

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

ANGELA ZACCARON DA SILVA

*AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA OSTRADO-MANGUE (*Crassostrea rhizophorae*) (MOLLUSCA:BIVALVIA) EXPOSTA A ÓLEO DIESEL EM DIFERENTES SALINIDADES*

Florianópolis

2004

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

ANGELA ZACCARON DA SILVA

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA OSTRADO-MANGUE (*Crassostrea rhizophorae*) (MOLLUSCA:BIVALVIA) EXPOSTA A ÓLEO DIESEL EM DIFERENTES SALINIDADES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis

2004

Silva, Angela Zaccaron da

Avaliação de biomarcadores bioquímicos na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca:Bivalvia) exposta a óleo diesel em diferentes salinidades/ Angela Zaccaron da Silva. – Florianópolis, 2004.

XX f. (número de folhas)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da, Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

1. *Crassostrea rhizophorae*. 2. Salinidade. 3. Óleo Diesel. I. Título.

Dedico este trabalho ao meu paizão, Antônio Carlos Lisboa da Silva, que sempre me deu força e coragem para continuar acreditando nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Antônio C. L. da Silva (*in memoriam*) e Clara C. Zaccaron da Silva, por sempre apoiarem as minhas decisões. É uma grande bênção ter vocês como meus pais. A minha mãezona, agradeço todo carinho, amor e compreensão que me foi dispensado.

Aos meus irmãos Karina e Diogo, muito obrigada pelo apoio, companheirismo e amor.

Ao Prof. Dr. Afonso C. D. Bainy, meu orientador, pela oportunidade concedida, atenção dedicada e pelos grandes ensinamentos.

À minha co-orientadora não oficial, Prof. Dra. Maria Risoleta Marques, por toda a preocupação e atenção despendida no início dos experimentos e durante toda a minha “jornada” no laboratório.

Aos Profs. João Guzinski e Jaime F. Ferreira, pelo apoio, disponibilizando espaço no LCMM para realização do experimento e pelo fornecimento das ostras utilizadas neste trabalho.

Ao CNPq que, através do fundo setorial CT-Petro, possibilitou o financiamento desta pesquisa.

Às grandes amigas: Juliana Moser, amiga para todas as horas, técnica e “descobridora” do laboratório, muito obrigada pelos procedimentos ensinados, trocas de experiências, ajuda nas coletas até altas horas, além, obviamente, das festas, conselhos e do enorme companheirismo. Ferdinanda, obrigada pela grande amizade que criamos e pela sua alegria contagiante, e também pela grande ajuda durante o experimento no LCMM. Grazi que, como sempre, foi minha consultora para assuntos aleatórios, além de ser uma enorme amiga. Adoro vocês.

Agradeço também aos meus amigos (as) do LABICAI: Elianinha e Isabel, pelas trocas de experiências com as preocupações durante o mestrado e também pelo grande apoio na realização desta dissertação; Priscila e Dani, pelas aulas no sábado à noite,

trocas de idéias durante o cafezinho, experimentos na Barra e ajuda na padronização das enzimas; Taise e Karin, pelas questões levantadas e algumas vezes respondidas; aos homens do laboratório Juliano, Lucas e Guilherme, pelos ensinamentos, “pegação no pé” e grande ajuda durante o experimento, principalmente pelos levantamentos de peso. Muito obrigada pelo apoio e acolhida no laboratório. Vocês simplesmente não têm idéia de como foram importantes para mim durante este período da minha vida. Também não poderia deixar de agradecer pela companhia de todos na “boêmia” de Floripa.

Aos meus novos amigos, o eixo Rio-São Paulo, Fabio e Rosária, que me ajudaram muito na parte final do meu trabalho.

Muito obrigada a todas as pessoas que auxiliaram o meu trabalho, sem as quais ficaria muito mais difícil ou até impossível a sua realização.

