- O efeito da sazonalidade, através da alteração da temperatura provavelmente influenciou a taxa metabólica e, conseqüentemente, os níveis das DAs de ambos organismos, independentemente do impacto antrópico existente em ambos os sítios;
- Desta forma, o efeito da sazonalidade fez-se presente no aumento generalizado dos biomarcadores de estresse oxidativo enzimáticos durante os meses mais quentes, tanto na ostra como no mexilhão;
- Em PS as induções das atividades da catalase e glutathiona peroxidase ocorreram tanto para *Crassostrea gigas* como para *Perna perna*, nos períodos mais frios, e foram acompanhados pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), sugerindo que ambos organismos tentaram detoxificar o excesso de hidroperóxidos formados no período;
- Os organismos utilizados neste trabalho, *Crassostrea gigas*, e *Perna perna* revelaram ser bons bioindicadores de poluição aquática relativamente aos biomarcadores de estresse oxidativo.;

- O uso integrado de diferentes biomarcadores como os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, e os biomarcadores de estresse oxidativo, constitui metodologia apropriada para o diagnóstico e monitoramento de ambientes aquáticos;

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de um biomonitoramento nas regiões de ostreicultura e mitilicultura nas Baías Sul e Norte da Ilha de Santa Catarina, incluindo análise de metais pesados nas partes moles dos moluscos, sedimentos e amostras de água, estabelecendo medidas sazonais periódicas de parâmetros físico-químicos e de coliformes fecais, e outros indicadores de qualidade de água;
- Fazer avaliação do conjunto de enzimas de biotransformação de fase I, (Citocromo P450) nas glândulas digestivas de *Crassostrea gigas* e *Perna perna*;
- Realizar avaliação de dano ao DNA através do teste Cometa em hemócitos de ambas espécies de moluscos;
- Realizar análises da indução da enzima acetilcolinesterase em amostras de regiões de uso de agrotóxicos localizadas na bacia hidrográfica do rio Cubatão do Sul, município de Palhoça;
- Aprofundar a análise da influência de estuários e correntes marinhas nas regiões de cultivo e os níveis de oxigênio dissolvido sobre os biomarcadores de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.

APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington: American Public Health Association; American Waters Works Association; Water Pollution Control Federation, 1992.

AKABOSHI, S. Notas sobre o comportamento da ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1795), no litoral do estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, v.06, p.93-104, 1979.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., *et al.* **Biologia Molecular da Célula**, 3. ed. Artes Médicas Porto Alegre, 1997.

ARANA, L.V. **Fundamentos de Aqüicultura**, Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.112p.

BAGCHI, D., STOHS, S. J., DOWNS, B. W., BAGCHI, M., PREUSS, H. G. Cytotoxicity and oxidatile e mechanisms of different formas of chromium. **Toxicology** 180, 5-22, 2002.

BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVALHO, P.S.M. *et al.* Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicol.**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BAIRD,C. **Environmental chemistry**, New York, W.H. Freeman and Company, 1999, 555p.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluentes de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: **A Manual of Biochemical Methods**. 2nd ed. New York: Grune & Stratton, 1975.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v.90, p.105-110, 1984.

BOON, J.P; EVERAARTS, J.M.; HILLEBRAND, M.T.J; et al. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenil mixture clophen A40. **Sci. Total Environ.** v. 114, p.113-133, 1992.

BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.** v.34, p.707-717, 1973.

CANOVA, S.; DEGAN, P.; PETERS, L. D.; LIVINGSTONE, D. R.; VOLTAN, R.; VENIER, P. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. **Mutat. Res.** v.399, p. 17-30, 1998.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484-490, 1992.

CAVALETTO, M. GHEZZI, A., BURLANDO, B. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.131C, p.447-455, 2002.

