

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

KARIM HAHN LÜCHMANN

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM CAMARÃO-ROSA
***Farfantepenaeus paulensis* E *Farfantepenaeus brasiliensis* COLETADOS NA LAGOA**
DA CONCEIÇÃO, ILHA DE SANTA CATARINA/SC – BRASIL

Florianópolis

2005

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

KARIM HAHN LÜCHMANN

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM CAMARÃO-ROSA
Farfantepenaeus paulensis E *Farfantepenaeus brasiliensis* COLETADOS NA LAGOA
DA CONCEIÇÃO, ILHA DE SANTA CATARINA/SC – BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Maria Risoleta Freire Marques

Florianópolis

2005

Lüchmann, Karim Hahn

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis* coletados na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina/SC – Brasil. Florianópolis, 2005.

103 f.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

1. Biomarcadores de contaminação aquática. 2. Camarão-rosa. 3. Lagoa da Conceição I. Título.

Ao meu querido avô, Plínio Francisco Hahn,
pelas inspirações que me trouxe do mar...

AGRADECIMENTOS

À professora, orientadora e amiga Maria Risoleta Freire Marques, pelo interesse e disposição em orientar este trabalho. Minha gratidão pela confiança, estímulo, conselhos, ensinamentos e amizade;

Ao professor e amigo Afonso Celso Dias Bainy, meu co-orientador não oficial, pela ajuda, pelas preciosas sugestões e por servir de exemplo como pesquisador;

Ao professor Paulo Carvalho, por sua solicitude, sendo muitas vezes, um verdadeiro “McGaiver”;

À professora Andrea Santarosa Freire, por estar sempre disposta a ajudar, a realizar parcerias e a ceder bibliografias;

Ao professor Maurício Sedrez, pelo auxílio prestado na escolha do tratamento estatístico dos dados;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado;

À Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Santa Catarina (FUNCITEC), pelo financiamento do trabalho;

Ao IBAMA, pela concessão da Licença para a realização das pescarias na Lagoa da Conceição;

Aos grandes amigos do laboratório: Jacó, Igor, Marília, Rafael, Giuliana, Priscilla, Daniel, Diogo, Francisco, e, especialmente, às leais amigas “Marias”: Taíse Maria (minha irmãzinha e professora de *Western blotting*), Juliana Maria (minha grande orientadora de bancada e amiga “camaroneira”), Débora Maria (a verdadeira “Xuxulina”), Daniela Maria e Isabel Maria (pelas aulas de metalotioneína e pela bibliografia cedida). Aos amigos que passaram pelo Labicai: Ângela, Elianinha, Anna, Ashley, Jairo, Fernanda, Guilherme Toledo e Guilherme Todescato. Agradeço a todos pela ajuda durante a realização deste estudo, e por tornarem o Labicai um ambiente de trabalho maravilhoso;

A Nicolle C. Ferreira, pelo indispensável auxílio prestado na identificação das espécies de camarão;

Ao Jairo P. Barreto, pela parceria e imprescindível ajuda nos experimentos de campo e de laboratório;

Ao meu avô, Plínio F. Hahn, e seus “amigos de pesca”, pelo fornecimento dos camarões utilizados neste trabalho;

Ao meu cunhado “Manão”, Alfredo Nicolau Jorge, pelo apoio logístico;

À minha acupunturista, Maryangela L. Darella, pela ajuda, pelo encorajamento e pelos sábios conselhos;

Ao Marco Schultz, mais que um instrutor de Yoga, um verdadeiro Mestre. Namaste;

Às pessoas que conheci ao longo do curso e me tornei amiga e aos amigos de sempre. Em especial, agradeço a Dani, Cacá, Ju, Gika e Zahra, pelo apoio, paciência e amizade;

À minha família (e a do Fábio), pela paciência e compreensão nos momentos de ausência;

Ao Fábio, meu grande amor, companheiro (e agora noivo!), e praticamente “co-autor” deste estudo. Minha gratidão pela compreensão, paciência, pela presença em todos os momentos e pela imensurável ajuda em todas as etapas do trabalho;

E, finalmente, aos meus pais, Lúcia e Zé Paulo, os melhores do mundo, por tudo! Sou eternamente grata pelo apoio, pelas oportunidades oferecidas e pelo amor incondicional.

RESUMO

A Lagoa da Conceição representa um complexo de elevada importância econômica para a comunidade local, destacando-se a tradicional pesca artesanal dos camarões-rosa, *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Em função do processo acelerado de expansão urbano, aliado a um turismo desordenado, a Lagoa tem testemunhado uma exploração irracional dos seus recursos naturais, com impactos sobre os recursos pesqueiros na região. A utilização de biomarcadores bioquímicos tem sido sugerida como ferramenta na avaliação ecotoxicológica de ambientes aquáticos. Dentre eles, destacam-se a família de isoenzimas de conjugação, glutatona *S*-transferase (GST), e as proteínas metalotioneínas (MT). O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da GST em brânquias e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* e em brânquias de *F. paulensis*, transplantados para três áreas na Lagoa da Conceição: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra (CB) e Costa da Lagoa (CO) no inverno de 2003 e no verão de 2004, onde permaneceram por 2 (t1), 7 (t2) e 15 (t3) dias. Os níveis de MT nestes dois tecidos foram também determinados para a espécie *F. paulensis*. A atividade da GST foi maior no inverno nas brânquias de ambas espécies. Não foi observada variação sazonal na atividade da GST no hepatopâncreas destes animais. Nenhuma diferença significativa na atividade da GST foi observada entre machos e fêmeas. A variação sazonal da atividade da GST nos camarões coletados em diferentes locais da Lagoa da Conceição pode estar relacionada com uma variação sazonal no aporte de contaminantes neste ecossistema. Por outro lado, é possível que tal variação esteja relacionada a parâmetros biológicos intrínsecos da espécie. Além disso, tais variações poderiam influenciar a expressão diferencial das isoformas de GST. Não foi observada diferença estatística nos níveis de metalotioneínas (MT) em brânquias e hepatopâncreas de *F. paulensis*, entre as áreas e os tempos de exposição *in situ*. Por outro lado, os níveis de MT foram maiores no hepatopâncreas, e em fêmeas. Correlação positiva moderada foi observada entre os níveis de MT, peso e comprimento total. As implicações da utilização de GST e MT como biomarcadores em estudos ecotoxicológicos, utilizando estas espécies de peneídeos são discutidas.

Palavras-chave: Glutatona *S*-transferase, GST, metalotioneínas, MT, camarão-rosa, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, Lagoa da Conceição

ABSTRACT

Conceição Lagoon, located on Santa Catarina Island, SC, Brazil, represents a very important economical complex for the local community, especially due to the traditional fishery of the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis* and *Farfantepenaeus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). The Lagoon has been experiencing an irrational use of its natural resource due to a rapid process of urban exploitation and intense tourism. The use of biochemical biomarkers has been suggested as a useful tool for the ecotoxicological evaluation of the aquatic environment. Among these biomarkers, the family of conjugation isozymes, glutathione *S*-transferase (GST), and proteins metallothioneins (MT) can be found. The aim of the present work was to evaluate the activity of GST in the gills and hepatopancreas of *F. brasiliensis*, as well as in the gills of *F. paulensis*, transplanted to three areas within the Lagoon: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra da Lagoa (CB) and Costa da Lagoa (CO), during winter (2003) and summer (2004), where the animals were kept for 2 (t1), 7 (t2) and 15 (t3) days. The levels of MT in both tissues were also determined for *F. paulensis*. For both species, GST activity in gills was higher in winter. On the contrary, no seasonal variation in GST activity was observed in the hepatopancreas. No significant difference in GST activity was observed between males and females. Seasonal variations of GST activity in shrimp caught at Conceição Lagoon could be related to seasonality in pollution input within this ecosystem. On the other hand, it is possible that this variation could be due to the intrinsic expression of GST isoforms. No statistical difference was observed in the levels of GST in the gills and hepatopancreas of *F. paulensis* between areas and periods of exposure *in situ*. On the other hand, the levels of MT were higher in the hepatopancreas and in females. A moderate positive correlation was found in MT levels and total weight and length. Implications of such variations in the use of GST and MT as biomarkers in *F. paulensis* and *F. brasiliensis* in environmental surveys are discussed.

Key-words: Glutathione *S*-transferase, GST, metallothionein, MT, pink-shrimp, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, Conceição Lagoon

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 1

- Figura 1. Mapa da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, indicando o local de coleta dos espécimes (C) e as áreas de exposição *in situ*: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra da Lagoa (CB) e Costa da Lagoa (CO).....32
- Figura 2. Variação sazonal da atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (B), e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* (C). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....37
- Figura 3. Variação sazonal para cada área e entre áreas de uma mesma estação da atividade de glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (B), e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* (C). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....38
- Figura 4. Variação temporal da atividade da glutathione *S*-transferase (GST) nas áreas: CB (A) no inverno em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis*, CA (B) e LAB (C) no verão em brânquias, e LAB (D) no verão em hepatopâncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....39

Figura 5. Atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....40

Figura 6. Atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão.....40

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 2

- Figura 1. Mapa da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, indicando o local de coleta dos espécimes (C) e as áreas de exposição *in situ*: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra da Lagoa (CB) e Costa da Lagoa (CO).....65
- Figura 2. Atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....68
- Figura 3. Atividade da glutathione *S*-transferase (GST) nas áreas (A) e nos tempos (B) de exposição *in situ* em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão.....69
- Figura 4. Níveis de metalotioneínas (MT) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão.* indica diferença significativa ($P < 0,05$).....70
- Figura 5. Níveis de metalotioneínas (MT) nas áreas (A) e nos tempos (B) de exposição *in situ* em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão.....71

Figura 6. Variação dos níveis de metalotioneínas (MT) entre os sexos em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Ponto de Coleta
CA	Canto da Lagoa
CB	Canal da Barra da Lagoa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CO	Costa da Lagoa
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa <i>S</i> -transferase
LAB	Laboratório
MT	Metalotioneínas
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 1.....	viii
LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 2.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	15
II. MANUSCRITO 1.....	24
Resumo.....	26
1. Introdução.....	27
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Coleta dos camarões e procedimento experimental.....	29
2.2. Caracterização das áreas de exposição <i>in situ</i>	30
2.3. Preparação das amostras.....	30
2.4. Análises estatísticas.....	31
3. Resultados.....	33
3.1. <i>Farfantepenaeus paulensis</i>	33
3.2. <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	34
3.3. Comparação da atividade da GST entre <i>F. paulensis</i> e <i>F. brasiliensis</i>	35
4. Discussão.....	41
5. Referências.....	49
III. MANUSCRITO 2.....	56
Resumo.....	58
1. Introdução.....	59
2. Material e Métodos.....	62

2.1. Coleta dos camarões.....	62
2.2. Procedimento experimental.....	62
2.3. Análises bioquímicas.....	63
2.4. Análises estatísticas.....	64
3. Resultados.....	66
4. Discussão.....	73
5. Referências.....	80
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXO	

Valores diários de temperatura e salinidade nas áreas de exposição *in situ* e em laboratório durante o inverno de 2003 e o verão de 2004

I. INTRODUÇÃO

Ao longo de séculos, o homem tem explorado as regiões costeiras com sua variedade de ecossistemas, como praias, baías, manguezais e lagunas, interferindo direta ou indiretamente nos seus recursos naturais. Parte desta interferência está relacionada à importância dos recursos hídricos na economia mundial, os quais, no decorrer da história até os dias atuais, têm desempenhado importantes funções, servindo como via de transporte, reserva de alimentos e fonte de diversos tipos de energia.

Dentre os ecossistemas costeiros, as lagunas caracterizam-se por sua elevada produtividade decorrente dos subsídios do fluxo da água e da abundância de nutrientes (ODUM, 1988). São consideradas criadouros naturais de diversas espécies da fauna marinha, além de representarem um ambiente de grande utilidade para o homem (BARNES, 1980; PORTO FILHO, 1993).

O uso intenso e, por vezes, abusivo dos sistemas lagunares em função das atividades humanas vem acarretando modificações nas suas condições naturais, colocando em risco as características destes ecossistemas. Lançamentos de detritos e efluentes são apenas alguns dos fatores que aceleram o processo de eutrofização das lagunas, destruindo, portanto, toda uma história evolutiva (ODUM, 1988).

Embora o enriquecimento de um ambiente lagunar por matéria orgânica e nutrientes seja um processo natural e gradativo, determinando o seu envelhecimento e posterior extinção, diferentes atividades humanas podem acelerar de forma significativa este processo, reduzindo o tempo de vida útil deste ecossistema (ESTEVES, 1988). Além de acelerar o processo natural de eutrofização, Stegeman et al. (1992) enfatizam que os contaminantes lançados na zona costeira podem provocar uma série de distúrbios metabólicos nos organismos, como infertilidade, baixa nas defesas imunológicas, diminuição no crescimento e

manifestação de patologias que podem levá-los à morte. Isto pode ser refletido em uma redução dos estoques pesqueiros, diminuição da qualidade dos recursos vivos, e alteração da cadeia trófica de uma região. Interferem, ainda, na sustentabilidade e conservação da diversidade da biota como um todo, e na saúde humana através da alimentação de organismos expostos à contaminação.

Deste modo, atividades antropogênicas em seus mais diversos aspectos resultam na inserção de modificações, muitas das quais irreversíveis, nos ambientes aquáticos, entre eles, os lagunares. Isso vem contribuindo para a redução da biodiversidade em níveis inter e intraespecíficos, e modificações dos processos naturais, atuando diretamente na deterioração da qualidade das águas destes ambientes em todo o mundo (DEPLEGE, 1996; FENT, 2003).

Na Ilha de Santa Catarina, um sistema lagunar que vem sendo rapidamente modificado é a Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição. Por apresentar características biogeográficas atrativas devido a sua beleza, a Lagoa testemunha um processo acelerado de expansão urbana que, aliado a um turismo desordenado, têm resultado em uma exploração irracional dos seus recursos naturais (BARBOSA, 2003).

A Lagoa da Conceição configura-se como um sistema que, além da importância ecológica, constitui-se como um patrimônio paisagístico, arqueológico e econômico, bem como um expoente da identidade histórico-cultural do povo litorâneo catarinense (SIERRA DE LEDO, 1990). Destaca-se a tradicional pesca artesanal, enquanto atividade de valor econômico para muitas famílias moradoras da bacia lagunar (BARBOSA, 2003).

Por constituir um sistema semiconfinado, a Lagoa da Conceição desempenha a função de criadouro natural de diversas espécies migratórias de peixes e crustáceos de interesse econômico, além de abrigar uma grande diversidade de espécies que entram em seu corpo lagunar à procura de abrigo e alimento. Dentre os organismos artesanalmente pescados, destacam-se os peixes mugilídeos, *Mugil platamus* e *Mugil curema*, e os camarões peneídeos,

Farfantepenaeus paulensis e *Farfantepenaeus brasiliensis* (BRANCO; VERANI, 1998a, 1998b; SIERRA DE LEDO; GRÉ; SORIANO-SIERRA, 1999; LÜCHMANN et al., 2004).

Segundo CECCA (2001) e Orlando (2001), a Lagoa da Conceição, no corpo lagunar propriamente dito, já apresenta sintomas de deterioração em suas comunidades naturais, registrando um número elevado de coliformes fecais e floração de algas indicadoras de contaminação, principalmente no verão. No sedimento, elevado aporte de matéria orgânica de origem antropogênica (PORTO FILHO, 1993) e metais-traço, oriundos principalmente de tinta antiencrustante e combustível de embarcações (GARCÍA, 1999), são indicativos que não só reforçam a utilização do ambiente lagunar e suas adjacências de forma intensa e irregular, como ainda, evidenciam as conseqüências da insuficiência dos sistemas de esgotamento sanitário e de drenagem pluvial da região. Dentre os problemas derivados de um processo de ocupação, caracterizada pela insuficiência e/ou ausência de infra-estrutura básica, destaca-se a situação do esgotamento sanitário da Lagoa da Conceição. De acordo com Barbosa (2003), o atual sistema de esgoto, inaugurado em 1988, atende aproximadamente 10.000 habitantes da região, o que representa 30% da população atual. O lançamento clandestino de efluentes na drenagem pluvial e o mau funcionamento dos sistemas individuais de fossas e sumidouros domiciliares constituem grande parte do sistema de esgotamento sanitário de aproximadamente 70% da população da Lagoa da Conceição. Assim, a Lagoa serve como o receptáculo final de detergentes, óleos e graxas (BARBOSA, 2003).

Embora estudos de âmbito social e com enfoque em análises físico-químicas da água e do sedimento tenham indicado a ocorrência de impactos ambientais na Lagoa da Conceição (PORTO FILHO, 1993; HAUFF, 1996; GARCÍA, 1999; SIERRA DE LEDO; SORIANO-SIERRA, 1999; ORLANDO, 2001; KUHNEN, 2002; SILVA, 2002; BARBOSA, 2003; FONTES, 2004), são raros aqueles que utilizam organismos como bioindicadores de contaminação na região (CANTOVISKI, 2002; PEREIRA, 2004).

As análises isoladas de contaminantes na água e sedimentos fornecem pouca informação sobre o grau de exposição dos organismos aquáticos, uma vez que as mesmas não evidenciam as conseqüências toxicológicas destas substâncias na biota (FENT, 2003). Deste modo, a utilização de diferentes organismos como sentinelas ou bioindicadores é recomendada, pois apresentam respostas sinalizadoras de presença de contaminantes no meio (LEBLANC; BAIN, 1997), possibilitando a detecção precoce dos efeitos tóxicos das substâncias lançadas no ambiente (NIEWEGLOWSKI; SILVA; KNIE, 1999). Neste contexto, o uso de uma amostra representativa de uma população residente no ambiente potencialmente impactado representa uma estratégia relevante para o monitoramento e avaliação do grau de impacto da área ou região, antes da ocorrência de danos irreversíveis ao ecossistema (LAM; GRAY, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

São características essenciais de um bioindicador: apresentar ampla distribuição geográfica, ser de fácil coleta, estar presente ao longo de todo o ano (REZENDE; LACERDA, 1986), e refletir os níveis de contaminação do ambiente (PHILLIPS; SEGAR, 1986). Deste modo, invertebrados são comumente utilizados em estudos de avaliação da contaminação aquática. Além de constituírem aproximadamente 95% do total das espécies animais, são componentes majoritários de todos os ecossistemas e apresentam abundância populacional. Estas características permitem a utilização destes organismos em estudos ecotoxicológicos, sem afetar de modo significativo sua dinâmica populacional (FOSSI; SAVELLI; CASINI, 1998).