RESUMO

As regiões costeiras vêm recebendo nas últimas décadas um significativo aporte de contaminantes de origem antropogênica, incluindo o petróleo e seus derivados. Como consequência disso, ecossistemas como os manguezais, caracterizados por possuir amplas variações de salinidade, são alguns dos ecossistemas mais afetados e vulneráveis. A ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bilvalvia), um molusco eurihalino e osmoconformador, com ampla distribuição na costa brasileira, pode ser utilizado como um organismo sentinela em programas de biomonitoramento. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da salinidade (35, 25, 15 e 9) sobre a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), catalase (CAT) e acetilcolinesterase (AChE) na glândula digestiva de *C. rhizophorae* expostas por 7 dias à óleo diesel (0,01, 0,1 e 1 ml/L) e submetidas a depuração por um período de 24 horas e 7 dias. A capacidade antioxidante do plasma nestas condições também foi avaliada. A atividade da enzima GST apresentou um aumento dose-dependente com relação às concentrações do óleo diesel nas salinidades 25 e 15. Esta resposta indica uma melhor adaptação das ostras nestas salinidades, possivelmente devido a uma maior taxa de filtração e disponibilidade de energia oriunda da alimentação, propiciando condições mais adequadas para uma eficiente conjugação dos xenobióticos. Por outro lado, nas salinidade 35 e 9 não houve diferença significativa entre os tratamentos. As enzimas G6PDH, CAT e AChE não apresentaram alterações entre os grupos analisados. Da mesma maneira, a capacidade antioxidante também não demonstrou uma resposta aos tratamentos. Os resultados obtidos sugerem que a atividade da GST em glândula digestiva de *C. rhizophorae* pode servir como um biomarcador de contaminação aquática em casos de contaminação por óleo diesel, principalmente em ecossistemas de manguezal onde a entrada de contaminantes está freqüentemente associada à influência da água doce reduzindo a salinidade para faixas intermediárias entre 25 e 15.

Palavras-chave: *Crassostrea rhizophorae*, biomarcadores enzimáticos, óleo diesel, salinidade, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

In the last decades, there has been a significant influx of anthropogenic contaminants, including petroleum-derived, to coastal zones. As a consequence, mangrove ecosystems, which are influenced by large salinity changes, are strongly impacted and vulnerable. The mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bivalvia), an euryhaline osmoconformer mollusk with wide distribution at Brazilian coast, can be used as a sentinel organism in biomonitoring programs. The aim of this study was to investigate the influence of salinity (35, 25, 15 and 9) on the enzyme activities of glutathione S-transferase (GST), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), catalase (CAT) and acetylcholinesterase (AChE) in the digestive gland of *C. rhizophorae* exposed for 7 days to diesel oil (0.01, 0.1 and 1 ml/L) and submitted to depuration for 24 hours and 7 days. The antioxidant capacity of plasma was also analyzed at the same conditions. The GST activity showed a dose-dependent increase with relation to contaminant concentrations at salinities of 25 and 15. This result indicates a better organism adaptation at these salinities, probably due to a higher filtration rate and energy supplied by food, providing adequate conditions to an efficient xenobiotic conjugation. However, there was no significant difference between the treatments at salinities 35 and 9. The G6PDH, CAT and AChE activities did not present alterations between the groups analysed. Likewise, the antioxidant capacity did not show any response to the treatments tested. The results obtained suggest that GST activity in the digestive gland of *C. rhizophorae* could be used as a biomarker of aquatic diesel oil contamination, particularly at mangrove ecosystems where the input of contaminants is frequently associated with a freshwater influx which reduces the salinity to the 25 and 15 range.

Key words: *Crassostrea rhizophorae*, enzymatic biomarkers, diesel oil, salinity, antioxidant capacity.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Poluição Costeira no Brasil</i>	14
1.2. <i>Crassostrea rhizophorae</i>	15
1.3. <i>Programas de Biomonitoramento</i>	16
1.4. <i>Biomarcadores de Contaminação Aquática</i>	17
1.5. <i>Sistema de Defesa Imunológica</i>	20
1.6. <i>O Efeito da Salinidade sobre os Organismos</i>	22
2. OBJETIVO GERAL	24
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. <i>Coleta dos Animais</i>	25
4.2. <i>Experimento de Laboratório: Salinidade e Óleo Diesel</i>	25
4.3. <i>Amostragem dos Animais</i>	28
4.3.1. <i>Coleta da Hemolinfa e Obtenção do Plasma</i>	28
4.3.2. <i>Coleta da Glândula Digestiva e Obtenção da Fração Citosólica</i>	29
4.4. <i>Análises Enzimáticas</i>	30
4.4.1. <i>Glutathione S-transferase (GST)</i>	30
4.4.2. <i>Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)</i>	31