CERUTTI, R.L. **Contribuição ao conhecimento da poluição doméstica na Baía Norte, área da Grande Florianópolis, SC.** 1997. 129f, Dissertação (Mestrado) – Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHANCE, B.; KAKINUMA, K.; CADENAS, E.; BOVERIS, A., Low level chemiluminescence of intact polymorphonuclear leukocytes, **FEBS Letters**, v.102 (1), June 1st, p. 38-42, 1979.

CLIMERH. Boletim de monitoramento climático, Estado de Santa Catarina. Junho de 2002.

CONAMA. **Resolução n°20.** Conselho Nacional do Meio Ambiente, 18 de junho de 1986.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interact.** v. 72, p.1-56, 1989.

COSSU, C., DOYOTTE, A, JACQUIN, M.C., *et al.* Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater

bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers contamination in field studies. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.38, p.122-131, 1997.

COSTA, S.W. D.A.; GRAMAM, T.; OLIVEIRA, N.; F.M.; ROCZANSKI, M. 1998. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Aquicultura e Pesca**. Florianópolis: Epagri. 62p. (Epagri Boletim Técnico, 1997).

DAME, R.F. **Ecology of Marine Bivalves: An Ecosystem Approach**, Boca Raton: CRC Press Inc., 1996.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G.M. (ed), **Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, 2nd ed. London: Taylor & Francis, 1995.

DOYOTTE, A, COSSU, C., JACQUIN, M.C., *et al.* Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental on field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicol.**, v.39(2), p.93-110, 1997.

EPAGRI, GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, EMPRESA DE AGRICULTURA DE SANTA CATARINA, In: Relatório Anual da Produção de Moluscos em Santa Catarina, EPAGRI, 1998.

EPAGRI, GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, EMPRESA DE AGRICULTURA DE SANTA CATARINA, In: Relatório Anual da Produção de Moluscos em Santa Catarina, EPAGRI, 2002.

FABER, J.L.; KYLE, M.E.; COLEMANN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.** v. 62, p.670-679, 1990.

FAO. 1999. **Examen mundial de la pesca y la acuicultura**: El estado de los recursos pesqueros: Tendencias em la produccion, aprovechamiento y comercio. Disponível em: <<http://www.Fao.org./docrep/w9900s02.htm>>. Acesso em: 19 maio de 2003.

FATMA. GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA, In: Boletim de Balneabilidade das Praias de Florianópolis. 31 de julho de 2004.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v.105, p.114-121, 1984.

FLOHÉ, L., ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol.**, v.105, p.93-104, 1984.

FRIDOVICH, I. & LYNCH, R.E. Autoinactivation of xanthine oxidase : The role of superoxide radical and hydrogen peroxide, **Biochem. Biophys. Acta (BBA) – Enzymol.** v.571 (2), December 7th, p.195-200, 1979.

GLOBO RURAL. O mar virou fazenda, **Revista Globo Rural**, n° 232, Fevereiro, p. 108-111, 2005.

GOLDBERG, E.D. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. **Mar. Poll. Bull.** v. 06, p.111-132, 1975.

GOSLING, E. **The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture.** Developments in Aquaculture and Fisheries Science, v.25, Elsevier Sci. Publ., London, 589p, 1992.

HABIG, W.H.; PABST, M.J; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** v. 249, p.7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HERNANDEZ, A.R. Cultivo de moluscos en America Latina. Bogota: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 1990. In: **Memorias Segunda Reunion Grupo de Trabajo Tecnico.** Isla Chiloe – Chile, 405p.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Base de informações do censo demográfico 2000 : resultados da amostra por municipio.** Rio de Janeiro, 2002. CD-ROM.

IMAI, T. **Aquaculture in shallow sea culture.** A Balkema, Rotterdam. 615p. 1982.

JANERI, I.B.G. **Variação da frequência de hemócitos micronucleados em mexilhão *Perna perna* em função do estágio do ciclo sexual e caracterização de outras anormalidades nucleares.** 1999. 101f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JEFREY, D. W; MADDEN, B. **Bioindicators and Environmental Management**. Academic Press, 432p, 1991.