Os camarões-rosa, *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*, constituem um importante recurso alimentar e econômico para pescadores artesanais da Lagoa da Conceição. Embora estudos com camarões estejam basicamente relacionados ao seu crescimento e produção, diversos autores têm demonstrado que estes organismos absorvem e bioacumulam metais-traço em seus tecidos (PÁEZ-OSUNA; RUIZ-FERNÁNDEZ, 1995;

PÁEZ-OSUNA; TRON-MAYEN, 1995; MÉNDEZ et al., 1997; PARK; PRESLEY, 1997; CARBONELL; RAMOS; TARAZONA, 1998; FRANCESCONI; PEDERSEN; HØJRUP, 1998; MARX; BRUNNER, 1998; CULSHAW et al., 2002; POURANG; DENNIS, 2005), além de pesticidas (GALINDO-REYES et al., 1999; GORNI; WEBER, 2004) e bifenilas policlorados (PCBs) (BAZZANTI et al., 1997), sugerindo, deste modo, a utilização destes animais como bioindicadores de contaminação aquática em estudos ecotoxicológicos.

Estudos ecotoxicológicos têm sido uma ferramenta importante, não somente para detectar a presença de contaminantes nas águas, mas também para comprovar os efeitos nocivos dos contaminantes aos organismos aquáticos (BORRELY; TORNIERI; SAMPA, 2000). No entanto, Boudou e Ribeyre (1997) ressaltam que pesquisadores, inevitavelmente, se deparam com problemas relacionados ao reducionismo, tanto espacial como temporal, dos métodos aplicados para avaliação ecotoxicológica. Deste modo, a escolha de um método eficaz e confiável determina a legitimidade dos resultados encontrados.

Os ensaios bioquímicos *in vitro* e *in vivo* são constantemente aplicados em programas de avaliação ecotoxicológica, através do uso de biomarcadores bioquímicos. Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são alterações biológicas de caráter molecular, celular e fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes. Entre os biomarcadores, os bioquímicos ou moleculares detectam a primeira alteração biológica frente à presença de um xenobiótico (WALKER, 1998), o que, juntamente com a utilização de organismos bioindicadores de contaminação, podem tornar o método ecotoxicológico mais confiável.

Diferentes tipos de biomarcadores podem ser utilizados em organismos aquáticos. Dentre os mais utilizados, destaca-se o sistema multienzimático citocromo P450 - ou sistema de oxigenases de função mista (MFO) (NIYOGI et al., 2001). Este sistema desempenha papel central no metabolismo de muitos xenobióticos, catalisando tanto reações de detoxificação

quanto de bioativação (JOSEPHY, 1997; TERAMITSU et al., 2000). No processo de biotransformação dos xenobióticos, uma seqüência metabólica complexa pode ser observada, compreendendo duas fases: na primeira fase (fase I), o composto tóxico geralmente lipofílico é oxidado, originando produtos que, na fase seguinte (fase II) devem ser conjugados com compostos endógenos de baixo peso molecular, resultando em substâncias mais hidrossolúveis e, conseqüentemente, mais fáceis de serem excretadas (HODGSON; LEVI, 1994).

Durante a biotransformação de xenobióticos, são produzidos compostos derivados que podem causar sérios danos às células e/ou biomoléculas. É necessário que estes compostos sejam conjugados a moléculas endógenas, através de reações de conjugação, para aumentar sua hidrossolubilidade e, desta forma, facilitar sua excreção. As enzimas de biotransformação, como a glutathione *S*-transferase (GST), constituem uma família de isoenzimas de conjugação que participam das reações de fase II da biotransformação dos xenobióticos. A GST conjuga compostos eletrofilicos com substratos endógenos, como o tripeptídeo glutathione (GSH), tornando-os mais hidrossolúveis, facilitando, assim, sua excreção (FITZPATRICK et al., 1997).

As GSTs são proteínas diméricas, preferencialmente citosólicas, amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos como bactérias, fungos, insetos, invertebrados e vertebrados aquáticos e mamíferos, onde são mais estudadas (DAUTERMAN, 1994). Em organismos aquáticos, estudos referentes à caracterização da atividade da GST têm sido amplamente realizados em peixes (GADAGBUI; JAMES, 2000; RIOL et al., 2001; NÓVOA-VALIÑAS; PÉREZ-LÓPEZ; MELGAR, 2002), e em moluscos (CHEUNG et al., 2002; ROMÉO et al., 2003; CHEUNG et al., 2004; MANDUZIO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; SILVA et al., 2005). No entanto, pouco é conhecido sobre a GST de crustáceos, sendo que, apenas recentemente, alguns estudos vêm demonstrando o seu

uso potencial nestes organismos (BALDWIN; LEBLANC, 1996; ISHIZUKA et al., 1998; BHAVAN; GERALDINE, 2001; GOWLAND et al., 2002; BEATTIE et al., 2003; PINHO et al., 2003; VINAGRE et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2005). Contudo, existe uma grande lacuna em relação ao estudo deste biomarcador potencial em camarões-rosa, *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*.

A indução da síntese das proteínas metalotioneínas (MT) também está incluída entre os biomarcadores bioquímicos para avaliação do grau de contaminação. Segundo Roesijadi (1992) e Viarengo et al. (1999), MT constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular, solúveis, termo-resistentes, as quais apresentam uma seqüência de aminoácidos característica com alto conteúdo de resíduos de cisteína (Cys). Estas proteínas possuem uma grande afinidade e capacidade de ligação a metais-traço. MT são induzidas por uma série de fatores, incluindo metais-traço, tanto essenciais (Zn, Cu) como não-essenciais (Cd, Hg, Ag), endotoxinas, radiação UV, citocinas, alta tensão de oxigênio, estresse oxidativo, entre outros (HAMER, 1986).

De acordo com Bebianno e Langston (1991), as funções das MT podem estar relacionadas a detoxificação, regulação e estoque dos metais-traço presentes no meio intracelular. A ampla distribuição destas proteínas em organismos procariontes e eucariontes sugere que elas representam um dos sistemas de resposta a estresse mais antigo filogeneticamente (BARSYTE; WHITE; LOVEJOY, 1999).

A primeira ocorrência de MT em invertebrados foi relatada em ostras *Crassostrea virginica* por Casterline e Yip (1975) e desde então, as MT têm sido identificadas em um amplo espectro de organismos (ROESIJADI, 1992). Em relação ao estudo de MT em crustáceos, destacam-se aqueles desenvolvidos com siris *Callinectes sapidus*, *Carcinus maenas*, *Pachygrapsus marmoratus*, *Scylla serrata* (PEDERSEN; LUNDEBYE; DEPLEDGE, 1997; BROUWER; BROUWER, 1998; LEGRAS et al., 2000; LERCH;

AMMER; OLAFSON, 1982; MOUNEYRAC et al., 2001; BROUWER; SYRING; BROUWER, 2002), camarões *Metapenaeopsis crassissima*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus merguensis*, *Penaeus semisulcatus* (MOKSNES; LINDAHL; HAUX, 1995; FRANCESCONI; PEDERSEN; HØJRUP, 1998; POURANG; DENNIS, 2005), lagostas *Homarus americanus*, *Nephrops norvegicus* (CANLI; STAGG; RODGER, 1997; ENGEL; BROUWER; MERCALDO-ALLEN, 2001; CHAVEZ-CROOKER et al., 2003), anfípodas e copépodos (BARKA; PAVILLON; AMIARD, 2001; MARSDEN; RAINBOW; SMITH, 2003). No entanto, nada se conhece sobre MT dos peneídeos *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*.

Embora estudos demonstrem a eficácia da utilização de biomarcadores de contaminação ambiental em organismos aquáticos, existe uma enorme carência de estudos com este enfoque em camarões peneídeos. Assim, considerando que os camarões-rosa constituem um importante recurso alimentar e econômico para a população residente na Lagoa da Conceição e, ainda, a existência de evidências de impactos neste ambiente lagunar, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial uso da GST e MT como biomarcadores de contaminação aquática em brânquias e hepatopâncreas de camarões peneídeos, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, visando sua posterior aplicação em programas de monitoramento *in situ*.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foram elaborados dois artigos (manuscrito 1 e manuscrito 2). O manuscrito 1, referente aos resultados da atividade da GST em camarões-rosa, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, mantidos em três áreas na Lagoa da Conceição e em laboratório, no inverno de 2003 e no verão de 2004, será submetido para publicação no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. O manuscrito 2, relativo aos resultados de GST e MT em brânquias e hepatopâncreas de *F. paulensis* mantidos

em áreas de exposição *in situ* na Lagoa durante o inverno de 2003, será submetido ao periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

II. MANUSCRITO 1

Atividade da glutathione S-transferase (GST) em camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *F. brasiliensis* coletados na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC

Karim Hahn Lüchmann, Afonso Celso Dias Bainy, Maria Risoleta Freire Marques*

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

* Autor para correspondência. Campus universitário, s/n, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil. Tel.: +55 48 331 6561; fax: +55 48 331 9672.

E-mail: risomar@mbox1.ufsc.br (M.R.F. Marques)

Resumo

A atividade da glutathione *S*-transferase (GST) foi avaliada em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* e em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis* coletados na Lagoa da Conceição no inverno e no verão. Os camarões foram transportados para três áreas na Lagoa: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra (CB) e Costa da Lagoa (CO), e um grupo foi mantido em laboratório (LAB), onde permaneceram por 2 (t1), 7 (t2) e 15 (t3) dias. Foram analisados 80 espécimes de *F. paulensis*, 54 no inverno e 26 no verão, e 148 de *F. brasiliensis*, 55 no inverno e 93 no verão. A atividade da GST foi maior no inverno nas brânquias de ambas espécies. Nenhuma variação sazonal foi observada na atividade da GST no hepatopâncreas destes animais. A atividade da GST no hepatopâncreas de *F. brasiliensis* mantidos no LAB foi maior em comparação àqueles de CO no verão. Nenhuma diferença na atividade enzimática foi observada entre machos e fêmeas. Comparando-se a atividade da GST dos exemplares de *F. brasiliensis* coletados em diferentes tempos no verão, em CA os animais apresentaram maior atividade nas brânquias em t1 em relação a t3, enquanto no LAB a atividade das brânquias em t3 foi superior a t1. No hepatopâncreas dos espécimes do LAB a atividade foi maior em t1 em comparação a t2. No inverno, a atividade da GST nas brânquias de *F. paulensis* de CB foi maior em t2 em relação a t1. Ambas espécies apresentaram um padrão semelhante da atividade enzimática em brânquias. A variação sazonal da atividade da GST nos camarões coletados na Lagoa da Conceição pode estar relacionada com uma sazonalidade no aporte de contaminantes neste ecossistema. Por outro lado, é possível que tal variação esteja relacionada a parâmetros biológicos intrínsecos das espécies, que poderiam influenciar a expressão diferencial das isoformas de GST. A utilização desta enzima como biomarcador em estudos *in situ* são discutidas para estas espécies de camarão.

Palavras-chave: Glutathione *S*-transferase; GST; Sazonalidade; Camarão; *Farfantepenaeus paulensis*; *Farfantepenaeus brasiliensis*

1. Introdução

A utilização de biomarcadores bioquímicos tem sido sugerida como ferramenta viável em avaliações ecotoxicológicas de ambientes aquáticos, por indicar o grau de impacto dos contaminantes em uma maneira dose ou tempo-dependente (Mayer et al., 1992). Dentre os biomarcadores mais empregados, destaca-se a família de isoenzimas de conjugação, glutathione *S*-transferase (GST), que atuam nas reações de fase II do processo de biotransformação de xenobióticos, toxinas e compostos endógenos. A GST conjuga compostos eletrofilicos com substratos endógenos, como o tripeptídeo glutathione (GSH), tornando-os mais hidrossolúveis, facilitando, assim, sua excreção (Fitzpatrick et al., 1997).

Organismos expostos a xenobióticos geralmente apresentam indução da atividade da GST, justificando a utilização desta enzima em programas de monitoramento ambiental (Gadagbui e James, 2000; Cheung et al., 2002; Nóvoa-Valiñas et al., 2002; Roméo et al., 2003; Cheung et al., 2004; Manduzio et al., 2004; Silva et al., 2005). No entanto, comparando-se às pesquisas realizadas em moluscos e peixes, pouco é conhecido sobre a GST de crustáceos. Apenas recentemente, alguns estudos têm avaliado esta enzima nestes organismos (Ishizuka et al., 1998; Bhavan e Geraldine, 2001; Gowland et al., 2002; Beattie et al., 2003; Pinho et al., 2003; Vinagre et al., 2003; de Oliveira et al., 2005).

Embora estes trabalhos proponham a utilização da GST como um biomarcador em organismos aquáticos, sua interpretação em estudos de campo pode ser difícil. Segundo Power e Sheehan (1996) e Sheehan e Power (1999), a variação anual e/ou sazonal de fatores ambientais e inerentes ao ciclo fisiológico da espécie podem interferir na atividade do biomarcador escolhido. Deste modo, por exemplo, níveis aumentados da atividade da GST não necessariamente estão relacionados à contaminação do ambiente avaliado, o que dificulta a interpretação dos dados obtidos.

A Lagoa da Conceição, localizada na Ilha de Santa Catarina, SC, encontra-se em um processo acelerado de modificação, como resultado da especulação imobiliária, turismo desordenado, insuficiência e/ou ausência de esgotamento sanitário, e, ainda, exploração irracional de seus recursos naturais (Hauff, 1996; Cecca, 2001; Orlando, 2001; Barbosa, 2003). Segundo Cecca (2001) e Orlando (2001), a Lagoa da Conceição apresenta sintomas de deterioração em suas comunidades naturais, com um número elevado de coliformes fecais e floração de algas indicadoras de contaminação, principalmente no verão. No sedimento, é registrado elevado aporte de matéria orgânica de origem antropogênica (Porto Filho, 1993) e metais-traço, oriundos principalmente de tinta antiencrustante e combustível de embarcações (García, 1999). Este sistema lagunar constitui um importante ponto turístico, de relevância ecológica, paisagística, cultural e econômica para as comunidades locais, que realizam a tradicional pesca artesanal de camarões peneídeos *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis* (Barbosa, 2003; Lüchmann et al., 2004).

O presente trabalho avaliou a atividade da GST em brânquias e hepatopâncreas de camarões, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, mantidos por 15 dias na Lagoa da Conceição em duas estações do ano, inverno de 2003 e verão de 2004. Foram discutidos aspectos relacionados à variação da atividade enzimática entre as espécies, tecidos, estações do ano, áreas e tempos de exposição. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de uso da GST como biomarcador em brânquias e hepatopâncreas destas espécies de camarões peneídeos em programas de monitoramento *in situ*, considerando a influência de fatores abióticos, como a sazonalidade.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta dos camarões e procedimento experimental

Camarões *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, de ambos os sexos, foram coletados com tarrafa (malha 20mm) no mesmo local em uma única noite na Lagoa da Conceição (Figura 1). Após a coleta, os animais foram imediatamente transportados, em aquários portáteis com aeração constante, para gaiolas fixadas em três áreas na Lagoa. As gaiolas foram confeccionadas em PVC, revestidas por poliéster (malha 10mm), apresentando volume de 1,5m³, segundo modelo modificado de Scárdua (1998) e Medvedovsky (2002). As áreas de exposição *in situ* consistiram em: Canto da Lagoa (CA), Costa da Lagoa (CO), e região próxima ao Canal da Barra (CB) e (Figura 1), onde os camarões permaneceram por 15 dias. Um grupo de camarões foi transportado ao laboratório (LAB) nas mesmas condições mencionadas acima e mantido por igual período em um tanque circular com capacidade de 100L, com aeração constante, e troca de água diária. O número amostral inicial de cada grupo de exposição consistiu de 30 espécimes. Os animais mantidos *in situ* e no laboratório foram alimentados diariamente com ração composta por lula (*Loligo plei*) e mexilhão (*Perna perna*) na relação 1:1, aproximadamente 2g de alimento por animal.

As amostragens de aproximadamente 10 espécimes de cada grupo foram realizadas em quatro tempos: zero (dia da coleta dos camarões), 2, 7 e 15 dias, denominados t0, t1, t2 e t3, respectivamente. Ao final de cada tempo, os animais foram classificados por sexo e espécie, pesados e medidos. Brânquias e hepatopâncreas foram excisados para posterior análise da atividade da GST.

Os parâmetros abióticos temperatura e salinidade foram monitorados diariamente nas áreas *in situ* e no tanque mantido em laboratório. O procedimento experimental foi conduzido em duas estações: final do inverno de 2003 e final do verão de 2004.

2.2. Caracterização das áreas de exposição *in situ*

As áreas de exposição *in situ* foram escolhidas em função de suas características: CA localiza-se na região sul da Lagoa e apresenta o maior grau de urbanização da região, menor hidrodinâmica e acelerado processo de eutrofização; CB, na região central, encontra-se próximo ao Canal da Barra da Lagoa, único meio de comunicação da Lagoa com o mar, sendo, portanto, o local de maior hidrodinâmica; e CO localiza-se na região norte, com hidrodinâmica moderada e influência do Rio João Gualberto, principal tributário da Lagoa, além de apresentar a segunda maior comunidade pesqueira da região (De Souza Sierra et al., 1999; Barbosa, 2003).

2.3. Preparação das amostras

Os tecidos amostrados foram pesados e homogeneizados em tampão (Tris-HCl 0,02 M, sacarose 0,25 M, DTT 2 mM; PMSF 0,1 mM, pH 7,60) na proporção 1:4. As brânquias foram centrifugadas a 18,000 x g por 20 minutos a 4°C para obtenção da fração citosólica, e o hepatopâncreas foi centrifugado a 9,000 x g por 22 minutos a 4°C. O sobrenadante da primeira centrifugação do hepatopâncreas foi centrifugado a 38,000 x g por 74 minutos a 4°C, obtendo-se a fração citosólica para posterior análise enzimática.

A atividade da GST foi medida em espectrofotômetro, a 340nm, na fração citosólica de ambos os tecidos de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976), através de ensaio com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2 mM e glutatona reduzida (GSH) 2 mM. A atividade específica da enzima foi expressa em μmol de produto formado por minuto por miligrama de proteína.

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método de Lowry modificado (Peterson, 1977), com soro albumina bovina como padrão.