4.4.3. Catalase (CAT)	31
4.4.4. Acetilcolinesterase (AChE)	32
4.5. Análise da Capacidade Antioxidante do Plasma	32
4.6. Concentração de Proteínas Totais	32
4.7. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Mortalidade de Ostras	34
5.2. Efeitos da Manipulação, Aclimação e Salinidade	34
5.3 Análise dos Biomarcadores Enzimáticos na Glândula Digestiva	38
5.4 Análise da Capacidade Antioxidante do Plasma	47
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*: vista ventral 16
- Figura 2.** Esquema mostrando o processo simplificado de biotransformação, conjugação de xenobióticos e mecanismos de defesa antioxidante enzimático..... 18
- Figura 3.** Estrutura construída para realização do experimento. A) “cama” para suspender as ostras e aquário; B) disposição das ostras no aquário e, C) foto do experimento visualizando os tratamentos..... 26
- Figura 4.** Esquema mostrando a disposição dos grupos experimentais..... 27
- Figura 5.** Coleta da hemolinfa com auxílio de seringa no músculo adutor da ostra *Crassostrea rhizophorae*... 29
- Figura 6.** Coleta da glândula digestiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*.30
- Figura 7.** Atividade específica da (A) Glutathione S-transferase (GST) e (B) Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) na glândula digestiva de *C. rhizophorae* amostradas imediatamente após a coleta (LC) e transporte para o laboratório (Lab), e dos animais controles analisados nos respectivos períodos experimentais em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos..... 36
- Figura 8.** Atividade específica da (A) Catalase (CAT) e (B) Acetilcolinesterase (AChE) na glândula digestiva de *C. rhizophorae* amostradas imediatamente após a coleta (LC) e transporte para o laboratório (Lab), e nos animais controles, analisados nos respectivos períodos experimentais, em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos 37

Figura 9. Atividade específica da Glutathione S-transferase (GST) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.....39

Figura 10. Atividade específica da Glutathione S-transferase (GST) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão. #Indica diferença estatística entre os grupos controle dos animais mantidos na salinidade 9 e os mantidos nas salinidades 35, 25 e 15, respectivamente..... 40

Figura 11. Atividade específica da Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão..... 41

Figura 12. Atividade específica da Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão..... 42

Figura 13. Atividade específica da Catalase (CAT) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão 43

Figura 14. Atividade específica da Catalase (CAT) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão 44

Figura 15. Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho

amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão45

Figura 16. Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão 46

Figura 17. Capacidade antioxidante do plasma de *C. rhizophorae*, analisadas nos animais amostrados imediatamente após a coleta (LC), transporte para o laboratório (Lab), e nos animais controles após os respectivos períodos experimentais, em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos47

Figura 18. Capacidade antioxidante do plasma nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão 48

Figura 19. Capacidade antioxidante do plasma nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representa o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão 49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição Costeira no Brasil

Historicamente, as regiões costeiras são caracterizadas pelo grande número de ocupações humanas que vivem da exploração dos recursos naturais. O Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil (BRASIL, 1996) constatou que cerca de metade da população brasileira reside a não mais que 200 km da costa, totalizando mais de 70 milhões de habitantes.

Segundo CIMA (1991), grande parte dos problemas de degradação dos recursos costeiros está associada às grandes concentrações metropolitanas, industriais e portuárias, sendo que a maioria dos portos brasileiros de maior movimento encontram-se nessas regiões. Tal situação acrescida de despejos de efluentes municipais e industriais, além da poluição proveniente de derramamentos de petróleo e queima de combustíveis fósseis pode gerar um aumento na concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (WALKER *et al.*, 1996).

No Brasil, alguns acidentes com petróleo e seus derivados vêm ocorrendo nos últimos anos, como por exemplo, o derramamento de 1,3 milhão de litros de petróleo na Baía da Guanabara (RJ), em janeiro de 2000, e, em julho do mesmo ano, o vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigui e Iguaçu (PR) (MENICOMI *et al.*, 2002), afetando vários ecossistemas importantes da costa brasileira.

Dentre os diferentes ecossistemas que sofrem com este tipo de contaminação, as áreas de manguezais tem sido freqüentemente atingidas. Devido a baixa dinâmica de ondas inerentes a esse ambiente, o processo de recomposição destas áreas é demorado podendo levar vários anos (KENNISH, 1997).