JORGE, R. A. **Avaliação de impacto ambiental sobre o ecossistema marinho utilizando larvas de mexilhões (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA) como bioindicadores, através de técnicas ecotoxicológicas**. 2003. 505 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

JUNKES, B. S.; NETTO, M. J., VITORINO, S. Evaluation of Bacteriological Quality of Seawaters in the beaches of Santa Catarina State/Brazil employing Fluorogenic Method. In: **Simposio Internazionale Di Ingegneria SANitaria Ambientale - SIDISA** . Taormina – Itália, 23 a 26 de junho de 2004.

KAHLE, J., ZAUKE, G-P. Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Orchomene plebs*: evaluation of toxicokinetic models. **Mar. Envir. Res.** 55, 359-384,2003.

KAPPUS, H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Arch. Toxicol.**, v. 60, p. 144-149, 1987.
KEEN, J.H., HABIG, W. H., JAKOBY, W.B., Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **Biol. Chem.**, v. 251, p. 6183 - 6188, 1974.

KIM, S.J, RODRIGUEZ-LANETTY, M., SUH, J-H., SONG, J-I. Emergent effects of heavy metal pollution at a population level: *Littorina brevicula* a study case. **Mar. Poll. Bull.** (46), 74-80, 2003.

KLAASSEN, C. & ROZMEN. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: Amdur, M. O.; Doull, J. & Klaassen, C. D., eds., Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Sciences of Poisons. (4th. Ed.), p. 50-87, **Pergamon Press**, New York, 1991.

KOOB, M.; DEKANT, W.; Bioactivation of xenobiotic by formation of toxic glutathione conjugates. **Chem. Biol. Interact.** v. 77, p. 107-136, 1991.

LCMM. **Curso sobre cultivo de ostras**. Editora da UFSC. Florianópolis. 112p. 1995.

LIMA, P.L. **Biomarcadores de estresse oxidativo e dano ao DNA em tilápia do Nilo exposta às águas da planta de tratamento de agroindústria de suínos**. 2004, 87f. 1 v.Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

LIPPMAN, R.D. Lipid peroxidation and metabolism in aging. In: Rothstein, M. (Ed.), **Rev. Biol. Res. Aging**, v.1. Alan R. Liss, NY, p. 315-342, 1983.

LIVINGSTONE, D.R.; MARTINEZ, P.G.; MICHEL, X.; et al. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* L., and other molluscs. **Func. Ecol.**, p. 415-424, 1990.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.

MACHADO, M. **Maricultura como base produtiva geradora de emprego e renda: Estudo de caso para o distrito de Ribeirão da Ilha no município de Florianópolis – Santa Catarina – Brasil**. 2002. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAGALHÃES, A.R.M. **Efeito da parasitose por Trematoda bucephalidae na reprodução, composição, bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna***. 1998. 100f. Tese (Doutorado em Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MALINS, D.C., McCAIN, B.B., LINDHAL, J.T. *et al.* Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. **Aquat. Toxicol.**, v.11, p.43-67, 1988.

MANZONI, G. **Ostras: aspectos bioecológicos e técnicas de cultivo**. Itajaí –SC: CGMA, 2001, 30 p.

MARQUES, H.L.A. **Criação comercial de mexilhões: Métodos e etapas, a produção e seus custos, a colheita e a comercialização**. São Paulo: Nobel, 1997. 111 p.

MATKOVICS, B., NOVAK, R., HANH, H.D. *et al.* A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.56B, p.31-34, 1977.

MEAGHER, E.A & FITZGERALD, G.A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. **Free Rad.Biol.Med.** v.26, p. 202-226, 2000.

MONKS, T.J.; ANDERS, M.W.; DEKANT, W.; et al. Glutathione conjugate mediated toxicities. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 106, p. 1-19, 1990.

NISHIO, T., NAKAMORI, J. & MIYAZAKI, K. Survival of *Salmonella typhi* in oysters. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.** v.172B, p. 415-426, 1981.