2.4. Análises estatísticas

Resultados de GST foram comparados estatisticamente em relação aos fatores espécie, estação, área e sexo através de análise de variância Multi-way ANOVA (5%), e o fator tempo através de One-way ANOVA (5%), seguidos do teste de separação de médias Tukey (5%), quando necessário. Para comparação da atividade da GST entre os tecidos foi utilizado o teste *t*-student (5%). O teste de correlação de Spearman (5%) foi empregado para avaliar possíveis associações entre a atividade da GST e os fatores bióticos peso e comprimento, e abióticos salinidade e temperatura. A normalidade e a homogeneidade de variância foram previamente avaliadas (teste de Levene, $\alpha=0,05\%$), e quando necessário os dados sofreram transformação logarítmica (Log x). As análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 5.1.

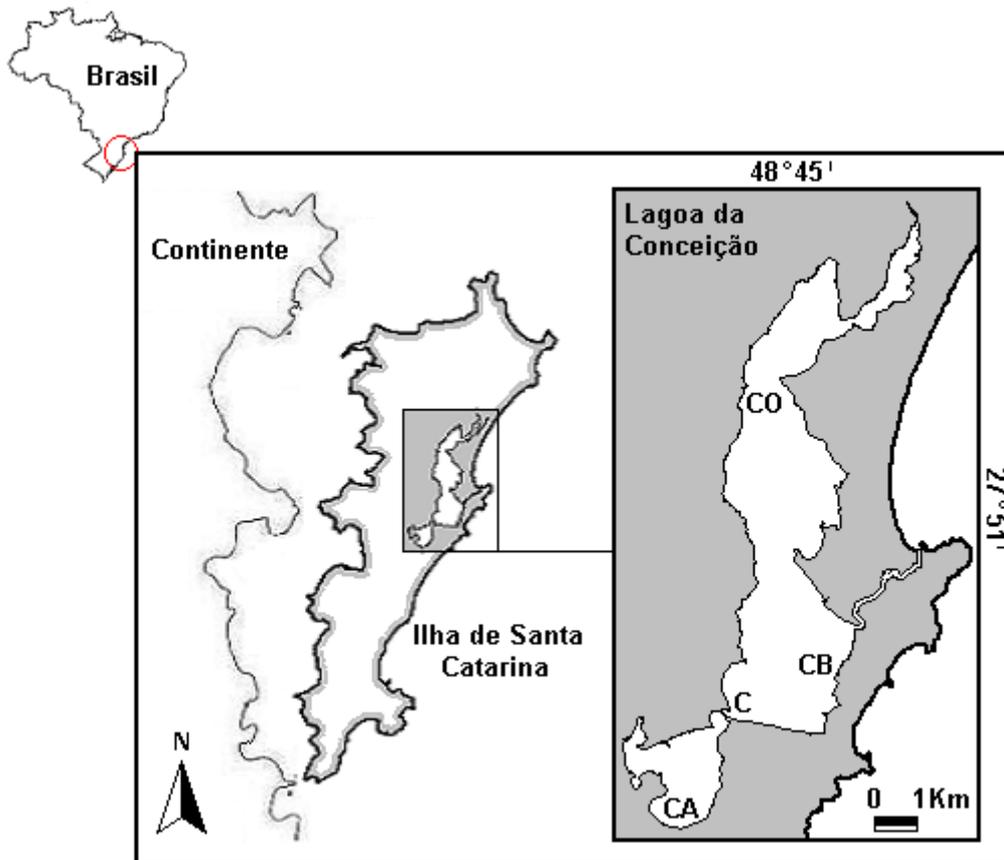


Figura 1. Mapa da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, indicando o local de coleta dos espécimes (C) e as áreas de exposição *in situ*: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra da Lagoa (CB) e Costa da Lagoa (CO).

3. Resultados

Os resultados obtidos da atividade da GST nas duas espécies avaliadas, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, estão apresentados separadamente. A atividade da GST foi avaliada em brânquias em ambas espécies, e no hepatopâncreas somente em *F. brasiliensis*.

3.1. *Farfantepenaeus paulensis*

Foram analisados 80 camarões, 54 coletados no inverno (26 machos e 28 fêmeas) e 26 no verão (14 machos e 12 fêmeas), com peso médio de $15,70 \pm 10,89\text{g}$ e $7,16 \pm 2,25\text{g}$, e comprimento médio de $12,47 \pm 2,92\text{cm}$ e $9,73 \pm 1,29\text{cm}$, respectivamente.

Foi observada uma atividade da GST significativamente maior nos camarões coletados no inverno ($P=0,022$) ($733,42 \pm 686,96 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), em comparação aos coletados no verão ($423,28 \pm 167,58 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) (Figura 2A). Nenhuma variação sazonal na atividade de GST foi observada nos camarões analisados em cada uma das áreas de exposição avaliadas neste trabalho (Figura 3A).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na atividade da GST entre os animais mantidos nas diferentes áreas de exposição (Figura 3A), nem entre os sexos dos espécimes (dados não mostrados). Comparações entre os tempos de exposição demonstraram diferença significativa somente no inverno para CB entre os tempos t1 e t2, com maior atividade da GST nos animais coletados após sete dias de exposição (t2) ($P=0,019$) (Figura 4A). Cabe ressaltar que nesta área não foi possível realizar amostragem no tempo t3, em função de insuficiência do número amostral na gaiola no momento da coleta.

Os dados biológicos peso e comprimento foram comparados entre as estações, detectando a ocorrência de camarões maiores e mais pesados no inverno, em relação àqueles que aqueles coletados no verão. Análises de correlação mostraram que os parâmetros bióticos

(peso e comprimento) e abióticos (salinidade e temperatura, em Anexo) determinados neste estudo não estão relacionados à atividade da GST em brânquias de *F. paulensis* (dados não mostrados).

3.2. *Farfantepenaeus brasiliensis*

Foram analisados 148 camarões, 55 coletados no inverno (28 machos e 27 fêmeas) e 93 no verão (47 machos e 46 fêmeas), com peso médio de $12,49 \pm 6,08\text{g}$ e $6,85 \pm 1,58\text{g}$, e comprimento médio de $17,77 \pm 2,12\text{cm}$ e $9,5 \pm 1,09\text{cm}$, respectivamente.

A atividade da GST nas brânquias mostrou diferença significativa entre as estações, tendo sido observada uma maior atividade nos animais coletados no inverno ($692,61 \pm 394,14$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), em comparação aos coletados no verão ($396,84 \pm 202,69$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($P=0,001$) (Figura 2B). A atividade da GST nas duas estações também foi comparada para cada uma das áreas de exposição. Foi observada diferença significativa em CB, CO e LAB, com maior atividade da GST no inverno em relação ao verão (Figura 3B).

Não foi observada diferença significativa na atividade da GST de brânquias entre os sexos dos animais (dados não mostrados), nem entre as áreas de exposição (Figura 3B). Comparações da atividade da GST entre os tempos de exposição demonstraram diferença somente no verão, com um pico da atividade enzimática nas brânquias dos animais mantidos em CA em t1, e posterior diminuição da atividade da GST ao longo do tempo ($t1 > t3$) ($P=0,005$) (Figura 4B), enquanto no LAB houve um aumento significativo na atividade da GST nas brânquias dos animais mantidos no mesmo período ($t1 < t3$) ($P=0,019$) (Figura 4C).

Os resultados da atividade de GST em hepatopâncreas de *F. brasiliensis* foram comparados entre os sexos dos animais, entre as estações, as áreas e os tempos de exposição. Diferente do observado em brânquias, não foi detectada diferença significativa da atividade da

GST entre as estações do ano neste tecido (Figura 2C). Nenhuma variação sazonal na atividade de GST em hepatopâncreas foi observada nos camarões analisados em cada uma das áreas de exposição avaliadas neste trabalho (Figura 3C). Por outro lado, comparando a atividade da GST entre as áreas de exposição, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre CO e LAB no verão, tendo sido considerada uma maior atividade da GST no LAB ($P=0,026$) (Figura 3C). Análises temporais da atividade de GST para cada área de exposição mostraram diferença somente no grupo mantido no LAB durante o verão ($P=0,033$), com um pico da atividade enzimática em t1, e posterior diminuição significativa ao longo do tempo ($t1>t2$), como mostra a Figura 4D.

Considerando que em exemplares de *F. brasiliensis* foi avaliada a atividade da GST tanto em brânquias, como em hepatopâncreas, avaliou-se comparativamente o padrão de atividade enzimática entre estes tecidos nesta espécie de peneídeo. Independente do sexo dos espécimes, da estação do ano e área de exposição, as brânquias ($511,65 \pm 318,43$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) apresentaram atividade da GST aproximadamente duas vezes maior, em comparação àquela detectada no hepatopâncreas ($217,88 \pm 148,88$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($P=0,001$) (Figura 5).

Assim como o observado para *F. paulensis*, os espécimes de *F. brasiliensis* coletados no inverno exibiram maior tamanho e peso, quando comparados àqueles coletados no verão. Os dados de correlação demonstraram que os parâmetros bióticos e abióticos determinados neste estudo não estão relacionados à atividade da GST em brânquias e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* (dados não mostrados).

3.3. Comparação da atividade da GST entre *F. paulensis* e *F. brasiliensis*

Os resultados mostraram que *F. paulensis* e *F. brasiliensis* apresentam o mesmo padrão de atividade da GST nas brânquias, independente do sexo dos exemplares, da estação

do ano e da área de exposição (Figura 6). Considerando as duas espécies de peneídeos, a atividade da GST nas brânquias dos grupos t0 foi comparada entre as estações verão e inverno. Esta análise comparativa revelou uma maior atividade da GST no inverno em relação ao verão (dados não mostrados).

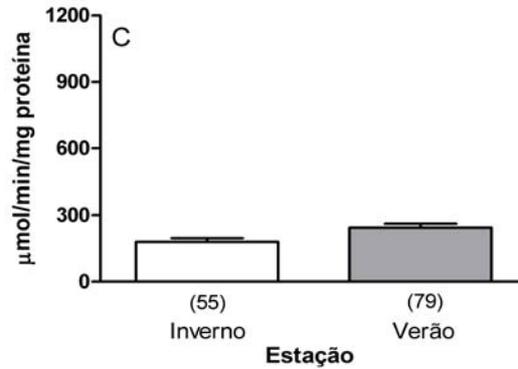


Figura 2. Variação sazonal da atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (B), e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* (C). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão.

* indica diferença significativa ($P < 0,05$).

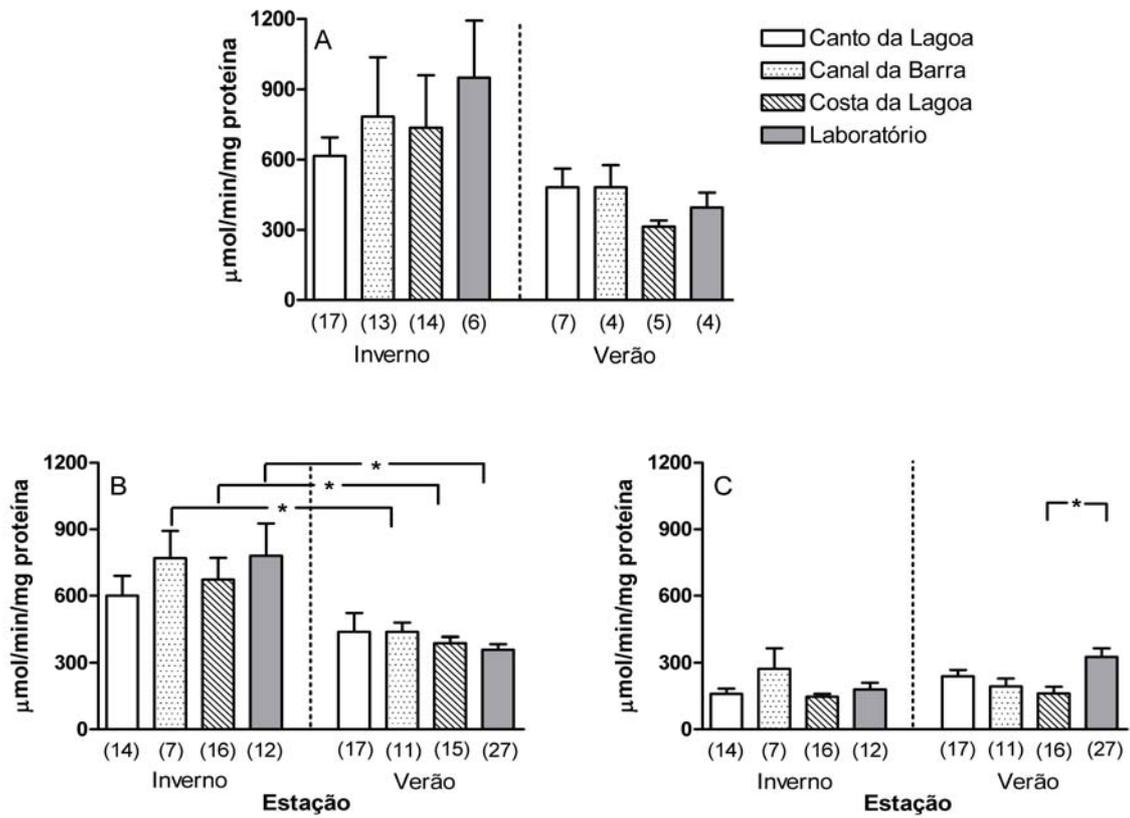


Figura 3. Variação sazonal para cada área e entre áreas de uma mesma estação da atividade de glutiona *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (B), e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* (C). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

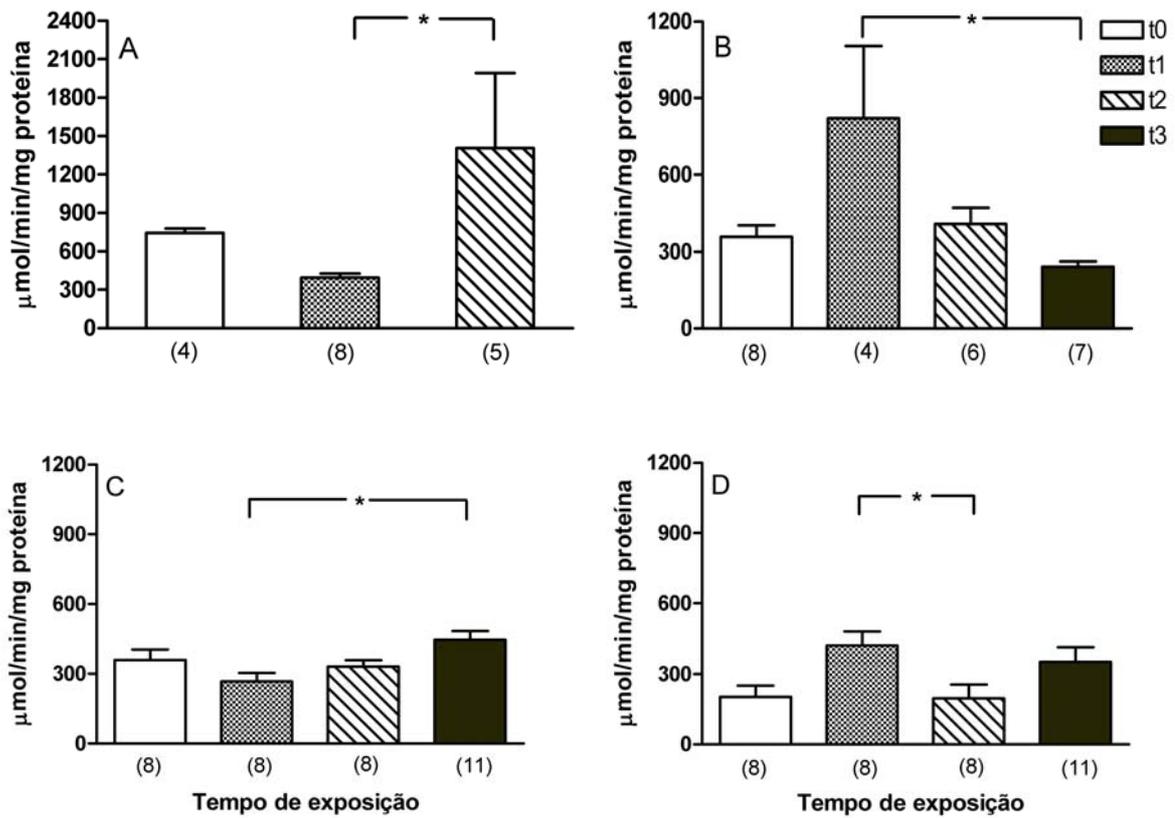


Figura 4. Variação temporal da atividade da glutathione *S*-transferase (GST) nas áreas: CB (A) no inverno em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis*, CA (B) e LAB (C) no verão em brânquias, e LAB (D) no verão em hepatopâncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

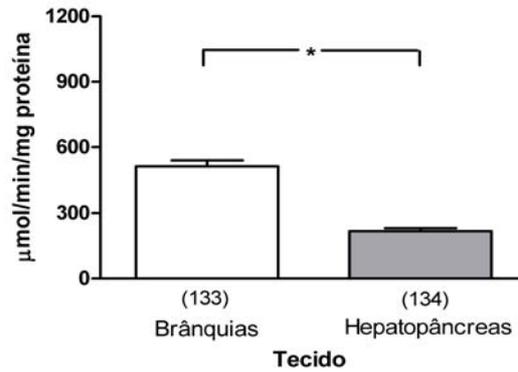


Figura 5. Atividade da glutathiona *S*-transferase (GST) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

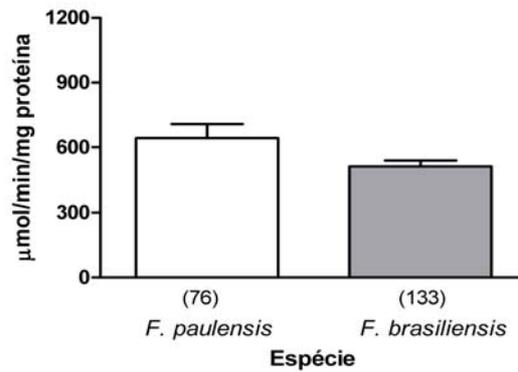


Figura 6. Atividade da glutathiona *S*-transferase (GST) em brânquias de *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão.

4. Discussão

O presente estudo avaliou a atividade da GST em brânquias de camarões *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, e em hepatopâncreas de *F. brasiliensis*, coletados na Lagoa da Conceição (em um único local) e mantidos em três áreas distintas deste ambiente lagunar por 15 dias, bem como em animais mantidos no laboratório por igual período. Este procedimento experimental permitiu a avaliação do perfil da atividade da GST nestas duas espécies de peneídeos, através de comparações entre espécies, tecidos, estações do ano, sexos, áreas e tempos de exposição.