1.2. *Crassostrea rhizophorae*

O Brasil tem uma das maiores extensões na distribuição de manguezais do mundo, indo do Cabo Orange (AM) até Laguna (SC). Em geral este ecossistema está associado às margens de baías, enseadas, desembocaduras de rios ou diretamente exposto na linha de costa, estando sujeito a inundações periódicas de água do mar e água doce com flutuações abruptas e pronunciadas de salinidade (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999).

A ostra-do-mangue, *C. rhizophorae* (Figura 1), também conhecida como ostra nativa, pertence à família Ostreidae, classe Bivalvia. Habita regiões costeiras e pode ser encontrada fixa às raízes aéreas das vegetações de mangue, ocorrendo também na faixa entre marés dos costões rochosos ou em bancos submersos (QUEIROZ; JÚNIOR, 1990). É uma espécie eurihalina e osmoconformadora, distribuindo-se do Caribe a Santa Catarina, no sul do Brasil. São animais dióicos e ovíparos, mas não apresentam dimorfismo sexual. São filtradores, com capacidade de filtração em torno de 90 a 100 litros de água do mar por dia (CASASBELLAS, 1991).

Muitos autores sugerem a utilização de moluscos bivalves para estudos de monitoramento da contaminação aquática (BAINY *et al.*, 2000; CHEUNG *et al.*, 2001; GOWLAND *et al.*, 2002; NIYOGI *et al.*, 2001a). Estes animais destacam-se por serem organismos sésseis, intertidais, geralmente eurihalinos com ampla distribuição ao longo de costas e estuários em diferentes latitudes. Como são organismos filtradores, podem acumular em seus tecidos uma grande variedade de compostos químicos presentes na água do mar (VIARENGO; CANESI, 1991). No caso da contaminação em regiões estuarinas e manguezais no Brasil, alguns autores têm utilizado a ostra-do-mangue

como organismo sentinela (NASCIMENTO, *et al.*, 2000; REBELO; AMARAL; PFEIFFER, 2003; SILVA *et al.*, 2001; WALLNER-KERSANACH *et al.*, 2000).



Figura 1.: Foto da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*: vista ventral.

1.3. Programas de Biomonitoramento

Programas de biomonitoramento vêm sendo utilizados em diversos países como uma estratégia para prevenir e avaliar impactos causados pelo lançamento de contaminantes no ambiente. Estes estudos têm sido realizados através da utilização de organismos sentinelas coletados no próprio local de análise, ou mesmo, através de animais transplantados de locais referência (controle) para ambientes contaminados. O programa *Mussel Watch* realizado nos Estados Unidos e o Programa para Avaliação e Controle da Poluição na Região do Mediterrâneo (MED-POL), propõem a utilização de moluscos bivalves como organismos sentinelas (BURGEOT *et al.*, 1996; CAJARAVILLE, *et al.*, 2000; RAND, 1995).

Considerando a intensa atividade de exploração de petróleo e seus derivados no litoral brasileiro, existe a necessidade do estabelecimento de metodologias e escolha de

organismos sentinela adequados para avaliar a contaminação costeira causada por este tipo de poluição.

Uma das formas de avaliar o impacto de contaminantes sobre um ambiente é através da análise da resposta bioquímica (biomarcadores) que os organismos residentes manifestam decorrentes da exposição aos xenobióticos (NARBONNE *et al.*, 1999). O Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES, 2003) tem recomendado que programas de biomonitoramento incorporem a realização de análises de biomarcadores bioquímicos e incentivado o estudo sobre novos biomarcadores.

1.4. Biomarcadores de Contaminação Aquática

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações a nível celular, bioquímico ou fisiológico que expressem a exposição e/ou efeito tóxico causado pelos xenobióticos presentes no ambiente (WALKER *et al.*, 1996). Essas alterações moleculares podem nos fornecer informações antecipadas dos efeitos destas substâncias sobre os organismos.

Entre os biomarcadores mais utilizados e recomendados estão as enzimas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos, pois estas fornecem informações importantes a respeito da capacidade de defesa dos organismos, bem como da capacidade de biotransformação dos compostos tóxicos (BURGEOT *et al.*, 1996).