OAKES, K.D., McMASTER, M.E.; VAN DER KRAAK, G.J. Oxidative stress responses in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. **Aquat. Toxicol.**, v. 67, p. 255-271, 2004.

OSUNA, F.P.; HERNÁNDEZ, F.M & JIMÉNES, M.SOTO. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from discharge zone of submarine of the sewage outfall in Mazatlán Bay (southeast Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors. **Environ. Pollution**, v. 114, p.357-370, 2001.

PANORAMA DA AQUICULTURA. **Quadro da produção de moluscos bivalves no estado de Santa Catarina** In: Panorama da Aquicultura Ltda. p.20, Botafogo, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

PEDROSA, R.C. *et al.* Effect of bleaching *Eucalyptus* pulp effluent from a Brazilian industry on the expression of cytochrome P4501A1 of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Proc. Fifth Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Components**, São Paulo. p.449-453, 1997.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves, **Chemosphere**, p. 214-226, 2002.

PEREIRA, N.C. **Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN, 1791) como bioindicador de poluição aquática.** Dissertação. 93f, 2003 (Mestrado em Engenharia Ambiental), Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PHILLIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S. Strategies of metal sequestration in aquatic organisms. **Mari. Environ. Res.**, v. 28, p. 207-210, 1989.

POLI, C; LITTLEPAGE, J. Desenvolvimento do cultivo de moluscos no estado de Santa Catarina. In: AQUICULTURA BRASIL'98 (1998:Recife). **Anais do Aquicultura Brasil '98**. Recife: v.1, p. 163-182, 1998.

PRAKASH, N. T.; RAO, K.J.S. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. **Mol. & Cel. Biochem.**, v.146(2), p.107-113, 1995.

PROUGH, R.A., BURKE, M.D., MAYER, R.T. Direct Fluorimetric methods for measuring mixed function oxidase activity. **Meth. Enzymol.**, v.58, p. 372-377, 1978.

PRUDÊNCIO, R. S. **Estudo numérico da circulação induzida pela maré na Baía de Florianópolis**. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PUNCHARD, N.A., KELLY F.J., **Free Radicals**, New York: Oxford University Press, 1996.

RADI, A.A.R., MATKOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.90, p.69-72, 1988.

RAISUDDIN, S., SAYEED, I., PANDEY, S. *et al.* Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Scien. Of the Total Env.**, v.309, p.105-115, 2003.

REGOLI, F., FRENZILLI, G., BOCCHETTI, R. *et al.* Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. **Aquatic Toxicol.**, v.68, p.167-178, 2004.

REEVE, G.; MARTIN, D; , PAPPAS, J; THOMPSON, R.E. & GREENE, K.D. An outbreak of shigellosis associated with the consumption of raw oysters. **New Eng. J. Med.**, v.321, p. 224-227, July of 1989.

RIBEIRO, L., TRIBESS, T., TORRES, M.A., *et al.* Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: **Ecotoxicologia** (Evaldo L. G. Espíndola, Clarice M. R. B. Paschoal, Odete Rocha, Maria B. C. Bohrer, Abílio L. O. Neto). São Carlos: Rima., 2000.

RIBEIRO, L. **Defesas antioxidantes da tilápia *Oreochromis niloticus* exposta ao efluente têxtil.**, 53f. 2002. Monografia (Graduação em Biologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROCHE, H., BOGÉ, G. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities *in vitro* of red blood cells of a marine fish. *Dicentrarchus labrax*. **Toxic. in Vitro**, v. 7(5), p.623-629, 1993.

RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; MARTÍNEZ-LARA, E.; PASCUAL, P.; *et al.* Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. **The Scien. Total Environ.** (Suppl.), p.109-116, 1993.

ROCKZANSKI, M.; COSTA, S. W.; BOLL, M. G. & OLIVEIRA NETO, F.M. 2000. A evolução da aquicultura no estado de Santa catarina – Brasil. **Anais do XI Aquicultura Brasil 2000**. Florianópolis, 9p.