Foi observada variação sazonal na atividade da GST em brânquias para ambas as espécies de peneídeos, independente da área e do tempo de exposição, com maior atividade no inverno em relação ao verão. O mesmo padrão foi detectado em brânquias de mexilhão *Mytilus edulis* (Power e Sheehan, 1996; Manduzio et al., 2004). Segundo Prohaska (1980), além de catalisar reações de conjugação na fase II de biotransformação de xenobióticos, a GST apresenta atividade antioxidante, atuando como glutathione peroxidase (independente de selênio), fornecendo, assim, proteção à célula contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Power e Sheehan (1996) e Manduzio et al. (2004) observaram uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes no inverno, com um aumento da GST em brânquias de mexilhão *M. edulis*. Estes resultados sugerem que a atividade antioxidante da GST contribui para minimizar os danos oxidativos em células das brânquias de mexilhões coletados no inverno, ou, ainda, sugerem que a GST catalisaria a conjugação de derivados da peroxidação lipídica, processo freqüente em crustáceos nesta estação (Dr. José Maria Monserrat, comunicação pessoal). No entanto, no presente trabalho, não foram realizadas análises de enzimas antioxidantes para avaliar se o perfil observado em mexilhões apresenta semelhanças com o das duas espécies de peneídeos utilizadas neste estudo. Cabe salientar, ainda, que os

dados obtidos no presente trabalho são relativos à atividade da GST total dos tecidos analisados, não tendo sido investigadas eventuais variações relacionadas à presença de isoformas desta enzima.

No hepatopâncreas de *F. brasiliensis*, a atividade da GST não apresentou diferenças em relação às estações inverno e verão. Power e Sheehan (1996) e Manduzio et al. (2004) observaram comportamento semelhante em *M. edulis*. No entanto, variações sazonais foram reportadas em outros estudos. Gowland et al. (2002) verificaram maior atividade da GST em hepatopâncreas do siri *Carcinus maenas* no verão. Variação sazonal também foi observada por Geracitano et al. (2004) e Roméo et al. (2003), no poliqueta *Laeonereis acuta* e no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, respectivamente. Nestes estudos, as análises foram realizadas no organismo como um todo, sem discriminação de tecido. Geracitano et al. (2004) observaram maior atividade da GST no verão, enquanto Roméo et al. (2003) detectaram maior atividade desta enzima na primavera.

Os dados de atividade da GST nas brânquias de *F. paulensis* e *F. brasiliensis* sugerem uma possível diferença no aporte de contaminantes na Lagoa entre as duas estações analisadas, independente da área de exposição. Um maior aporte poderia estar ocorrendo no inverno. Por outro lado, não se descarta uma possível inibição da atividade enzimática decorrente de níveis elevados de contaminação no verão, período de grande fluxo de turistas e aumento da população flutuante na região.

Segundo García (1999), de modo geral, as concentrações de metais-traço no sedimento da Lagoa são mais elevadas no verão em relação ao inverno, sendo zinco o metal mais abundante. No entanto, em função de características físico-químicas do sedimento, os metais estão mais biodisponíveis no inverno. Fontes (2004) verificou variação sazonal na distribuição de nutrientes na água da Lagoa e sugeriu maior assimilação pelos produtores primários no verão em comparação ao inverno. Por outro lado, Odebrecht e Caruso Gomes Jr

(1999) não observaram sazonalidade na biomassa de fitoplâncton. Cabe ressaltar que estes autores associam a ocorrência de um processo de eutrofização com a Lagoa da Conceição. Pinho et al. (2003) e Vinagre et al. (2003) demonstraram correlação entre eutrofização, por meio de *boom* de cianobactérias do gênero *Microcystis*, e atividade da GST em caranguejos. Pflugmacher et al. (1998) evidenciam o papel da GST na biotransformação da toxina destas cianobactérias em diferentes organismos aquáticos, como a *Daphnia magna*. Contudo, não há registros na literatura que correlacionem eutrofização e atividade da GST em peneídeos. Assim, a investigação desta possível relação, em conjunto com a análise de outros biomarcadores nestas espécies de peneídeos, poderia contribuir para que se pudesse avaliar de forma mais precisa o grau de contaminação da Lagoa da Conceição.

Diferenças sazonais no conteúdo lipídico dos tecidos analisados poderiam influenciar a bioacumulação de contaminantes orgânicos lipofílicos (Capuzzo et al., 1989), bem como a suscetibilidade à peroxidação lipídica, com possível consequência no perfil de atividade da GST nas diferentes estações. Chapelle (1977) sugere que o hepatopâncreas de siris seja o principal órgão armazenador de energia na forma de lipídeos. No entanto, não se conhece a composição e provável variação sazonal deste tipo de biomolécula em brânquias e hepatopâncreas de *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, sendo conhecida apenas em tecido muscular (Bragagnolo e Rodriguez-Amaya, 2001; Lin et al., 2003; Luzia et al., 2003). Ainda em relação à sazonalidade, possíveis diferenças referentes às isoformas de GST não podem ser totalmente descartadas na interpretação dos resultados obtidos.

De modo geral, organismos aquáticos apresentam variação sazonal natural inerente ao seu metabolismo, cujos ciclos anuais relacionam-se a fatores exógenos, como disponibilidade de alimento e temperatura, e endógenos, como ciclo reprodutivo, muda e ontogenia (Gabbott, 1983; Sheehan e Power, 1999). No presente trabalho, embora tenha sido observada variação

sazonal nos fatores bióticos e abióticos determinados, análises de correlação não mostraram associação entre estes e a atividade da GST.

Análises das médias de peso total de *F. paulensis* e *F. brasiliensis* demonstraram que os camarões utilizados neste estudo classificam-se em sua maioria como sexualmente imaturos (90%), segundo critério adotado por Peixoto et al. (2004). Conforme a classificação proposta por Branco e Verani (1998a, 1998b), os camarões utilizados neste estudo enquadram-se em três categorias: juvenil, pré-adulto e adulto, sendo que os espécimes juvenis apresentaram, comparativamente, frequência ínfima de captura. Comparações estatísticas da atividade da GST entre as fases de vida pré-adulto e adulto não demonstraram diferença entre as mesmas (dados não mostrados). Além disso, análises de correlação revelaram ausência de correlação entre GST e dados biométricos, peso e comprimento.

Comparações sazonais da atividade da GST em brânquias foram conduzidas para cada local e espécie. Foi observada uma maior atividade no inverno em *F. brasiliensis* mantidos em CB, CO e LAB. Este padrão não foi detectado para *F. paulensis*. A mesma tendência foi observada comparando-se a atividade da GST entre os tempos t0 das duas estações, independente da espécie. Assim, poder-se-ia sugerir que os animais coletados no inverno apresentavam um *status* metabólico basal diferente daqueles coletados no verão. Deste modo, a sazonalidade observada para ambas as espécies pode ser decorrente de características sazonais intrínsecas e/ou extrínsecas do momento da coleta inicial em cada estação, e não necessariamente da exposição *in situ*. Embora as causas da variação sazonal da atividade enzimática não tenham sido detectadas, pode-se inferir que há um padrão sazonal tecido-específico para a atividade da GST nos peneídeos analisados. No entanto, esta hipótese deve ser melhor investigada, através da análise conjunta de outros biomarcadores bioquímicos.

Análises comparativas da atividade de GST entre brânquias e hepatopâncreas de *F. brasiliensis* demonstraram que, independente da estação do ano, sexo e área, a atividade foi

maior nas brânquias. Power e Sheehan (1996), Hoarau et al. (2001), Cheung et al. (2002), Roméo et al. (2003), Hoarau et al. (2004), Manduzio et al. (2004), Almeida et al. (2005) observaram esta mesma tendência em *M. edulis*, *Ruditapes decussatus*, *Perna viridis*, *M. galloprovincialis*, *R. decussatus*, *M. edulis* e *P. perna*, respectivamente, e sugerem a importância das brânquias em mecanismos de detoxificação de xenobióticos.

As brânquias desempenham funções essenciais em organismos aquáticos, como respiração, excreção, balanço ácido-base, osmoregulação (Chang, 1992; Soegianto et al., 1999; Lucu e Towle, 2003; Wu e Chen, 2004; Almeida et al., 2005; Bianchini et al., 2005) e alimentação de moluscos filtradores (Power e Sheehan, 1996). Ainda, segundo Wu e Chen (2004), as brânquias apresentam-se constantemente expostas ao meio externo, constituindo o primeiro alvo de exposição a contaminantes. Deste modo, a maior atividade da GST observada nas brânquias de *F. paulensis* e *F. brasiliensis* pode ser decorrente deste fato e, conseqüentemente, do possível papel deste tecido na detoxificação de xenobióticos.

Ainda em relação às possíveis causas da diferença da atividade da GST entre os tecidos, a existência de padrões tecido-específicos relacionados à ocorrência de isoformas de GST nestas espécies de peneídeos poderia justificar os resultados obtidos. Além do mais, variações tecido-específicas na concentração endógena do seu substrato, glutathiona reduzida (GSH), e/ou variação na atividade de outras enzimas relacionadas com este tripeptídeo não podem ser descartadas (Canesi et al., 1999; Zanette, 2003).

A atividade da GST foi comparada entre as áreas de exposição para cada tecido, espécie e estação do ano. Apenas *F. brasiliensis* diferiu entre as áreas, e somente no hepatopâncreas no verão. Animais mantidos no LAB apresentaram maior atividade enzimática do que aqueles de CO. Apesar da disponibilidade de alimento oferecida diariamente, os animais mantidos no LAB não tiveram acesso à alimentação natural de um ambiente silvestre. Segundo Nunes et al. (1997), os macrobentos desempenham um papel

importante na alimentação de peneídeos, e mesmo com adição de ração, os camarões consomem fontes de carbono que ocorrem naturalmente no meio. Assim, considerando que a ração utilizada neste estudo era constituída de mexilhões e lulas, sem adição de vitaminas, minerais e/ou óleos vegetais, aliada à ausência de uma fonte alternativa de alimento do ambiente natural, poder-se-ia sugerir que as necessidades nutricionais dos animais mantidos no LAB não tenham sido supridas de forma completa. A alimentação desbalanceada poderia acarretar uma situação de estresse, o que, por sua vez, poderia promover alterações metabólicas, entre elas uma possível elevação na atividade da GST. Cabe ressaltar que neste grupo de animais foram observados alguns sinais de comportamento agressivo, como por exemplo, a presença de escamas antenais necrosadas e um caso de canibalismo. O fato desta variação da atividade da GST entre os locais ter ocorrido apenas no verão poderia estar relacionada a uma sazonalidade da composição nutricional de mexilhões e lulas utilizados na dieta dos peneídeos.

Outro fator que pode ter contribuído para a ocorrência de uma situação de estresse nos animais mantidos no LAB está relacionado à ausência de sedimento no tanque. Segundo Kenyon et al. (1995), o sedimento favorece o comportamento de enterramento e contribui para diminuir os riscos de sobrevivência decorrentes de predação, canibalismo e/ou competição por recurso alimentar. Adicionalmente, a troca diária da água do tanque e a oxigenação constante constituem situações antinaturais que poderiam agravar a situação de estresse nestes animais. No entanto, a sazonalidade observada não pode ser justificada por estes fatores. Cabe ressaltar que não existem registros na literatura de que estes fatores possam influenciar diretamente a atividade da GST, demonstrando a necessidade de maiores estudos para investigar as possíveis relações entre estresse e este biomarcador.

Considerando cada área de exposição separadamente, a atividade da GST foi comparada entre os tempos para cada espécie, tecido e estação do ano. No inverno, foi

observada uma diferença da atividade da GST entre os tempos apenas para *F. paulensis*. Foi detectada uma atividade enzimática mais elevada nos animais de CB, coletados após sete dias de exposição *in situ* ($t_2 > t_1$). Na gaiola mantida nesta área observou-se elevada densidade de siris e peixes de pequeno porte que poderiam estar competindo com os camarões pelo recurso alimentar. Este fator, em conjunto à intensa luminosidade proporcionada pela transparência da água desta área, acarretaria em uma provável situação de estresse (Iwai, 1978), evidenciada pelos vestígios de canibalismo nos camarões a partir de t_2 . No entanto, estes fatores também foram visualizados no verão, sem que pudessem ser associados a uma alteração no padrão de atividade da GST nesta estação.

No verão, diferenças na atividade da GST entre os tempos de exposição foram observadas apenas para *F. brasiliensis*. Em CA, foi observado um pico da atividade enzimática nas brânquias dos animais em t_1 , e posterior diminuição da atividade da GST no decorrer dos tempos de exposição ($t_1 > t_3$). Esta área caracteriza-se pela menor hidrodinâmica e pelo maior grau de urbanização e eutrofização da Lagoa da Conceição. Deste modo, a diminuição enzimática entre os tempos pode sugerir um efeito inibitório causado por contaminantes ou, ainda e mais provavelmente, um processo adaptativo às novas condições ambientais. Maiores investigações são necessárias para avaliar o padrão temporal observado para a GST nesta área. Por outro lado, uma variação temporal também foi observada para os animais mantidos no LAB, com um aumento da atividade da GST para o mesmo tecido, o que poderia mais uma vez, refletir uma situação de estresse decorrente das condições antinaturais do tanque. Em relação ao hepatopâncreas, a GST variou apenas no LAB e no verão, tendo sido observada uma diminuição no tempo t_2 , sugerindo um possível processo de depuração. No entanto, este último resultado demonstra uma tendência oposta ao apresentado anteriormente, tornando difícil a sua interpretação.

Analisando os dados obtidos para cada uma das áreas avaliadas, observam-se padrões distintos na atividade da GST entre as duas espécies de peneídeos. Esta observação sugere uma possível variação na susceptibilidade a estresse entre as mesmas, quando os fatores tecido, estação e área são analisados separadamente.

Finalmente, foi realizada uma comparação da atividade da GST de brânquias entre as espécies, independente da estação, sexo, área e tempo de exposição. Opondo-se aos resultados apresentados anteriormente, esta análise demonstrou que *F. paulensis* e *F. brasiliensis* apresentam o mesmo padrão de atividade enzimática neste tecido. No entanto, esta comparação não foi realizada para o hepatopâncreas, permanecendo em aberto um possível padrão da atividade da GST deste tecido entre as espécies.

Independente do fator considerado, espécie, estação, sexo, área e tempo de exposição, uma variabilidade interindividual elevada foi observada. Segundo Mayer et al. (1992), diversos parâmetros, como diversidade populacional e variabilidade genética, sinergia de contaminantes e estressores ambientais, e, ainda, efeitos da amostragem e manuseio dos animais, podem contribuir para a variabilidade dos resultados obtidos em estudos de campo.

Tendo em vista os resultados encontrados no presente estudo, podemos sugerir a importância das brânquias no processo de detoxificação de xenobióticos em *F. paulensis* e *F. brasiliensis*. No entanto, deve-se ressaltar que a bioquímica e fisiologia destas espécies são pouco conhecidas, sendo este trabalho uma contribuição preliminar neste sentido. Em função da controvérsia de alguns dados obtidos, a validação da GST como biomarcador de contaminação nestas espécies, deverá ser consolidada através de estudos que investiguem as variações da atividade enzimática de suas isoformas. Sugerimos, ainda, a análise conjunta de outros biomarcadores bioquímicos, a fim de gerar subsídios para o biomonitoramento da qualidade ambiental da Lagoa e de sistemas lagunares análogos, bem como para o melhor conhecimento das respostas bioquímicas destas espécies de peneídeos.

5. Referências

- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21 - 30.
- Barbosa, T.C.P., 2003. *Ecolagoa: um breve documento sobre a ecologia da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição*. Gráfica Agnus, Florianópolis.
- Beattie, K.A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp (*Artemia salina*). *Aquat. Toxicol.* 62, 219 - 226.
- Bhavan, P.S., Geraldine, P., 2001. Biochemical stress responses in tissues of the prawn (*Macrobrachium malcolmsonii*) on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 27 - 41.
- Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2005. Mechanism of acute toxicity in marine invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 72, 67 - 82.
- Bragagnolo, N., Rodriguez-Amaya, D.B., 2001. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *J. Food Comp. Anal.* 14, 359 - 369.
- Branco, J.O., Verani, J.R., 1998a. Aspectos bioecológicos do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis*) Latreille (Natantia, Penaeidae) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 15, 345 - 351.
- Branco, J.O., Verani, J.R., 1998b. Estudo populacional do camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) Pérez-Farfante (Natantia, Penaeidae) na Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 15, 353 - 364.

- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67 - 76.
- Capuzzo, J.M., Farrington, J.W., Rantamaki, P., Clifford, C.H., Lancaster, B.A., Leavitt, D.F., Jia, X., 1989. The relationship between lipid composition and seasonal differences in the distribution of PCBs in (*Mytilus edulis*) L. *Mar. Environ. Res.* 28, 259 - 264.
- CECCA (Centro de Estudos Cultura e Cidadania), 2001. Qualidade de vida e cidadania: a construção de indicadores socioambientais da qualidade de vida em Florianópolis. Cidade Futura, Florianópolis.
- Chang, E.S., 1992. Endocrinology. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, vol. 23. Development in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 53 - 91.
- Chapelle, S., 1977. Lipid composition of tissues of marine crustaceans. *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 241 - 249.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, (*Perna viridis*). *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181 - 191.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, (*Perna viridis*). *Environ. Pollut.* 128, 393 - 403.
- De Oliveira, U.O., Araújo, A.S.R., Belló-Klein, A., da Silva, R.S.M., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab (*Chasmagnathus granulata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 140B, 51 - 57.