Entre as fases do metabolismo de xenobióticos podemos citar as reações de Fase I (biotransformação) e de Fase II (conjugação). A primeira fase envolve reações de oxidação, redução e hidrólise, através de várias reações de monooxigenases, sendo catalisada pela família de enzimas citocromo P450, também conhecida como oxidases de função mista (MFO), ou pelas flavinas monooxigenases (FMO). Os produtos

formados podem ser convertidos a dihidrodióis e/ou conjugados através de reações de conjugação catalisadas por diferentes tipos de enzimas, com a finalidade de promover um aumento na hidrossolubilidade destes compostos, facilitando sua excreção (LIVINGSTONE, 1985). Entre as enzimas de conjugação, destaca-se a glutathione S-transferase (GST), que catalisa a conjugação do tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) com os metabólitos da Fase I. Portanto, para que não haja um comprometimento deste mecanismo de detoxificação, é necessária a manutenção de níveis normais de GSH intracelular. Algumas enzimas participam da síntese de glutathione, enquanto outras auxiliam na reciclagem de glutathione oxidada, produzida fisiologicamente durante o metabolismo (TIMBRELL, 1991) (Figura 2).

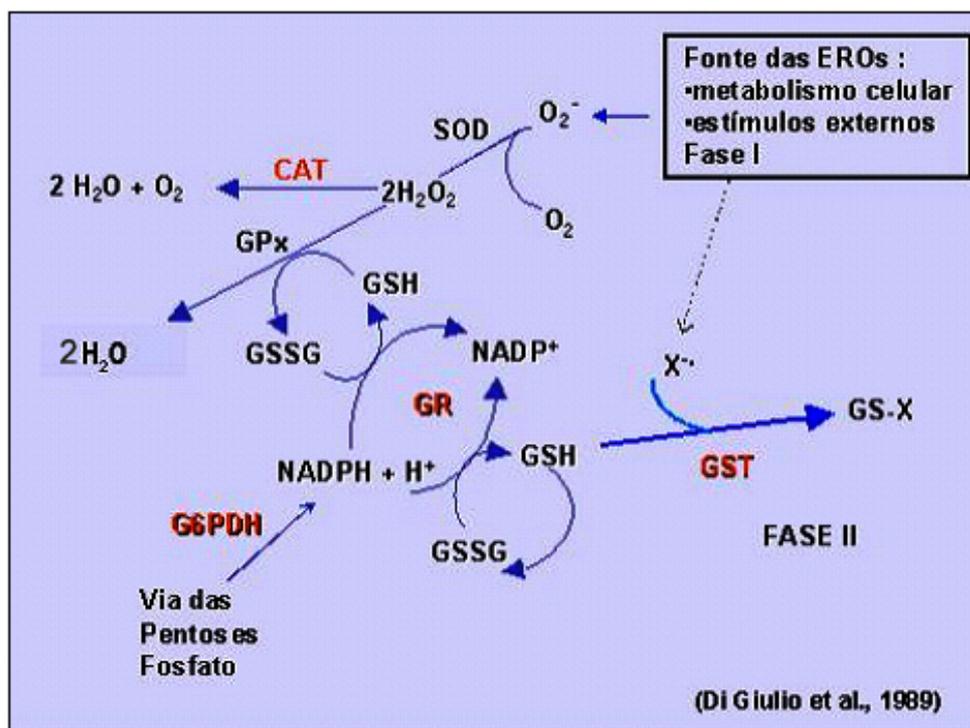


Figura 2.: Esquema mostrando o processo simplificado de biotransformação, conjugação de xenobióticos e mecanismos de defesa antioxidante enzimático.

Durante o processo de biotransformação pode ocorrer um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) como sub-produto do ciclo catalítico do sistema citocromo P450. Estas EROs podem reagir com as biomoléculas desencadeando processos como a lipoperoxidação, oxidação de bases de DNA, inativação de enzimas e degradação de proteínas, podendo levar a morte celular (TIMBREL, 1991). A extensão do dano causado por estes compostos depende da eficiência dos sistemas de defesa antioxidante e de conjugação dos xenobióticos (WINSTON; LIVINGSTONE; LIPS, 1990).

O sistema de defesa antioxidante enzimático pode prevenir a formação das EROs, através da sua degradação. A superóxido dismutase (SOD) dismuta o O_2^- em H_2O_2 , que pode ser decomposto em água e oxigênio pela catalase (CAT) ou pela glutathione peroxidase (GPx) (SIES, 1993).