SALANSKI, J. **Biological Monitoring of the State of Environment Bioindicators**. Oxford University Press, 82p. 1986.

SANTOS, F. M- Universidade Federal de Santa Catarina. **Influência da temperatura sobre o acúmulo de glicogênio e acompanhamento do ciclo sexual da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) em campo e laboratório, durante o verão**. Dissertação. 38f, 2001. (Mestrado em Engenharia de Aqüicultura), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis.

SCHENKMAN.J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Meth. Enzymol.** v.52, p.83-89, 1978.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Mar. Poll. Bull.**, v. 39, p.48-53, 1999.

SEIBERT, E.L. **Determinação de elementos traço em amostras de águas do mar, sedimento, mexilhões e ostras, da região costeira da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado.**, 2002. 149 f. Tese (Doutorado em Química), Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve moluscs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.123C, p.193-199, 1999.

SIERRA DE LEDO, B.; SORIANO-SIERRA, E. J. & QUEIRÓZ, R. U. Pathways of

metallic elements between structural components of a mangrove ecosystem in the southern region of Brazil. In: SORIANO-SIERRA; DE LEDO, B. (eds). **Ecología e gerenciamento do manguezal do Itacorubi**. NEMAR/CCB/UFSC.SDM/FEPEMA, **22**: p. 329-336, 1989.

SHMITT, J.F. **Monitoramento bacteriológico (colimetria) da água e dos moluscos cultivados na enseada da Armação de Itapocoroy, Penha (SC), Brasil.**, 1998, 40f. Monografia de graduação (Bacharelado em Oceanografia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

SHULKIN, V. M., PRESLEY, B. J., KAVUN, V. In: Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. **Envir. Intern.**, 1040, pp. 1-10, 2003.

SIES, H. **Oxidative stress: Introductory remarks**. In: SIES, H. (ed). *Oxidative Stress*, London: Academic Press, p. 1-8, 1985.

SOLE, M.; PORTE, C.; BIOSCA, X.; MICHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K.; LIVINGSTONE, D. R. & ALBAIGES J. Effects of the “Aegean Sea” oil spill on 89 biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis L.*). **Comp. Biochem. Physiol.** 113 (2), p. 257-265, 1996.

STEGEMAN, J.J; LECH, J.J. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ. Heal. Persp.**, v. 90, p. 101-109, 1991.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, v.27, p.502-522, 1969.

TIRELI, N.C. **Diagnóstico da Qualidade da Água e da Carne das Ostras da espécie *Crassostrea gigas* na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.** (Dissertação no prelo) (Mestrado em Engenharia de Aqüicultura). 70f. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TORRES, M.A., TESTA, C.P., GÁSPARI, C. *et al.* Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar. Poll. Bull.** v. 44 (9), p. 923-932, 2002.

VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. **Aquaculture.** v.94, p.225-243, 1991a.

VIARENGO, A; CANESI, L; PERTICA, M; POLI, G. *et al.* Heavy metal effects on lipidic peroxidation in the tissue of *Mytilus galloprovincialis*. **Comp. Bioch. and Phys.** v.97C, p. 37-42,1991b.

VIDAL, M.-L., BASSÈRES, A., NARBONNE, J.-F., Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller), **Comp. Biochem. Physiol.** v.131C, p.133-151, 2002.

VÍG, E., NEMCSÓK, J. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. **J. Fish Biol.**, v.35, p.23-25, 1989.

VINATEA, L. A. **Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formação de políticas de desenvolvimento sustentável da aquicultura brasileira.** Florianópolis: Editora da UFSC, 1999.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SILBY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology.** London: Taylor&Francis, 321p, 1996.

WALNE, P. R. **Cultivo de moluscos bivalvos In: 50 anos de experiencia en Conwy:** Estructura, fisiologia e reprodución de ostión. Acríbia, Zaragoza – Espanha, p.15-33.1979. 206p.