- De Souza Sierra, M.M., Soriano-Sierra, E.J., Salim, J.R.S., 1999. Distribuição espacial e temporal dos principais nutrientes e parâmetros hidrológicos da Lagoa da Conceição, SC, Brasil. In: Sierra de Ledo, B., Soriano-Sierra, E.J. (Eds.), O Ecossistema da Lagoa da Conceição. SDM/FEPEMA, Florianópolis, pp. 63 - 88.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of (*Mytilus edulis*) (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*. 2, 51 - 56.
- Fontes, M.L.S., 2004. Breve estudo espaço-temporal e de impacto do feriado de carnaval e de Corpus Christi sobre variáveis ambientais nas águas da Lagoa da Conceição - Florianópolis. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Gabbott, P.A., 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Wilbuk, K.M. (Ed.), *The Mollusca*, vol. 2. Academic Press, Orlando, pp. 165 - 217.
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.* 49, 27 - 37.
- García, A.A., 1999. Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição e do Canal da Barra através de indicadores físico-químicos dos sedimentos de fundo e dos indicadores sócioambientais. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2004. Oxidative stress in (*Laeonereis acuta*) (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* 58, 625 - 630.
- Gowland, B.T.G., Moffat, C.F., Stagg, R.M., Houlihan, D.F., Davies, I.M., 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, (*Carcinus maenas*). *Mar. Environ. Res.* 54, 169 - 177.
- Hauff, S.N., 1996. Diagnóstico ambiental integrado da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição - Florianópolis, SC. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2004. Effect of three xenobiotic compounds on glutathione S-transferase in the clam (*Ruditapes decussatus*). *Aquat. Toxicol.* 68, 87 - 94.
- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2001. Differential induction of glutathione S-transferase in the clam (*Ruditapes decussatus*) exposed to organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 523 - 529.
- Ishizuka, M., Sakyama, T., Iwata, H., Fukushima, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1998. Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione S-transferase in crabs (*Eriocheir japonicus*) from Japanese rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1490 - 1498.
- Iwai, M., 1978. Desenvolvimento larval e pós-larval de (*Penaeus*) (*Melicertus*) (*paulensis*) Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda) e o ciclo de vida dos camarões do gênero (*Penaeus*) da região centro-sul do Brasil. Tese. USP, São Paulo - SP, Brasil.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183 - 6188.
- Kenyon, R.A., Loneragan, N.R., Hughs, J.M., 1995. Habitat type and light affect sheltering behavior of juvenile tiger prawns (*Penaeus esculentus* Haswell) and success rates of their fish predators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192, 87 - 105.
- Lin, Y.R., Huang, S.L., Huang, C.H., 2003. Characteristics of NADH-dependent lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*), and freshwater prawn, (*Macrobrachium rosenbergii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 683 - 687.
- Lüchmann, K.H., Marques, M.R.F., Ferreira, N.C., Daura-Jorge, F.G., Freire A.S., 2004. Seasonal variation of the penaeid shrimps, (*Farfantepenaeus paulensis*) and (*Farfantepenaeus brasiliensis*), in the sub-tropical Conceição Lagoon, Florianópolis, SC,

- Brazil. In: 3rd Brazilian Crustacean Congress and 2004 TCS Summer Meeting. Florianópolis, SC.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. Na⁺ + K⁺ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 195 - 214.
- Luzia, L.A., Sampaio, G.R., Castellucci, C.M.N., Torres, E.A.F.S., 2003. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chem.* 83, 93 - 97.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations of antioxidants defences in blue mussels (*Mytilus edulis*) collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83 - 93.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J, McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 5 - 85.
- Medvedovsky, K.G., 2002. Efeito da densidade de estocagem sobre o crescimento e a sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) (Pérez-Farfante, 1997) cultivado em gaiolas no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS. Monografia. FURG, Rio Grande - RS, Brasil.
- Nóvoa-Valiñas, M.C., Pérez-López, M., Melgar, M.J., 2002. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic glutathione S-transferases from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 131C, 207 - 213.

- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S., 1997. Food ingestion and assimilation by the southern brown shrimp (*Penaeus subtilis*) under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*. 149, 121 -136.
- Odebrecht, C., Caruso Gomes Jr, F., 1999. Hidrografia e matéria particulada em suspensão na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. In: Sierra de Ledo, B., Soriano-Sierra, E.J. (Eds.), *O Ecossistema da Lagoa da Conceição*. SDM/FEPEMA, Florianópolis, pp. 35 - 62.
- Orlando, A.M., 2001. O comitê de gerenciamento da Lagoa da Conceição: gestão de recursos hídricos ou gestão costeira? Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Peixoto, S., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., D’Incao, F., Krummenauer, D., Milach, A.M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive (*Farfantepenaeus paulensis*) broodstock. *Aquaculture*. 238, 173 - 182.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem*. 83, 346 - 356.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta*. 1425, 527-533.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab (*Chasmagnathus granulatus*) (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 459 - 468.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 114C, 99 - 103.

- Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 611, 87 - 98.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, 369 - 378.
- Scárdua, M.P., 1998. Utilização de alimentadores do tipo bandeja no cultivo de camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) em tanques rede. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 123C, 193 - 199.
- Silva, A.Z., Zanette, J., Ferreira, J.F., Guzenski, J., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2005. Effects of salinity on biomarker responses in (*Crassostrea rhizophorae*) (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Safe. In press.*
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp (*Penaeus japonicus*). *Aquat. Living Resour.* 12, 57 - 70.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab (*Chasmagnathus granulatus*) (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 67 - 75.
- Wu, J.P., Chen, H.C., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere.* 57, 1591 - 1598.
- Zanette, J., 2003. Influência da salinidade sobre biomarcadores de contaminação aquática em ostras-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) (Guilding 1828) expostas a diferentes concentrações de óleo diesel. Monografia. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

III. MANUSCRITO 2

Atividade da glutathione *S*-transferase e níveis de metalotioneínas em brânquias e hepatopâncreas de camarões, *Farfantepenaeus paulensis*, mantidos na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC

Karim Hahn Lüchmann, Afonso Celso Dias Bainy, Maria Risoleta Freire Marques*

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

* Autor para correspondência. Campus universitário, s/n, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil. Tel.: +55 48 331 6561; fax: +55 48 331 9672.

E-mail: risomar@mbox1.ufsc.br (M.R.F. Marques)

Resumo

Pouca atenção tem sido dada aos efeitos de contaminantes nas respostas bioquímicas de camarões peneídeos, como *Farfantepenaeus paulensis*. Neste estudo foram avaliados a atividade da enzima glutationa *S*-transferase (GST) e os níveis de metalotioneínas (MT) em brânquias e hepatopâncreas de camarões coletados na Lagoa da Conceição no inverno de 2003, e mantidos em três áreas, Canto da Lagoa, Canal da Barra e Costa da Lagoa, onde permaneceram por diferentes tempos (2, 7 e 15 dias). Não foi observada diferença entre as áreas e os tempos de exposição para ambos os biomarcadores analisados. A atividade da GST foi maior nas brânquias em comparação com o hepatopâncreas, independente do sexo, área e tempo de exposição. Por outro lado, os níveis de MT foram maiores no hepatopâncreas, e em fêmeas. Correlação positiva moderada foi observada entre concentração de MT, peso e comprimento total. As implicações da utilização de GST e MT como biomarcadores em estudos ecotoxicológicos utilizando esta espécie de camarão são discutidas.

Palavras-chave: Glutationa *S*-transferase; GST; Metalotioneínas; MT; Camarão-rosa; *Farfantepenaeus paulensis*

1. Introdução

O camarão-rosa, *Farfantepenaeus paulensis*, distribui-se do sul da Bahia, Brasil, até a Argentina, estendendo-se ao longo da plataforma continental do Brasil e do Uruguai. É uma espécie migratória, cujo ciclo de vida compreende a desova no oceano, com posterior migração para estuários, onde permanece em fase de crescimento (entre 4 e 10 meses, segundo D’Incao, 1991), migrando, posteriormente, para o oceano, onde reinicia o ciclo (Iwai, 1978). Seu comportamento migratório implica na provável exposição a contaminantes de origem antropogênica em estuários e outros ambientes costeiros. Nestes ecossistemas, o camarão-rosa apresenta hábito bentônico (Iwai, 1978), favorecendo o seu contato com os contaminantes presentes nos sedimentos.

Diversos estudos têm demonstrado que camarões bioacumulam metais (Páez-Osuna e Ruiz-Fernández, 1995; Páez-Osuna e Tron-Mayen, 1995; Méndez et al., 1997; Carbonell et al., 1998; Francesconi et al., 1998; Pourang e Dennis, 2005) e pesticidas (Galindo-Reyes et al., 1999; Gorni e Weber, 2004), o que sugere a utilização destes organismos como bioindicadores de contaminação aquática em estudos ecotoxicológicos.

Biomarcadores bioquímicos, como glutathione *S*-transferase (GST) e metalotioneínas (MT), são comumente empregados em programas de monitoramento ambiental. A GST constitui um grupo de isoenzimas que catalisam a conjugação de moléculas orgânicas com centro eletrofílico ao grupo tiol do tripeptídeo endógeno glutathione, tornando-as mais hidrossolúveis, facilitando, assim, sua excreção (Fitzpatrick et al., 1997). Organismos expostos a xenobióticos geralmente apresentam atividade elevada da GST, justificando a utilização desta enzima em programas de monitoramento ambiental. Pesquisas recentes têm demonstrado o seu emprego potencial em crustáceos (Ishizuka et al., 1998; Bhavan e

Geraldine, 2001; Gowland et al., 2002; Beattie et al., 2003; Pinho et al., 2003; Vinagre et al., 2003; de Oliveira et al., 2005).

As MT compreendem uma família de proteínas de baixo peso molecular, solúveis, termo-resistentes, com alto conteúdo de resíduos de cisteína, o que lhes confere alta afinidade por metais-traço (Roesijadi, 1992). Estas proteínas atuam na homeostase de metais essenciais, como Zn e Cu, na detoxificação de metais não essenciais, como Cd (Lange et al., 2002), na proteção da célula contra danos oxidativos (Coyle et al., 2002), e na distribuição de metais entre os tecidos (Pourang e Dennis, 2005). Ainda, em crustáceos, as MT armazenam metais essenciais indispensáveis na síntese de apoenzimas, como hemocianina e anidrase carbônica (Brouwer et al., 1986; Engel e Brouwer, 1987). A utilização das MT como biomarcador de contaminação por metais-traço em organismos aquáticos tem sido proposta e investigada por diversos autores (Stegeman et al., 1992), principalmente em poliquetas (Geracitano et al., 2004a; Geracitano et al., 2004b), moluscos (Casterline e Yip, 1975; Roesijadi e Robinson, 1994; Viarengo et al., 1997; Isani et al., 2000; Dragun et al., 2004; Müller, 2004), crustáceos (Canli et al., 1997; Pedersen et al., 1997; Francesconi et al., 1998; Legras et al., 2000; Mouneyrac et al., 2001; Pourang e Dennis, 2005), e peixes (Gedamu e Zafarullah, 1993; George e Olsson, 1994; Lange et al., 2002).

A Lagoa da Conceição, localizada na Ilha de Santa Catarina, SC, tem experimentado um processo acelerado de modificação, como resultado de ações antropogênicas (Hauff, 1996; CECCA, 2001; Orlando, 2001; Barbosa, 2003). Sendo este sistema lagunar um dos principais pontos turísticos da cidade, com elevada importância ecológica, paisagística, cultural e econômica para as comunidades tradicionais locais, as quais realizam a tradicional pesca artesanal de camarões peneídeos, como *Farfantepenaeus paulensis* (Barbosa, 2003), faz-se necessário o delineamento de um programa eficaz para o monitoramento ambiental da região.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível utilização da atividade da GST e dos níveis das MT como biomarcadores nas brânquias e hepatopâncreas de camarões peneídeos, *F. paulensis*, na Lagoa da Conceição.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta dos camarões

Camarões *F. paulensis*, de ambos os sexos, foram coletados com tarrafa (malha 20mm) em uma única noite no inverno de 2003. Todos os espécimes foram coletados em um mesmo local na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC (Figura 1). Indivíduos pré-adultos e adultos, segundo critério adotado por Branco e Verani (1998), foram utilizados neste estudo.

2.2. Procedimento experimental

Imediatamente após a coleta, os camarões foram transportados, em aquários portáteis com aeração, para gaiolas fixadas em três áreas de exposição *in situ* na Lagoa da Conceição: Canto da Lagoa (CA), Costa da Lagoa (CO) e região próxima ao Canal da Barra da Lagoa (CB) (Figura 1), onde foram mantidos por diferentes intervalos de tempo. As gaiolas foram confeccionadas em PVC, revestidas por poliéster (malha 10mm), apresentando volume de 1,5m³, segundo modelo modificado de Scárdua (1998) e Medvedovsky (2002). Durante o período de exposição, os animais foram alimentados diariamente com ração composta por lula (*Loligo plei*) e mexilhão (*Perna perna*) (na relação 1:1; aproximadamente 2g de alimento por animal). Os parâmetros abióticos salinidade e temperatura foram monitorados uma vez ao dia em cada uma das áreas de exposição.

As áreas de exposição *in situ* foram escolhidas em função de suas características: CA localiza-se na região sul da Lagoa e apresenta o maior grau de urbanização da região, menor hidrodinâmica e nível elevado de eutrofização; CB encontra-se próxima ao Canal da Barra da Lagoa, único meio de comunicação da Lagoa com o mar, sendo, portanto, o local com maior hidrodinâmica; e CO localiza-se na região norte, apresentando hidrodinâmica moderada e

influência do Rio João Gualberto, principal fonte de água doce desta região, além de apresentar a segunda maior comunidade pesqueira da Lagoa da Conceição (De Souza Sierra et al., 1999; Barbosa, 2003).

Os animais foram mantidos na área CA por 15 dias, com amostragens no 2º, 7º e 15º dia de exposição, denominados t1, t2 e t3, respectivamente. Em CB, os camarões permaneceram *in situ* apenas por 2 dias (t1), enquanto aqueles mantidos em CO foram amostrados no 2º e 15º dias, t1 e t3, respectivamente.

Ao final de cada tempo de exposição, os animais foram sexados, pesados e medidos. As brânquias e o hepatopâncreas foram excisados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para análise posterior da atividade da GST total e determinação dos níveis de MT de cada tecido.

2.3. Análises bioquímicas

Os tecidos amostrados foram pesados e homogeneizados em tampão (Tris-HCl 0,02M, sacarose 0,25 M, DTT 2 mM; PMSF 0,1 mM, pH 7,60) na proporção 1:4. As brânquias foram centrifugadas a 18,000 x g por 20 minutos a 4°C para obtenção da fração citosólica, enquanto o hepatopâncreas foi centrifugado a 9,000 x g por 22 minutos a 4°C. O sobrenadante da primeira centrifugação do hepatopâncreas foi centrifugado a 38,000 x g por 74 minutos a 4°C, a fim de obter a fração citosólica para posterior análise enzimática.

A atividade da GST foi determinada na fração citosólica de ambos os tecidos, através da conjugação de glutationa (GSH) 2 mM com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2 mM, segundo o método descrito por Keen, Habig e Jacoby (1976). A atividade específica da enzima foi expressa em μmol de produto formado por minuto por miligrama de proteína.

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método de Lowry modificado (Peterson, 1977), com soro albumina bovina como padrão.

A concentração de MT foi medida de acordo com a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997). Amostras de brânquias e hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, contendo sacarose 500 mM, PMSF 0,5 mM e β -mercaptoetanol 0,01% (pH 8,60) na proporção 1:5. Os níveis de MT utilizando 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) foram estimados em espectrofotômetro, a 412 nm, a partir de curva padrão de GSH.

2.4. Análises estatísticas

Dados de GST e MT foram comparados estatisticamente em relação aos fatores área, tecido e sexo através de análise de variância Multi-way ANOVA (5%), e o fator tempo através de One-way ANOVA (5%), seguidos do teste de separação de médias Tukey (5%), quando necessário. O teste de correlação de Spearman (5%) foi empregado para avaliar possíveis associações entre os biomarcadores e fatores bióticos (peso e comprimento), e abióticos (temperatura e salinidade). A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram previamente avaliadas (teste de Levene, $\alpha=0,05\%$), e quando necessário os dados sofreram transformação logarítmica (Log x). As análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 5.1.

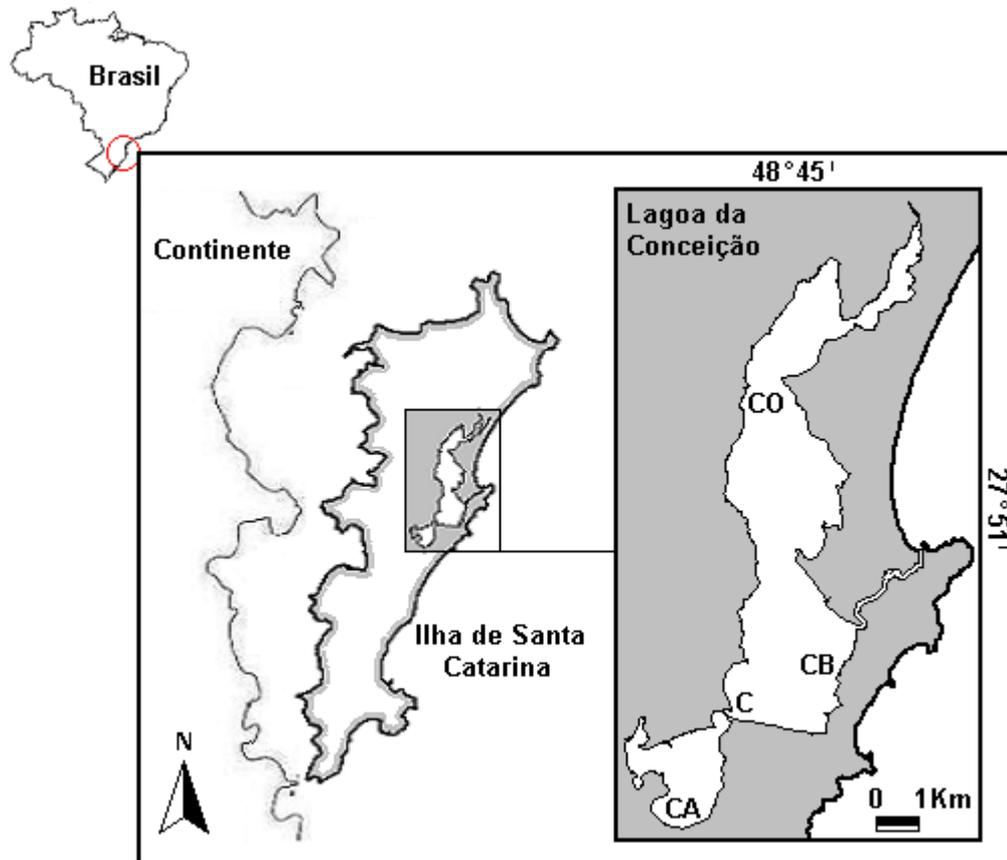


Figura 1. Mapa da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, indicando o local de coleta dos espécimes (C) e as áreas de exposição *in situ*: Canto da Lagoa (CA), Canal da Barra da Lagoa (CB) e Costa da Lagoa (CO).

3. Resultados

Foram analisados 29 camarões *F. paulensis*, 18 fêmeas e 11 machos, com peso médio de $25,07 \pm 11,60$ g e $14,52 \pm 4,62$ g, respectivamente, e comprimento médio de $14,64 \pm 2,97$ cm e $12,98 \pm 1,73$ cm. Destes animais, 11,5% consistiram em organismos pré-adultos e 88,5% adultos, segundo critério adotado por Branco e Verani (1998).