Caso estas enzimas estejam com baixa atividade, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidante celular denominado estresse oxidativo. Estas alterações podem ser quantificadas estimando-se valores de parâmetros bioquímicos, como a atividade enzimática, sendo que suas alterações podem ser utilizadas para avaliar o estado fisiológico dos animais (VIARENGO; CANESI, 1991).

Diversos trabalhos têm demonstrado uma relação entre a exposição de contaminantes e a atividade de enzimas biomarcadoras. Estudo realizado por Gowland *et al.* (2002) mostraram que a atividade da GST na glândula digestiva de mexilhões está relacionada à presença de hidrocarbonetos aromáticos de elevado peso molecular. Pandey *et al.* (2003) observaram um aumento na atividade das enzimas GR, GPx, SOD, G6PDH, GSH e peroxidação lipídica em peixes da espécie *Wallago attu*,

provenientes de um local com elevada atividade industrial e lançamento de pesticidas. Cancio *et al.* (1997) demonstraram que óleos lubrificantes ativaram a atividade da CAT em *Mytilus galloprovincialis*.

Outro biomarcador muito utilizado é a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina que é liberado nas sinapses nervosas e na junção neuromuscular. Sua inibição pode resultar em uma transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos (STEGEMAN *et al.*, 1992). Sabe-se que esta enzima pode ser inibida na presença de pesticidas organofosforados e carbamatos, mas também já foi descrita a sua inibição na presença de hidrocarbonetos aromáticos (PAYNE *et al.*, 1996). Estudo comparativo entre o mexilhão *Perna perna* e a ostra *Crassostrea rhizophorae* demonstrou uma maior sensibilidade em relação à inibição da AChE da ostra quando exposta ao carbamato Furadan (ALVES *et al.*, 2002).

1.5. Sistema de Defesa Imunológica

O sistema de defesa imune dos invertebrados parece estar restrito a uma imunidade inata ou natural, presente na hemolinfa, que é constituída por células circulantes ou hemócitos, e por uma parte líquida ou plasma (VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001).

Os hemócitos podem ser subdivididos em duas categorias celulares: hemócitos hialinos (HH), que são desprovidos de grânulos, e os hemócitos granulares (HG) que contêm abundantes grânulos citoplasmáticos e que parecem ser as células imunologicamente mais reativas (VARGAS-ALBORES; BARRACO, *op. cit.*; BARTH, 2002). Estas células são responsáveis pela fagocitose de microorganismos invasores e

o encapsulamento de partículas de grande tamanho (VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001). Segundo Hine (1999) a composição e a função dos hemócitos pode variar muito entre indivíduos coletados em diferentes épocas do ano, em diferentes locais, ou através de mudanças da temperatura e salinidade.

Na fração plasmática algumas proteínas estão envolvidas nas reações de defesa do organismo tais como as lectinas, peptídeos antimicrobianos e cascatas proteolíticas (VARGAS-ALBORES; BARRACO, *op. cit.*). Outro mecanismo de defesa conhecido como “*burst*” respiratório é responsável pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são potentes microbicidas. Este mecanismo está associado à ativação da NADPH oxidase na membrana celular que catalisa a redução do oxigênio molecular para formar o ânion superóxido (O_2^-). Outras EROs podem ser geradas a partir deste sistema, atuando na degradação de microorganismos invasores, mas também podendo produzir danos no tecido do organismo. Desta maneira, algumas enzimas antioxidantes e compostos de baixo peso molecular (*scavengers*) estão presentes na hemolinfa para fornecer proteção contra as EROs (VARGAS-ALBORES; BARRACO, *op. cit.*).

Um trabalho de caracterização dos hemócitos da ostra *Crassostrea rhizophorae* (BARTH, 2002), confirmou a capacidade fagocítica dos hemócitos bem como a produção de EROs por estas células. Os contaminantes também podem exercer efeitos tóxicos sobre um organismo afetando o equilíbrio homeostático e o sistema imune. Portanto, o sistema imunológico dos bivalves pode sofrer alterações devido a presença de contaminantes e seu estudo pode ser utilizado como indicativo de condições ambientais adversas (MEDEIROS, 1996).