WASHBURN, P.C., DIGIULIO, R.T. Nitrofurantoin-stimulated superoxide production by channel catfish (*Ictalurus punctatus*) hepatic microsomal and soluble fractions. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.95, p.363-377, 1988.

WILHELM FILHO, D.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish. I. Teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 106C, p.409-413, 1993.

WILHELM FILHO, D.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish. II. Elasmobranchs. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 106C, p.415-418, 1993.

WILHELM FILHO, D., BAPTISTA, I.E., SOARES *et al.* The effect of pulp mill effluent on two fish species. **Proc. Fifth Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Components**, p.612-619, 1997.

WILHELM FILHO, D., TORRES, M.A., MARCON, J. L.; *et al.* Comparative antioxidant defenses in vertebrates – emphasis on fish and mammals. **Trends Comp. Biochem. Physiol.** v.7, p. 33-45, 2000.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A., TRIBESS, T. B., *et al.* Influence of season and pollution on the antioxidants defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34 (6), p. 719-726, 2001a.

WILHELM FILHO, D.; TRIBESS, T. B., GÁSPARI, C. *et al.* Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v. 203, p. 149-158, 2001b.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E. *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, London, v. 213, p. 120-127, 2004.

WINSTON, G.W; LIVINGSTONE, D.R & LIPS, F. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. **Exp. Zool.** v. 255, p.296-308, 1990.

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol.** v.100C, p.173-176, 1991.

WÜGLER, F.E., KRAMERS, P.G.N. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). **Mutagenesis**, v,7(5), p.321-327, 1992.

YU, W., ANDERSON, D.; PHILIPS, B.J.; SHMEZER, P., The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. **Mut. Research/Fund. Mol. Mech. Mut.**, v.307 (1), p.261-271, May, 1994.

ZOFFMANN, C., RODRIGUEZ-VALERA, F., PÉREZ-FILLOL, M., RUIZ-BEVIÁ, F., TORREBLANCA, M. & COLOM, F. Microbial and nutrient pollution along the coasts of Alicante, Spain. **Mar. Poll. Bull.**, v. 20 (2), p. 74-81, 1989.

ZOTTIS, A.D; OLIVEIRA, T.B.; WILHELM FILHO, D. Biomarkers of oxidative stress in mollusks farmed in Santa Catarina Island, Brazil. In: 12TH BIENNIAL MEETING OF THE SOCIETY FOR FREE RADICAL RESEARCH INTERNATIONAL, 2004, Buenos Aires. **Free Radical Biology and Medicine**. Elsevier, 2004. v. 36, p. S155-S155.

ANEXOS.

ANEXO - A



Governo do Estado de Santa Catarina
Fundação do Meio Ambiente - FATMA

BALNEABILIDADE DO LITORAL CATARINENSE

Município.....: FLORIANÓPOLIS

Local: PRAIA DO RIBEIRÃO DA ILHA (PS)

Ponto de Coleta: Ponto 47

Referência: FRENTE À PRAÇA

CLASSIFICAÇÃO DO PONTO CONFORME RESOLUÇÃO CONAMA nº 274/2000:

Próprio: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas anteriores, no mesmo local, houver no máximo 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros.

Impróprio: quando em mais de 20% de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas anteriores, no mesmo local, for superior a 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros ou quando, na última coleta, o resultado for superior a 2000 *Escherichia coli* por 100 mililitros.