A atividade da GST foi maior nas brânquias ($600,01 \pm 624,82$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) quando comparada com o hepatopâncreas ($123,64 \pm 69,91$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($P=0,001$), independente do sexo, da área e do tempo de exposição (Figura 2). Considerando cada tecido separadamente, não foi detectada diferença na atividade enzimática entre os sexos ($P>0,05$) (dados não mostrados).

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na atividade da GST entre as áreas (Figura 3A), nem entre os tempos de exposição (Figura 3B). A atividade da GST foi comparada entre os tempos de exposição para cada área e tecido, demonstrando ausência de diferença estatística ($P>0,05$) (dados não mostrados). Análises de correlação mostraram que os parâmetros bióticos e abióticos (temperatura: $21,5 \pm 0,56^\circ\text{C}$; salinidade: $29,0 \pm 2,3\%$) analisados não estão relacionados à atividade da enzima GST em brânquias e em hepatopâncreas de *F. paulensis*.

Os níveis de MT foram comparados entre os tecidos, demonstrando níveis mais elevados no hepatopâncreas ($1,45 \pm 1,20$ $\mu\text{mol SH}/\text{g}$ tecido) em comparação àqueles determinados nas brânquias ($0,23 \pm 0,16$ $\mu\text{mol SH}/\text{g}$ tecido) ($P=0,001$), independente da área e tempo de exposição (Figura 4).

Considerando cada tecido separadamente, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) nos níveis de MT entre as áreas (Figura 5A), nem entre os tempos de exposição

(Figura 5B). Os níveis de MT não diferiram estatisticamente entre os tempos de exposição para cada área e tecido ($P>0,05$) (dados não mostrados).

Foi detectada diferença significativa nos níveis de MT entre os sexos somente para amostras de hepatopâncreas, com maior concentração de MT em fêmeas ($1,84 \pm 1,30 \mu\text{mol SH/g tecido}$) em comparação àquela determinada em machos ($0,81 \pm 0,66 \mu\text{mol SH/g tecido}$) ($P=0,009$) (Figura 6).

Análises de correlação mostraram que os parâmetros bióticos e abióticos (Anexo) determinados não estão relacionados aos níveis de MT em brânquias de *F. paulensis*. Por outro lado, em amostras de hepatopâncreas foi detectada correlação positiva moderada entre MT e os fatores peso ($r_s=0,76$; $P<0,05$) e comprimento ($r_s=0,62$; $P<0,05$). Assim como observado para as brânquias, os fatores abióticos analisados não foram associados aos níveis de MT em hepatopâncreas de *F. paulensis*.

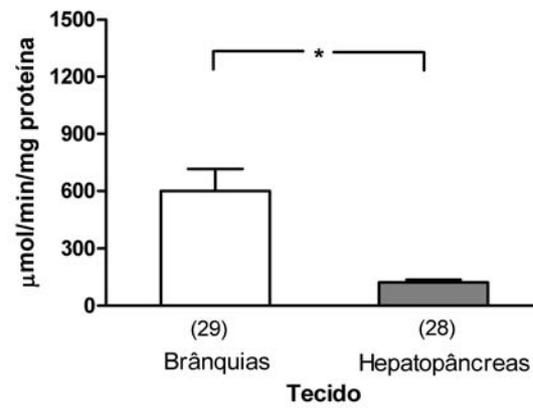


Figura 2. Atividade da glutathione *S*-transferase (GST) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

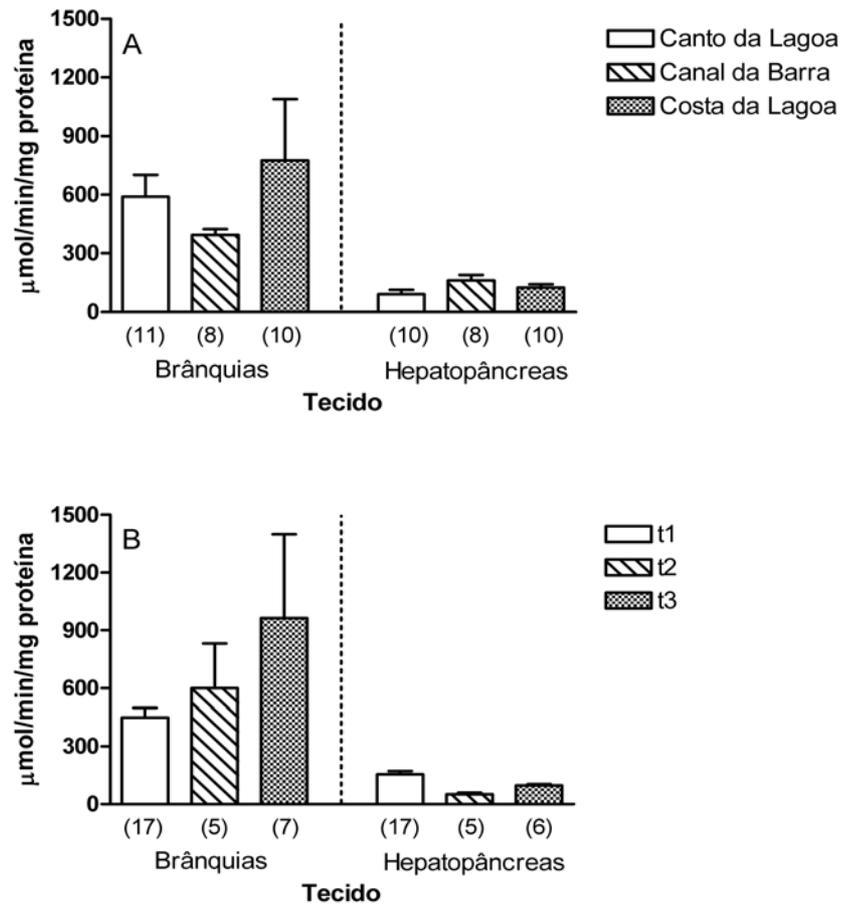


Figura 3. Atividade da glutathiona *S*-transferase (GST) nas áreas (A) e nos tempos (B) de exposição *in situ* em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de GST estão apresentados como média \pm desvio padrão.

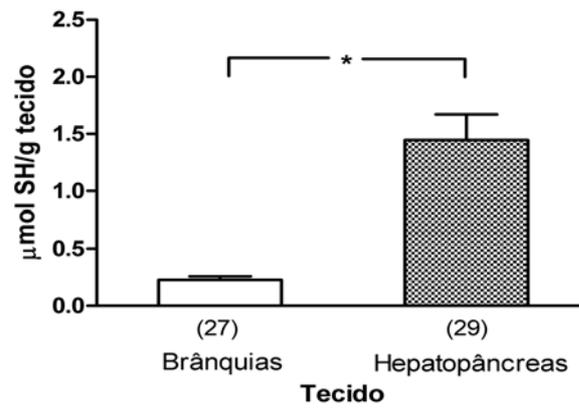


Figura 4. Níveis de metalotioneínas (MT) em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão.* indica diferença significativa ($P < 0,05$).

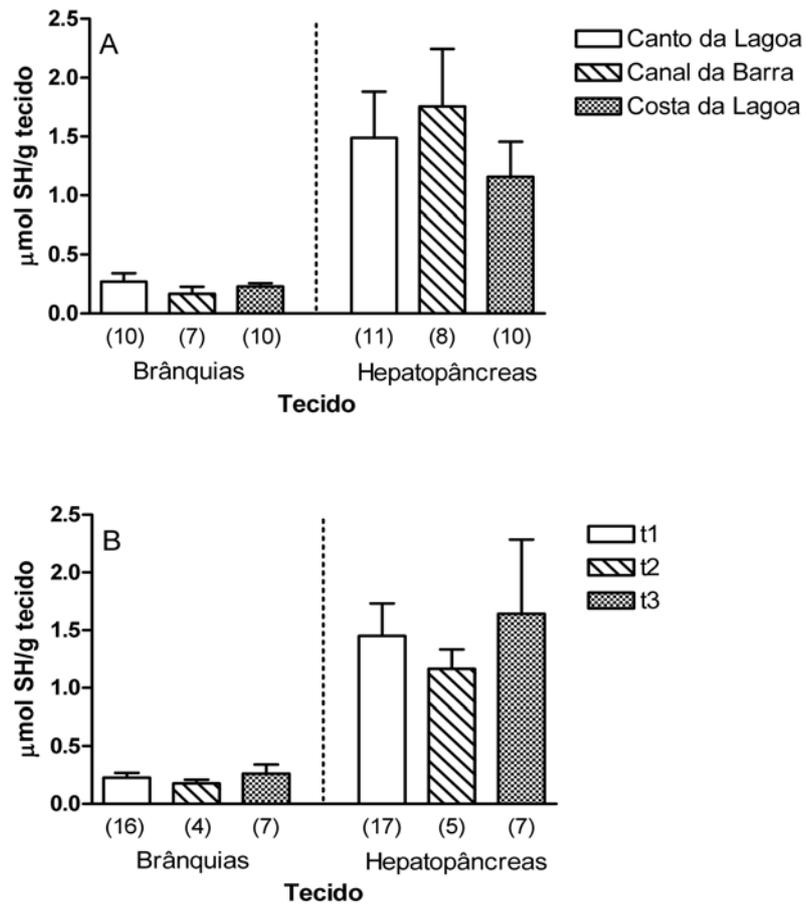


Figura 5. Níveis de metalotioneínas (MT) nas áreas (A) e nos tempos (B) de exposição *in situ* em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão.

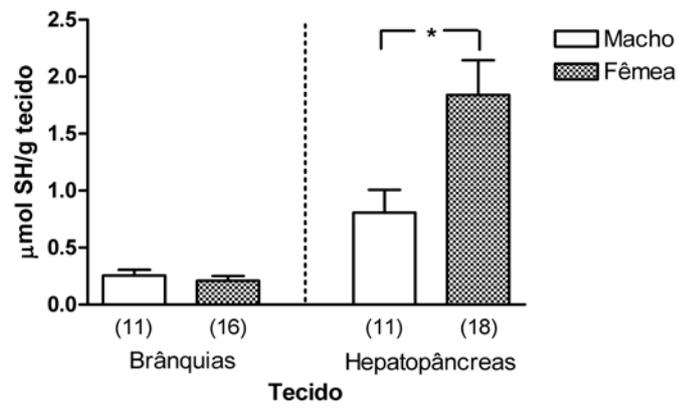


Figura 6. Variação dos níveis de metalotioneínas (MT) entre os sexos em brânquias e hepatopâncreas de *Farfantepenaeus paulensis*. Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os valores de MT estão apresentados como média \pm desvio padrão. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

4. Discussão

Os resultados da atividade da GST obtidos neste trabalho demonstram que, independente do sexo, área e tempo de exposição, as brânquias de *F. paulensis* apresentam maior atividade enzimática em comparação com o hepatopâncreas. Padrão semelhante foi observado em brânquias de moluscos por Power e Sheehan (1996), Hoarau et al. (2001), Cheung et al. (2002), Roméo et al. (2003), Hoarau et al. (2004), Manduzio et al. (2004) e Almeida et al. (2005), o que sugere a importância deste tecido em mecanismos de detoxificação de xenobióticos. No entanto, Arun e Subramanian (1998) e Bhavan e Geraldine (2001) observaram maior atividade enzimática no hepatopâncreas de camarões de água-doce *Macrobrachium malcomsonii*, enquanto Canesi et al. (1999) e Cheung et al. (2004) não verificaram diferença entre estes dois tecidos de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* e *Perna viridis*, respectivamente.

Em organismos aquáticos, as brânquias desempenham funções importantes nos processos respiratórios e osmoregulatórios, na excreção, no balanço ácido-base, na alimentação de moluscos filtradores (Chang, 1992; Power e Sheehan, 1996; Soegianto et al., 1999; Lucu e Towle, 2003; Almeida et al., 2005; Bianchini et al., 2005), além de ser uma barreira física entre o meio externo e interno (Wu e Chen, 2004). Por outro lado, alguns pesquisadores sugerem que o hepatopâncreas de crustáceos apresente importância na detoxificação de xenobióticos (Bhavan e Geraldine, 2001), no metabolismo de metais-traço (Anderson et al., 1997), além de armazenar energia e atuar na digestão dos alimentos (Rosas et al., 1995).

Cabe ressaltar que neste trabalho, os dados de GST referem-se à atividade citosólica total, através da utilização do CDNB como substrato. Assim, a existência de possíveis padrões tecido-específicos relacionados à ocorrência de isoformas de GST nesta espécie de peneídeo

poderia justificar os resultados obtidos. Segundo Clark (1989), os tecidos de invertebrados apresentam padrões variáveis de atividade da GST frente a diversos substratos, sugerindo necessidades específicas no processo de detoxificação de xenobióticos para cada tecido. Estudos avaliando a atividade das isoformas de GST em diferentes tecidos demonstram padrões tecido-específicos, como por exemplo, em mexilhões *Mytilus edulis*, cuja enzima nas brânquias apresenta características similares à isoforma da classe π de mamíferos (Fitzpatrick e Sheehan, 1993), ostras *Crassostrea rhizophorae*, com atividade da isoforma π em brânquias e no hepatopâncreas (Trivella et al., 2004) e em carneiros, com prevalência das isoformas α e μ no fígado e nos pulmões, e τ nos rins (Lenártová et al., 1996).

Ainda em relação às possíveis causas da diferença da atividade enzimática entre os tecidos, variações tecido-específicas na concentração endógena do seu substrato, glutathiona reduzida (GSH), e/ou variação na atividade de outras enzimas relacionadas com este tripeptídeo não podem ser descartadas (Canesi et al., 1999; Zanette, 2003).

De modo geral, a atividade da GST obtida neste estudo apresenta valores mais elevados quando comparada aos dados de GST de crustáceos e poliquetas (Arun e Subramanian, 1998; Geracitano et al., 2002; Pinho et al., 2003; Vinagre et al., 2003; Geracitano et al., 2004a; Geracitano et al., 2004b; de Oliveira et al., 2005). Cabe ressaltar que apenas nos estudos realizados por Arun e Subramanian (1998) e Geracitano et al. (2004b), os espécimes não foram expostos a xenobióticos em laboratório. Assim, pode-se sugerir que os espécimes utilizados neste estudo apresentam níveis basais elevados da GST, cuja atividade provavelmente está sendo expressa na sua capacidade máxima, o que poderia mascarar uma variação entre os locais. No entanto, maiores estudos são necessários para confirmar se o padrão observado é característico da espécie de peneídeo avaliada neste trabalho.

Os dados obtidos de MT mostram maiores níveis da proteína em hepatopâncreas em relação às brânquias de *F. paulensis*, independente da área e tempo de exposição. Maior

concentração de MT em hepatopâncreas de crustáceos também foi observada por Pedersen et al. (1997), Legras et al. (2000), Mouneyrac et al. (2001), Chavez-Crooker et al. (2003) e Pourang e Dennis (2005). Segundo Pourang et al. (2004), a maior ocorrência de MT em crustáceos decápodos é no hepatopâncreas, embora seja observada em outros tecidos.

De acordo com Anderson et al. (1997), Chavez-Crooker et al. (2003) e Pourang e Dennis (2005), o hepatopâncreas é o principal órgão de armazenamento, metabolismo e detoxificação de metais em decápodos. Estudos de regulação da expressão gênica de MT têm estabelecido que a indução da transcrição por metais é resultante de acentuados níveis intracelulares destes elementos (Roesijadi e Robinson, 1994). Assim, concentrações elevadas de metais no hepatopâncreas, comparadas àqueles de outros tecidos de crustáceos, geralmente relacionam-se a maiores níveis de MT.

Altas concentrações de metais em hepatopâncreas de decápodos foram observadas por Páez-Osuna e Tron-Mayen (1995), Méndez et al. (1997), Francesconi et al. (1998), Legras et al. (2000), Mouneyrac et al. (2001) e Pourang e Dennis (2005). Segundo Roesijadi e Robinson (1994), metais em sua forma particulada são comumente ingeridos e, então, bioacumulados em órgãos digestórios, como o hepatopâncreas.

Na Lagoa da Conceição, García (1999) observou concentrações elevadas de metais-traço no sedimento, destacando-se os maiores níveis de zinco. Pereira (2003) detectou elevada concentração deste metal em hepatopâncreas de berbigão *Anomalocardia brasiliiana* da Lagoa. O zinco é um metal essencial que desempenha importante função no crescimento, metabolismo e sobrevivência de crustáceos (Rainbow, 1988; Pourang e Dennis, 2005), contudo, pode exercer efeitos tóxicos quando em altas concentrações (Vanegas et al., 1997). Em crustáceos os níveis de zinco intracelular são regulados pelas MT (Legras et al., 2000), e diversos autores têm demonstrado sua correlação a este metal (Pedersen et al., 1997; Legras et al., 2000; Barka et al., 2001; Mouneyrac et al., 2001; Pourang et al., 2004). Porém, Canli et al.

(1997) sugerem que o zinco disponível no meio ambiente não seja um forte indutor de MT em crustáceos, uma vez que estes organismos apresentam níveis basais elevados deste metal. Pourang e Dennis (2005) atribuem os altos níveis de zinco em hepatopâncreas de crustáceos à sua essencialidade. No entanto, no presente trabalho não foram realizadas determinações analíticas de metais nos tecidos de *F. paulensis* para que se possa avaliar esta relação.

Como MT atua na homeostase dos metais essenciais cobre e zinco, supõe-se que seus níveis sejam afetados por fatores endógenos, como sexo, tamanho, idade e muda, além da biodisponibilidade de metais do ambiente (Legras et al., 2000). Neste trabalho, foi observada diferença na concentração de MT no hepatopâncreas entre os sexos, com maiores níveis em fêmeas, e correlação positiva moderada entre peso, comprimento e MT neste mesmo tecido. Este padrão não foi detectado para as brânquias.

Diferença na concentração de MT entre os sexos de crustáceos foi observada por Francesconi et al. (1998), Legras et al. (2000) e Mouneyrac et al. (2001). Por outro lado, o mesmo não foi observado por Canli et al. (1997) e Pourang e Dennis (2005). Diferença entre os gêneros também está relacionada à acumulação de metais nos tecidos de crustáceos (Páez-Osuna e Tron-Mayen, 1995; Jeckel et al., 1996; Canli et al., 1997; Marsden et al., 2003; Pourang et al., 2004; Pourang e Dennis, 2005). Deste modo, Marsden e Rainbow (2004) sugerem padrões diferenciados entre machos e fêmeas de decápodos no requerimento por metais essenciais e/ou diferentes meios de regulação no hepatopâncreas. No entanto, as causas deste dimorfismo sexual permanecem em aberto.

A relação entre peso e/ou comprimento com MT de crustáceos tem sido investigada e os resultados variam entre os estudos (Legras et al., 2000; Mouneyrac et al., 2001; Pourang e Dennis, 2005). Segundo Marsden e Rainbow (2004) e Pourang et al. (2004), resultados controversos também têm sido relatados na associação entre concentrações de metais e tamanho de crustáceos. Porém, Pourang et al. (2004) sugerem que, de modo geral, animais

menores apresentam concentrações elevadas de metais em seus tecidos, uma vez que, segundo Rainbow (1996), apresentam maior taxa metabólica, além do efeito de diluição em função do elevado peso corpóreo. No presente trabalho, níveis de MT no hepatopâncreas, peso e comprimento apresentaram correlação positiva moderada. Segundo Marsden e Rainbow (2004), entre os fatores que afetam a fisiologia dos animais, o tamanho corpóreo constitui o principal, por relacionar-se à ontogenia, crescimento e reprodução. No entanto, estes autores enfatizam que a idade representa elevada relevância, por refletir o tempo de exposição a metais no ambiente.

Segundo critério adotado por Peixoto et al. (2004), metade dos camarões analisados no presente trabalho classificam-se como sexualmente maduros, embora não tenha sido realizada análise histológica para verificação do estágio de maturação. Engel e Brouwer (1993) sugerem que o ciclo reprodutivo exerce influência no metabolismo de crustáceos como um todo, principalmente na gametogênese, em que nutrientes são armazenados e há aumento no consumo de oxigênio. Em decápodos, a proteína MT está relacionada com a homeostase de cobre, que por sua vez, associa-se à síntese e à degradação do pigmento respiratório hemocianina no hepatopâncreas (Brouwer et al., 2002), cujos níveis variam conforme a ecdise e a reprodução (Engel et al., 2001; Brouwer et al., 2002). Contudo, ressalta-se que, no presente estudo, não foi avaliado o crescimento dos camarões para que se possa fazer associações entre ecdise e MT em hepatopâncreas de *F. paulensis*. Ainda em relação ao aumento do metabolismo aeróbico durante a gametogênese, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e sua relação com estresse oxidativo devem ser consideradas. Segundo Viarengo et al. (1999), Coyle et al. (2002), Geracitano et al. (2004a) e Min et al. (2005), as MT apresentam relevante propriedade antioxidante. Neste contexto, as MT minimizariam danos relacionados ao estresse oxidativo nos camarões sexualmente maduros analisados.

Assim, considerando que os níveis mais elevados de MT em hepatopâncreas relacionaram-se a camarões maiores e mais pesados, pode-se sugerir associação entre MT e estágio de maturação de *F. paulensis*, principalmente em fêmeas. Cabe ressaltar que a relação entre MT e fisiologia de *F. paulensis* é desconhecida, demonstrando a necessidade de estudos que abordem não somente estes aspectos, como a caracterização bioquímica desta proteína a fim de validar o seu uso em estudos ecotoxicológicos nesta espécie de peneídeo.

Assim como para GST, os níveis de MT não diferiram entre as áreas e tempos de exposição. Estes dados sugerem semelhança no aporte de contaminantes entre as três áreas de exposição *in situ* na Lagoa da Conceição. No entanto, esta hipótese deve ser melhor avaliada, através de análises de outros biomarcadores bioquímicos e determinações analíticas de metais na água, no sedimento e nos animais.

A comparação dos níveis de MT obtidos no presente trabalho com outros realizados em crustáceos, não considerou diferenças nas metodologias empregadas. Contudo, dados de MT avaliados pelo mesmo método empregado neste trabalho (segundo Viarengo et al., 1997) estão disponíveis em estudos realizados com poliquetas (Geracitano et al., 2004a; Geracitano et al., 2004b). Os níveis de MT em hepatopâncreas observados no presente trabalho assemelham-se, em magnitude, aos encontrados por Geracitano et al. (2004b), em poliquetas *Laeonereis acuta* provenientes de local contaminado, expostos ou não a cobre. Por outro lado, os níveis de MT de brânquias são equivalentes aos encontrados na mesma espécie de poliqueta (Geracitano et al., 2004a), coletados em locais com e sem indícios de contaminação. Cabe ressaltar que, no trabalho realizado por Geracitano et al. (2004b), foi observada variação sazonal de MT nos animais provenientes de local contaminado. No entanto, no presente trabalho as análises foram realizadas somente no inverno, impossibilitando a verificação de possíveis padrões sazonais nos níveis desta proteína em *F. paulensis*.

De modo geral, os resultados obtidos neste estudo demonstram variação entre os tecidos para ambos os biomarcadores analisados, revelando perfis diferenciados para GST e MT. Cabe ressaltar que os efeitos de contaminantes nas respostas bioquímicas de camarões peneídeos *F. paulensis* são desconhecidos. Assim sendo, este trabalho constitui uma contribuição preliminar neste sentido. Deste modo, visando o melhor entendimento da relação entre contaminantes e biomarcadores de *F. paulensis*, sugere-se análises químicas dos tecidos, em conjunto com a avaliação de outros biomarcadores bioquímicos. Em particular, é necessário relacionar o grau das respostas bioquímicas a alterações de caráter fisiológico nesta espécie de peneídeo.

5. Referências

- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21-30.
- Anderson, M.B., Preslan, J.E., Jolibois, L., Bollinger, J.E., George, W.J., 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Hazard Mater.* 54, 15-29.
- Arun, S., Subramanian, P., 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B, 273-277.
- Barbosa, T.C.P., 2003. Ecolagoa: um breve documento sobre a ecologia da Baía Hidrográfica da Lagoa da Conceição. Gráfica Agnus, Florianópolis.
- Barka, S., Pavillon, J.C., Amiard, J.C., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128C, 479-493.
- Beattie, K.A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62, 219-226.
- Bhavan, P.S., Geraldine, P., 2001. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 27-41.
- Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2005. Mechanism of acute toxicity in marine invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 72, 67-82.

- Branco, J.O., Verani, J.R., 1998. Estudo populacional do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante (Natantia, Penaeidae) na Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 15, 353-364.
- Brouwer, M., Whaling, P., Engel, D.W., 1986. Copper-metallothionein in the american lobster, *Homarus americanus*: potential role as Cu(I) donors to apohemocyanin. *Environ. Health Perspect.* 65, 93-100.
- Brouwer, M., Syring, R., Brouwer, T.H., 2002. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* 88, 228-239.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76.
- Canli, M., Stagg, R.M., Rodger, G., 1997. The induction of metallothionein in tissues of the norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. *Environ. Pollut.* 96, 343-350.
- Carbonell, G., Ramos, C., Tarazona, J.V., 1998. Heavy metals in shrimp culture areas from the Gulf of Fonseca, Central America. II. Cultured shrimps. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 260-265.
- Casterline, J.L.; Yip, G., 1975. The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean and rat liver and kidney. *Archs. Environ. Contam. Toxicol.* 3, 319-329.
- CECCA (Centro de Estudos Cultura e Cidadania), 2001. Qualidade de vida e cidadania: a construção de indicadores socioambientais da qualidade de vida em Florianópolis. Cidade Futura, Florianópolis.
- Chang, E.S., 1992. Endocrinology. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, vol. 23. *Development in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 53-91.

- Chavez-Crooker, P., Pozo, P., Castro, H., Dice, M.S., Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., Ahearn, G.A., 2003. Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 136C, 213-224.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181-191.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128, 393-403.
- Clark, A.G., 1989. The comparative enzymology of the glutathione *S*-transferases from non-invertebrates organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 419-446.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M., 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627-647.
- D’Incao, F., 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica.* 13, 159-169.
- De Oliveira, U.O., Araújo, A.S.R., Belló-Klein, A., da Silva, R.S.M., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140B, 51-57.
- De Souza Sierra, M.M., Soriano-Sierra, E.J., Salim, J.R.S., 1999. Distribuição espacial e temporal dos principais nutrientes e parâmetros hidrológicos da Lagoa da Conceição, SC, Brasil. In: Sierra de Ledo, B., Soriano-Sierra, E.J. (Eds.), *O Ecossistema da Lagoa da Conceição*. SDM/FEPEMA, Florianópolis, pp. 63-88.

- Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B., Ivanković, D., Pavičić, J., 2004. Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Environ. Int. 30, 1019-1025.
- Engel, D.W., Brouwer, M., 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. Biol. Bull. 173, 251-339.
- Engel, D.W., Brouwer, M., 1993. Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein. Mar. Environ. Res. 35, 1-5.
- Engel, D.W., Brouwer, M., Mercaldo-Allen, R., 2001. Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the american lobster, *Homarus americanus*. Mar. Environ. Res. 52, 257-269.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione *S*-transferase from the blue mussel *Mytilus edulis*. Xenobiotica. 23, 851-861.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione *S*-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. Biomarkers. 2, 51-56.
- Francesconi, K.A., Pedersen, K.L., Højrup, P., 1998. Sex-specific accumulation of Cd-metallothionein in the abdominal muscle of the coral prawn *Metapenaeopsis crassissima* from a natural population. Mar. Environ. Res. 46, 541-544.
- Galindo-Reyes, J.G., Fossato, V.U., Villagrana, L.C., Dolci, F., 1999. Pesticides in water, sediments and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. Mar. Pollut. Bull. 38, 837-841.
- García, A.A., 1999. Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição e do Canal da Barra através de indicadores físico-químicos dos sedimentos de fundo e dos indicadores sócioambientais. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

- Gedamu, L., Zafarullah, M., 1993. Molecular analyses of rainbow trout metallothionein and stress protein genes: structure, expression and regulation. In: Hochachka, M., Mommsen, L. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 2. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 241-258.
- George, S.G., Olsson, P.E., 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151-171.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2002. Physiological and antioxidant enzymes responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 277, 145-156.
- Geracitano, L.A., Bocchetti, R., Monserrat, J.M., Regoli, F., Bianchini, A., 2004a. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Mar. Environ. Res.* 58, 1-17.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2004b. Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* 58, 625-630.
- Gorni, R., Weber, R.R., 2004. Organochlorine pesticides residues and PCBs in benthic organisms of the inner shelf of the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. *Braz. J. Ocean.* 52, 141-152.
- Gowland, B.T.G., Moffat, C.F., Stagg, R.M., Houlihan, D.F., Davies, I.M., 2002. Cypermethrin induces glutathione *S*-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.* 54, 169-177.
- Hauff, S.N., 1996. Diagnóstico ambiental integrado da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição - Florianópolis, SC. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2001. Differential induction of glutathione *S*-transferase in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 523-529.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2004. Effect of three xenobiotic compounds on glutathione *S*-transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 68, 87-94.
- Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpenè, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol.* 46, 311-330.
- Ishizuka, M., Sakyama, T., Iwata, H., Fukushima, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1998. Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione *S*-transferase in crabs *Eriocheir japonicus* from Japanese rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1490-1498.
- Iwai, M., 1978. Desenvolvimento larval e pós-larval de *Penaeus (Melicertus) paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda) e o ciclo de vida dos camarões do gênero *Penaeus* da região centro-sul do Brasil. Tese. USP, São Paulo - SP, Brasil.
- Jeckel, W.H., Roth, R.R., Ricci, L., 1996. Patterns of trace metal distribution in tissues of *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Decapoda: Solenoceridae). *Mar. Biol.* 125, 297-306.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione *S*-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Lange, A., Ausseil, O., Segner, H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol.* 131C, 231-243.
- Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex,

- weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 259-279.
- Lenártová, V., Holovská, K., Martinez-Lara, E., López-Barea, J., Barcena, J.A., Rosival, I., 1996. Changes in GST-isoenzyme patterns of some organs of sheep exposed to different levels of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C, 153-158.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 195-214.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations of antioxidants defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83-93.
- Marsden, I.D., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2003. Trace metal concentrations in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implications for biomonitoring. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 290, 93-113.
- Marsden, I.D., Rainbow, P.S., 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology-the amphipod example? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300, 373-408.
- Medvedovsky, K.G., 2002. Efeito da densidade de estocagem sobre o crescimento e a sobrevivência do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1997) cultivado em gaiolas no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS. Monografia. FURG, Rio Grande - RS, Brasil.
- Méndez, L., Acosta, B., Palacois, E., Magallón, F., 1997. Effect of stocking densities on trace metal concentration in three tissues of brown shrimp *Penaeus californiensis*. *Aquaculture.* 156, 21-34.

- Min, K.S., Morishita, F., Tetsuchikawahara, N., Onosaka, S., 2005. Induction of hepatic and renal metallothionein synthesis by ferric nitrilotriacetate in mice: the role of MT as an antioxidant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 9-17.
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comp. Biochem. Physiol.* 129C, 193-209.
- Müller, I.C., 2004. Caracterização e avaliação de metalotioneína como biomarcador de exposição a cádmio no mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758). Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Orlando, A.M., 2001. O comitê de gerenciamento da Lagoa da Conceição: gestão de recursos hídricos ou gestão costeira? Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Páez-Osuna, F., Ruiz-Fernadéz, C., 1995. Trace metals in the mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. *Environ. Pollut.* 87, 243-247.
- Páez-Osuna, F., Tron-Mayen, L., 1995. Distribution of heavy metals in tissues of shrimp *Penaeus californiensis* from the northwest coast of Mexico. *Environ. Contam. Toxicol.* 55, 209-215.
- Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., Delepege, M.H., 1997. Field application of metallothionein and stress protein in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183-200.
- Peixoto, S., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., D’Incao, F., Krummenauer, D., Milach, A.M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. *Aquaculture.* 238, 173-182.

- Pereira, N.C., 2003. Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) como bioindicador de poluição aquática. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 459-468.
- Pourang, N., Dennis, J.H., Ghourchian, H., 2004. Tissue distribution and redistribution of trace elements in shrimp species with the emphasis on the roles of metallothionein. *Ecotoxicology.* 13, 519-533.
- Pourang, N., Dennis, J.H., 2005. Distribution of trace elements in tissues of two shrimp species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. *Environ. Int.* 31, 325-341.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C, 99-103.
- Rainbow, P.S., 1988. The significance of trace metal concentrations in decapods. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 59, 291-313.
- Rainbow, P.S., 1996. Heavy metals in aquatic invertebrates. In: Beyer, W.N., Heinz, A.W., Redmon-Norwood, A.W., (Eds.), *Environmental contaminants in wildlife*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 405-425.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81-114.

- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Marlins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 387-420.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, 369-378.
- Rosas, C., Bolongaro-Crevenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L., Escobar, E., 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.* 189, 168-174.
- Scárdua, M.P., 1998. Utilização de alimentadores do tipo bandeja no cultivo de camarão-rosa *Penaeus paulensis* em tanques rede. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Aquat. Living Resour.* 12, 57-70.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 235-335.
- Trivella, D.B.B., Medeiros, I.D., Toledo-Silva, G., Ferreira, J.F., Bainy, A.C.D., 2004. Análise da atividade de isoformas da GST em ostras do mangue *Crassostrea rhizophorae* expostas a esgoto doméstico. In: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. SETAC Brasil, Florianópolis, p. 147.

- Vanegas, C., Espina, S., Botello, A.V., Villanueva, S., 1997. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 87-92.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar. Environ. Res. 44, 69-84.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. 135C, 67-75.
- Wu, J.P., Chen, H.C., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Chemosphere. 57, 1591-1598.
- Zanette, J., 2003. Influência da salinidade sobre biomarcadores de contaminação aquática em ostras-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae* - Guilding 1828) expostas a diferentes concentrações de óleo diesel. Monografia. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ambiente aquático, contaminantes das mais variadas classes, como metais-traço e compostos orgânicos, exibem potencial de acumulação, não só em sedimentos, como também nos organismos que ali vivem. Neste último caso, além dos danos causados aos organismos propriamente ditos, deve-se destacar que estes contaminantes podem, por sua vez, ser transferidos para outras espécies, inclusive o homem, por meio da cadeia trófica. Assim, a determinação dos níveis de contaminação e a avaliação do impacto dos contaminantes sobre as espécies aquáticas tornam-se ferramentas imprescindíveis na avaliação dos recursos naturais e pesqueiros, uma vez que estes representam uma importante fonte de proteína para uma grande parcela da população mundial.

Organismos expostos a agentes estressores físicos e químicos podem apresentar alterações biológicas de caráter molecular, celular e/ou fisiológico, as quais constituem os denominados biomarcadores. Atualmente, os biomarcadores bioquímicos têm sido amplamente empregados em programas de monitoramento ambiental, utilizando espécies aquáticas, principalmente moluscos e peixes. No entanto, estudos com este enfoque que façam uso de crustáceos como organismos sentinela são pouco frequentes.

Tendo em vista o processo acelerado de modificação ambiental que a Lagoa da Conceição vem sofrendo, associado à importância econômica das espécies de camarão-rosa para a comunidade local, o presente trabalho representou uma contribuição preliminar na avaliação do emprego potencial dos biomarcadores bioquímicos glutatona *S*-transferase (GST) e metalotioneínas (MT) nos peneídeos *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Cabe ressaltar aqui a importância da Lagoa da Conceição como criadouro natural destas espécies de camarão, as quais utilizam este ecossistema durante parte do seu ciclo de vida.

No manuscrito 1 foi avaliada a atividade da enzima glutationa *S*-transferase (GST) em brânquias de camarões *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*, e em hepatopâncreas de *F. brasiliensis*, coletados na Lagoa da Conceição (em um único local) e mantidos em três áreas distintas deste ambiente lagunar (Canto da Lagoa, região próxima ao Canal da Barra da Lagoa e Costa da Lagoa) por diferentes tempos (2, 7 e 15 dias), bem como em animais mantidos no laboratório por iguais períodos de exposição. Os resultados mostram que a atividade da GST em brânquias apresentou padrões semelhantes nas duas espécies de peneídeos analisadas, embora alguns resultados tenham sido controversos, uma vez que, quando analisadas individualmente quanto a possíveis variações na atividade da GST deste tecido entre os tempos e as áreas de exposição, as duas espécies apresentaram padrões distintos em algumas comparações. Por outro lado, a atividade da GST mostrou um perfil distinto entre brânquias e hepatopâncreas. Foi observada similaridade na atividade da GST entre as áreas de exposição *in situ* na Lagoa, contrapondo-se aos dados disponíveis na literatura referentes a variações espaciais de contaminantes e nutrientes de origem antropogênica na água e no sedimento da região. Deste modo, a utilização da GST como ferramenta no diagnóstico ambiental, empregando-se as espécies *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, deve ser considerada com precaução e em conjunto de outros biomarcadores. Cabe ressaltar que o presente trabalho de campo representa uma investigação pioneira sobre os efeitos de contaminantes nas respostas bioquímicas destas duas espécies de camarões peneídeos.