Data	Hora	Vento	Maré	Chuvas nas últimas 24h	Temp. °C		E. coli NMP*/100mL	CONDIÇÃO
					Ar	Água		
30/3/2004	14:23:00	Sudeste	Vazante	Ausente	28,30	25,50	40	PRÓPRIA
22/4/2004	07:25:00	Noroeste	Vazante	Ausente	23,50	21,00	170	PRÓPRIA
25/5/2004	08:22:00	Noroeste	Vazante	Ausente	19,50	19,00	1100	PRÓPRIA
24/6/2004	07:39:00	Sudeste	Vazante	Ausente	19,30	18,50	40	PRÓPRIA
27/7/2004	08:18:00	Nordeste	Enchente	Ausente	16,70	16,50	230	PRÓPRIA
26/8/2004	07:37:00	Sudoeste	Enchente	Ausente	16,70	16,00	< 20	PRÓPRIA

PS (Ribeirão da Iha)*

Local coleta	CT	CF	T°C	S‰	Data
Cultivo	2200	1400	20.7	35	14-04-03
Cultivo	170	70	22.7	35	23-04-03
Cultivo	500	300	18.5	35	03-07-03
Cultivo	1300	130	18.0	35	30-07-03
Ambiente	3000	900	21.3	35	14-04-03
Ambiente	300	110	22.7	35	23-04-03
Ambiente	300	300	18.5	35	03-07-03
Ambiente	500	80	18.1	35	30-07-03

Obs: *Resultados das análises de água realizada pelo Laboratório de Saneamento (CEFET), no período de 14 de abril a 30 de julho de 2003.

ANEXO-B



Governo do Estado de Santa Catarina
Fundação do Meio Ambiente - FATMA

BALNEABILIDADE DO LITORAL CATARINENSE

Município.....: FLORIANÓPOLIS

Local: PRAIA DE SAMBAQUI (PN)

Ponto de Coleta: Ponto 14

Referência: FRENTE À SERVIDÃO PARAISO DAS FLORES

CLASSIFICAÇÃO DO PONTO CONFORME RESOLUÇÃO CONAMA n° 274/2000:

Próprio: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas anteriores, no mesmo local, houver no máximo 800 Escherichia coli por 100 mililitros.

Impróprio: quando em mais de 20% de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas anteriores, no mesmo local, for superior a 800 Escherichia coli por 100 mililitros ou quando, na última coleta, o resultado for superior a 2000 Escherichia coli por 100 mililitros.

Data	Hora	Vento	Maré	Chuvas nas últimas 24h	Temp. °C		E. coli NMP*/100mL	CONDIÇÃO
					Ar	Água		
30/3/2004	11:35:00	Sudoeste	Vazante	Fraca	29,00	25,50	230	IMPRÓPRIA
19/4/2004	11:15:00	Norte	Enchente	Moderada	22,50	24,00	130	IMPRÓPRIA
19/5/2004	07:58:00	Sudoeste	Enchente	Ausente	16,80	17,00	800	IMPRÓPRIA
15/6/2004	12:00:00	Sudoeste	Enchente	Ausente	19,50	16,50	40	PRÓPRIA
20/7/2004	08:10:00	Ausente	Vazante	Moderada	14,00	14,00	1700	PRÓPRIA
17/8/2004	11:37:00	Nordeste	Enchente	Ausente	24,00	20,50	20	PRÓPRIA

ANEXO – C

PC (Caieira da Barra do Sul)

Local coleta	CT	CF	T°	S‰	Data
Cultivo	0	0	20.1	35	12-05-03
Cultivo	0	0	18.1	30	02-07-03
Cultivo	4	4	17.3	35	31-07-03
Ambiente	20	0	19.5	35	12-05-03
Ambiente	0	0	18.0	35	02-07-03
Ambiente	240	80	17.3	35	31-07-03

Obs: *Resultados das análises de água realizada pelo Laboratório de Saneamento (CEFET), no período de 14 de abril a 30 de julho de 2003.

1- Amostra de Cultivo - Em um ponto dentro da área do cultivo, localizado na parte central delimitada pelos “long lines”, que são as estruturas utilizadas para esta prática de criação de ostras.

2 - Amostra de Ambiente - Em um ponto localizado nas marisqueiras, que são estruturas de madeiras utilizadas para o cultivo de mexilhões e ostras; ou no local onde ficam ancoradas as balsas utilizadas durante o manejo. Ambos pontos próximos à orla marítima.