No manuscrito 2 foram avaliados a atividade da enzima glutationa *S*-transferase (GST) e os níveis de metalotioneínas (MT) em brânquias e hepatopâncreas de camarões *F. paulensis* coletados na Lagoa da Conceição no inverno de 2003, e mantidos em três áreas, Canto da Lagoa, Canal da Barra e Costa da Lagoa, onde permaneceram por diferentes tempos (2, 7 e 15 dias). A atividade da GST em *F. paulensis* apresentou o mesmo perfil descrito no manuscrito

1, tendo sido registrados valores maiores para a atividade da GST em brânquias, e ausência de diferença da atividade enzimática entre as áreas de exposição *in situ*. Assim, para consolidar a validação da GST como biomarcador de contaminação ambiental nestas duas espécies de crustáceos são necessários estudos que investiguem, por exemplo, não somente as variações da atividade da GST total, mas também de possíveis isoformas desta enzima, tanto em brânquias, como em hepatopâncreas.

Em relação às MT, comparações espaciais seguiram o mesmo padrão detectado para GST. Contudo, níveis maiores de MT foram observados no hepatopâncreas. Os resultados sugerem, ainda, uma relação entre MT e parâmetros biológicos, como sexo, peso e comprimento. Assim, visando a consolidação do emprego de MT como biomarcador de contaminação ambiental, em *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*, sugerimos a realização de estudos que investiguem de forma detalhada as variações no padrão de expressão destas proteínas e suas possíveis relações com alterações de caráter fisiológico nestas duas espécies de peneídeos.

No sentido de aprofundar o estudo dos biomarcadores GST e MT em *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, está em andamento a análise destas repostas bioquímicas em espécimes expostos a cádmio (Cd), na concentração de 0,5 mg/L por 4 dias, em condições controladas em laboratório. Neste contexto, a imunodeteção das proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins, Hsp*), Hsp70 e Hsp60, em brânquias e hepatopâncreas dos animais expostos ao metal, bem como naqueles utilizados no estudo de monitoramento *in situ*, encontra-se em curso.

Assim, como perspectiva para estudos futuros poder-se-ia apontar a investigação da atividade da GST total e de suas possíveis isoformas nas brânquias e no hepatopâncreas, bem como dos níveis de MT em *F. paulensis* e *F. brasiliensis* expostos a diferentes classes de contaminantes, em concentrações e tempos de exposição variáveis. Estes estudos permitiriam

aprofundar o conhecimento relativo às respostas bioquímicas desencadeadas pelos contaminantes nas duas espécies de camarão-rosa. Assim, no sentido de gerar subsídios para um programa de monitoramento da qualidade ambiental da Lagoa da Conceição, sugerimos, ainda, a utilização conjunta de outros biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 318, p. 21-30, 2005.
- BALDWIN, W.S.; LEBLANC, G.A. Expression and induction of an immunochemically related class of glutathione *S*-transferases in *Daphnia magna*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 113B, n. 2, p. 261-267, 1996.
- BARBOSA, T.C.P. **Ecolagoa**: um breve documento sobre a Ecologia da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição. Florianópolis: Gráfica Agnus, 2003. 86 p.
- BARKA, S.; PAVILLON, J.C.; AMIARD, J.C. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 128C, p. 479-493, 2001.
- BARNES, R.S.K. **Coastal lagoons**: the natural history of a neglected habitat. Cambridge: University Press, 1980. 106 p.
- BARSYTE, D.; WHITE, K.N.; LOVEJOY, D.A. Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 122C, p. 287-296, 1999.
- BAZZANTI, M. et al. Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems: a case study. **Environ. Int.**, v. 23, n. 6, p. 799-813, 1997.
- BEATTIE, K.A. et al. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquat. Toxicol.**, v. 62, p. 219-226, 2003.
- BEBIANNI, M.J.; LANGSTON, W.L. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. **Mar. Biol.**, v. 108, p. 91-96, 1991.
- BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcomsonii* on exposure to endosulfan. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 70, p. 27-41, 2001.
- BORRELY, S.I.; TORNIERI, P.H.; SAMPA, M.H.O. Avaliação de toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos. In:

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, suppl. 1, p. 21-35, 1997.

BRANCO, J.O.; VERANI, J.R. Aspectos bioecológicos do camarão-rosa *Penaeus brasiliensis* Latreille (Natantia, Penaeidae) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revta. Bras. Zool.**, v. 15, p. 345-351, 1998a.

BRANCO, J.O.; VERANI, J.R. Estudo populacional do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante (Natantia, Penaeidae) na Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil. **Revta. Bras. Zool.**, v. 15, p. 353 -364, 1998b.

BROUWER, M.; BROUWER, T.H. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 351, n. 2, p. 257-264, 1998.

BROUWER, M.; SYRING, R.; BROUWER, T.H. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. **J. Inorg. Biochem.**, v. 88, p. 228-239, 2002.

CANLI, M.; STAGG, R.M.; RODGER, G. The induction of metallothionein in tissues of the norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. **Environ. Pollut.**, v. 96, p. 343-350, 1997.

CANTOVISKI, K. **Análise do estresse oxidativo em *Anomalocardia brasiliensis* como biomarcador de poluição aquática na Laguna da Conceição, Fpolis/SC.** 2002. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARBONELL, G.; RAMOS, C.; TARAZONA, J.V. Heavy metals in shrimp culture areas from the Gulf of Fonseca, Central America. II. Cultured shrimps. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 60, p. 260-265, 1998.

CASTERLINE, J.L.; YIP, G. The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean and rat liver and kidney. **Archs. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 3, p. 319-329, 1975.

CECCA (Centro de Estudos Cultura e Cidadania). **Qualidade de vida e cidadania: a construção de indicadores socioambientais da qualidade de vida em Florianópolis.** Florianópolis: Cidade Futura, 2001. 216 p.

CHAVEZ-CROOKER, P. et al. Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 136C, p. 213-224, 2003.

CHEUNG, C.C.C. et al. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 45, p. 181-191, 2002.

CHEUNG, C.C.C. et al. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environ. Pollut.**, v. 128, p. 393-403, 2004.

DAUTERMAN, W.C. Metabolism of toxicants: phase II reactions. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (Eds). **Introduction to Biochemical Toxicology**. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. p. 113-132.

DE OLIVEIRA, U.O. et al. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140B, p. 51-57, 2005.

DEPLEGE, M.H. Genetic ecotoxicology: an overview. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 200, p. 57-66, 1996.

ENGEL, D.W.; BROUWER, M.; MERCALDO-ALLEN, R. Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the american lobster, *Homarus americanus*. **Mar. Environ. Res.**, v. 52, p. 257-269, 2001.

ESPÍNDULA, E.L.G. et al. (Eds.). **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. São Carlos, 2000. p. 395-406.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciências, 1988. 575 p.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol. Lett.**, v.141, p. 353-365, 2003.

FITZPATRICK, P.J. et al. Assessment of a glutathione *S*-transferase and related protein in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, v. 2, p. 51-56, 1997.

FONTES, M.L.S. **Breve estudo espaço-temporal e de impacto do feriado de carnaval e de corpus Christi sobre variáveis ambientais nas águas da Lagoa da Conceição - Florianópolis**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FOSSI, M.C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*: field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 121C, p. 321-331, 1998.

FRANCESCONI, K.A.; PEDERSEN, K.L.; HØJRUP, P. Sex-specific accumulation of Cd-metallothionein in the abdominal muscle of the coral prawn *Metapenaeopsis crassissima* from a natural population. **Mar. Environ. Res.**, v. 46, p. 541-544, 1998.

GADAGBUI, B.K.M.; JAMES, M.O. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 27-37, 2000.

GALINDO-REYES, J.G. et al. Pesticides in water, sediments, and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 38, n. 9, p. 837-841, 1999.

GARCÍA, A.A. **Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição e do Canal da Barra através de indicadores físico-químicos dos sedimentos de fundo e dos indicadores sócioambientais**. 1999. 277 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GORNI, R.; WEBER, R.R. Organochlorine pesticides residues and PCBs in benthic organisms of the inner shelf of the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Ocean.**, v. 52, p. 141-152, 2004.

GOWLAND, B.T.G. et al. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 169-177, 2002.

HAMER, D.H. Metallothionein. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 913-951, 1986.

HAUFF, S.N. **Diagnóstico ambiental integrado da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição – Florianópolis, SC**. 1996. 145 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Curso de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HODGSON, E.; LEVI, P.E. Metabolism of toxicants: phase I reactions. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (Eds). **Introduction to Biochemical Toxicology**. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. p. 75-111.

ISHIZUKA, M. et al. Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione *S*-transferase in crabs *Eriocheir japonicus* from Japanese rivers. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, p. 1490-1498, 1998.

JOSEPHY, P.D. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997. 209 p.

KUHNEN, A. **Lagoa da Conceição: meio ambiente e modos de vida em transformação**. Florianópolis: Cidade Futura, 2002. 272 p.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. Predicting effects of toxic chemicals in the marine environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2001.

LEBLANC, G.A.; BAIN, L.J. Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, suppl. 1, p. 65-80, 1997.

LEGRAS, S. et al. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 246, p. 259-279, 2000.

LERCH, K.; AMMER, D.; OLAFSON, R.W. Crab metallothionein: primary structures of metallothioneins 1 and 2. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 5, p. 2420-2426, 1982.

LÜCHMANN, K.H. et al. Seasonal variation of the penaeid shrimps, *Farfantepenaeus paulensis* and *Farfantepenaeus brasiliensis*, in the sub-tropical Conceição Lagoon, Florianópolis, SC, Brazil. In: 3rd Brazilian Crustacean Congress and 2004 TCS Summer Meeting. 2004, Florianópolis, SC.

MANDUZIO, H. et al. Seasonal variations of antioxidants defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione *S*-transferase. **Aquat. Toxicol.**, v. 70, p. 83-93, 2004.

MARSDEN, I.D.; RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D. Trace metal concentrations in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implications for biomonitoring. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 290, p. 93-113, 2003.

MARX, H.; BRUNNER, B. Heavy metal contamination of North Sea shrimp (*Crangon crangon* L.). **Z Lebensm Unters Forsch A**, v. 204, p. 273-275, 1998.

MÉNDEZ, L. et al. Effect of stocking densities on trace metal concentration in three tissues of brown shrimp *Penaeus californiensis*. **Aquaculture**, v. 156, p. 21-34, 1997.

MOKSNES, P.O.; LINDAHL, U.; HAUX, C. Metallothionein as a bioindicator of heavy metal exposure in the tropical shrimp, *Penaeus vannamei*: a study of dose-dependent induction. **Mar. Environ. Res.**, v. 39, p. 143-146, 1995.

MOUNEYRAC, C. et al. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 129C, p. 193-209. 2001.

NIEWEGLOWSKI, A.M.A.; SILVA, E.M.F.M.; KNIE, J. Importância dos Parâmetros Ecotoxicológicos em Estudos Ambientais. In: **MAIA**. 3. ed. 1999. p. 1-6.

NIYOGI, S. et al. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.**, v. 52, p. 13-26, 2001.

NÓVOA-VALIÑAS, M.C.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MELGAR, M.J. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic glutathione *S*-transferases from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 131C, p. 207-213, 2002.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1988. 434 p.

ORLANDO, A.M. **O comitê de gerenciamento da Lagoa da Conceição: gestão de recursos hídricos ou gestão costeira?** 2001. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PÁEZ-OSUNA, F.; RUIZ-FERNADÉZ, C. Trace metals in the mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. **Environ. Pollut.**, v. 87, p. 243-247, 1995.

PÁEZ-OSUNA, F.; TRON-MAYEN, L. Distribution of heavy metals in tissues of shrimp *Penaeus californiensis* from the northwest coast of Mexico. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 55, p. 209-215, 1995.

PARK, J.; PRESLEY, B.J. Trace metal contamination of sediments and organisms from the Swan Lake area of Galveston Bay. **Environ. Pollut.**, v. 98, n. 2, p. 209-221, 1997.

PEDERSEN, S.N.; LUNDEBYE, A.K.; DEPLEGE, M.H. Field application of metallothionein and stress protein in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. **Aquat. Toxicol.**, v. 37, p. 183-200, 1997.

PEREIRA, N.C. **Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) como bioindicador de poluição aquática.** 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PHILLIPS, D.J.H.; SEGAR, D.A. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: program design imperatives. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 17, p. 10-17, 1986.

PINHO, G.L.L. et al. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 135C, p. 459-468, 2003.

PORTO FILHO, E. **Sedimentometria e algumas considerações sobre a biogeoquímica dos sedimentos de fundo da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina.** 1993. 346 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Curso de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POURANG, N.; DENNIS, J.H. Distribution of trace elements in tissues of two shrimp species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. **Environ. Int.**, v. 31, p. 325-341, 2005.

REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. Metais pesados em mexilhões *Perna perna* no litoral do Estado do Rio de Janeiro. **Revta. Bras. Biol.**, v. 46, p. 239-247, 1986.

RIOL, M.M.J. et al. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 128C, p. 227-235, 2001.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.**, v. 22, 81-114, 1992.

ROMÉO, M. et al. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. **Environ. Pollut.**, v. 122, p. 369-378, 2003.

SIERRA DE LEDO, B. **Lagoa da Conceição: uma abordagem ecológica**. ACIESP, 1990. v. 2, p. 132-141.

SIERRA DE LEDO, B.; GRÉ, J.C.R.; SORIANO-SIERRA, E.J. Produção pesqueira, estressores naturais e antropogênicos na Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil. In: SIERRA DE LEDO, B.; SORIANO-SIERRA, E.J. (Eds.). **O ecossistema da Lagoa da Conceição**. Florianópolis: SDM/FEPEMA, 1999. p. 359-370.

SIERRA DE LEDO, B.; SORIANO-SIERRA, E.J. Changes and trends of hydrological parameters in a physically stressed coastal lagoon. In: SIERRA DE LEDO, B.; SORIANO-SIERRA, E.J. (Eds.). **O ecossistema da Lagoa da Conceição**. Florianópolis: SDM/FEPEMA, 1999. p. 403-414.

SILVA, A.Z. et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicol. Environ. Safe. In press**, 2005.

SILVA, M.L.G. **Análise da qualidade ambiental urbana da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição**. 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STEGEMAN, J.J. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R. J. et al. (Eds.). **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: Lewis Publishers, 1992. p. 232-335.

TERAMITSU, I. et al. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammals species. **Aquat. Toxicol.**, v. 51, p. 145-153, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VIARENGO, A. et al. Metallothionein as a tool in biomonitoring programs. **Biomarkers**, v. 4, p. 455-466, 1999.

VINAGRE, T.M. et al. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 135C, p. 67-75, 2003.

WALKER, C.H. et al. **Principles of ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996. 321 p.

WALKER, C.H. Biochemical biomarkers and potentiation of toxicity. **Biotherapy**, v. 11, p. 113-117, 1998.

ANEXO

Tabela 1. Valores diários de temperatura e salinidade nas áreas de exposição *in situ* e em laboratório durante o inverno de 2003

Inverno / 2003									
	Data	Canto da Lagoa		Canal da Barra		Costa da Lagoa		Laboratório	
		ToC	Salinidade	ToC	Salinidade	ToC	Salinidade	ToC	Salinidade
t0	25/09/2003	20	30	21	33	23	31	22	18
	26/09/2003	19	18	20	32	19,5	30	20	18
t1	27/09/2003	22,5	27,5	22,5	30	22	30,5	20	17
	28/09/2003	21,5	28	21,5	31	23	31	21	17
	29/09/2003	21,5	28,5	21	32	22	32	20	17,75
t2	30/09/2003	21	28,5	21	32	22	32	20,25	18,5
	01/10/2003	21	29	21	32	21	31,5	19,875	18,5
	02/10/2003	22	28,5	22,5	31,5	23	31,5	20,25	18,5
	03/10/2003	21,5	28	22	31	23	31	21	18
	04/10/2003	24	28,5	24	31,5	24	32,5	21,5	18,25
t3	05/10/2003	23	29	20	30	20	29	21,25	18,5
	06/10/2003	25	28,5	19	30	19	29	18	18
	07/10/2003	23,5	27	22,5	32	22	32		
	08/10/2003	24	29	23	31,5	23	32		
	09/10/2003	22,5	29,5	22	30	22	29,5		
	10/10/2003	23,5	29,5	21,5	33,5	22	31,5		
	Média	22,2	27,9	21,5	31,4	21,9	31,0	20,4	18,0
D.P.	1,6	2,8	1,3	1,1	1,4	1,1	1,0	0,5	

Tabela 2. Valores diários de temperatura e salinidade nas áreas de exposição *in situ* e em laboratório durante o verão de 2004

Verão / 2004									
	Data	Canto da Lagoa		Canal da Barra		Costa da Lagoa		Laboratório	
		ToC	Salinidade	ToC	Salinidade	ToC	Salinidade	ToC	Salinidade
t0	07/03/2004	28	22	27	25	27	29	24	18
	08/03/2004	28	22	27	25,5	27	29	24	18
t1	09/03/2004	28	24	27,5	28	27,5	27	24	18,5
	10/03/2004	26	23	26,5	27	25,5	29	23,5	19
t2	11/03/2004	26	25,5	25,5	30	26	28	23,25	17,25
	12/03/2004	26	22,5	25,5	28	26	27	22,25	19
	13/03/2004	26	25,5	25,5	30	26	28	22	19
	14/03/2004	24,5	24	24	30,5	24	29	22,25	19
	15/03/2004	24,5	23	24,5	28	24	17,5	22	19
t3	16/03/2004	25	24			25	27	22,25	19
	17/03/2004	25	24			25,5	26,5	22,75	17,75
	18/03/2004	26	24,5			25	24	22,75	19
	19/03/2004	25	21			25,5	24	22,75	17,5
	20/03/2004	26	22			24	19	21,5	18
	21/03/2004	26	25			24,5	25	21,25	19
	22/03/2004	24	25			23,5	24	22,5	20
Média	25,9	23,6	25,9	28,0	25,4	25,8	22,7	18,6	
D.P.	1,2	1,4	1,2	2,0	1,2	3,5	0,9	0,7	