1.6. O Efeito da Salinidade sobre os Organismos

Muitos autores têm demonstrado mecanismos de adaptação e efeitos fisiológicos de organismos aquáticos frente a variações na salinidade. Estudos realizados com o mexilhão *Perna perna* (SALOMÃO; MAGALHÃES; LUNETTA, 1980) e o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (LEONEL; MAGALHÃES; LUNETTA, 1983), mostraram que em baixas salinidades estes organismos apresentaram uma maior mortalidade quando comparados aos animais mantidos em salinidades intermediárias. Os animais que permaneceram em baixa salinidade mantiveram-se isolados do meio através do fechamento das valvas. No mexilhão *P. perna* o fluido perivisceral manteve-se em concentrações de salinidade superiores às encontradas no meio externo, indicando uma adaptação deste organismo às variações de salinidade e desta forma, uma maior sobrevivência nesse ambiente (SALOMÃO; MAGALHÃES; LUNETTA, *op cit.*). Guzinski (1996) observou que o melhor crescimento para *Crassostrea rhizophorae* situou-se na faixa da salinidade 32, e que em baixas salinidades o crescimento torna-se prejudicado.

Outros estudos têm relacionado o aumento da toxicidade de alguns compostos em diferentes organismos com variações na salinidade. Wang, Grisle e Schlenk (2001) observaram um aumento na atividade e expressão do RNAm da flavina monooxigenase (FMO), pertencente a Fase I da biotransformação em *Oncorhynchus mykiss*, associado à maior toxicidade do inseticida Aldicarb e inibição da colinesterase, nos peixes mantidos em salinidades mais elevadas. Tendengren e Kautsky (1987) demonstraram que nos mexilhões *Mytilus edulis* do mar Báltico que vivem em salinidades baixas, o efeito do óleo diesel agiu sinergicamente com a salinidade, sugerindo que a sensibilidade deste mexilhão ao óleo diesel é dependente da salinidade encontrada no ambiente. Um trabalho realizado por Zanette *et al.* (2002), demonstraram uma maior

inibição da atividade da AChE na brânquia de ostras *C. rhizophorae* expostas ao inseticida carbofuran quando mantidas em salinidade 35, sendo que esta diferença não foi observada nos animais mantidos nas salinidades 25, 15 e 7. Os autores sugerem que a salinidade pode influenciar a toxicidade deste contaminante para a ostra-do-mangue.

A avaliação da influência de parâmetros ambientais, como a salinidade, na resposta de biomarcadores moleculares torna-se de fundamental importância para os organismos que habitam ambientes eurihalinos, principalmente quando nestes ambientes pode ocorrer a contaminação por diferentes compostos.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da salinidade sobre biomarcadores de contaminação aquática em glândula digestiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* expostas a diferentes concentrações de óleo diesel e avaliar a sua depuração.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), catalase (CAT) e acetilcolinesterase (AChE), na glândula digestiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* exposta a diferentes concentrações de óleo diesel, em diferentes salinidades.
- ❖ Analisar a capacidade antioxidante do plasma na ostra-do-mangue *C. rhizophorae* exposta a diferentes concentrações de óleo diesel em diferentes salinidades.
- ❖ Avaliar a resposta destes biomarcadores em ostras submetidas a depuração em dois períodos, 24 horas e 7 dias, após exposição ao óleo diesel nas diferentes salinidades.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta dos Animais

Os exemplares de ostras-do-mangue (*C. rhizophorae*) foram obtidos do cultivo experimental mantido na praia do Sambaqui, junto ao Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM/Sambaqui) no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC). Ostras adultas, sem distinção de sexo, com tamanho entre 60 e 80 mm, foram selecionadas, lavadas com jatos de água e suas incrustações foram retiradas. Posteriormente os animais foram transportados para o Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da Barra da Lagoa (LCMM/Barra da Lagoa) onde foi realizado o experimento.

No momento da coleta na praia do Sambaqui e após o transporte até o laboratório da Barra da Lagoa, foram amostrados cinco indivíduos em cada tempo com o objetivo de verificar os efeitos da manipulação e transporte dos animais na atividade das enzimas analisadas.

4.2. Experimento de Laboratório: Salinidade e Óleo Diesel

No laboratório, as ostras foram mantidas em 16 aquários (20 L), com água do mar filtrada, tratada com UV e aeração constante. Os animais, 16 indivíduos em cada aquário, foram colocados sobre uma estrutura suspensa (cama) dentro do aquário para evitar o contato direto com as fezes (Figura 3). Para a realização do experimento, os aquários foram divididos em 4 grupos experimentais com um conjunto de 4 aquários, onde cada grupo experimental permaneceu nas salinidades 35, 25, 15 e 9 (Figura 4).

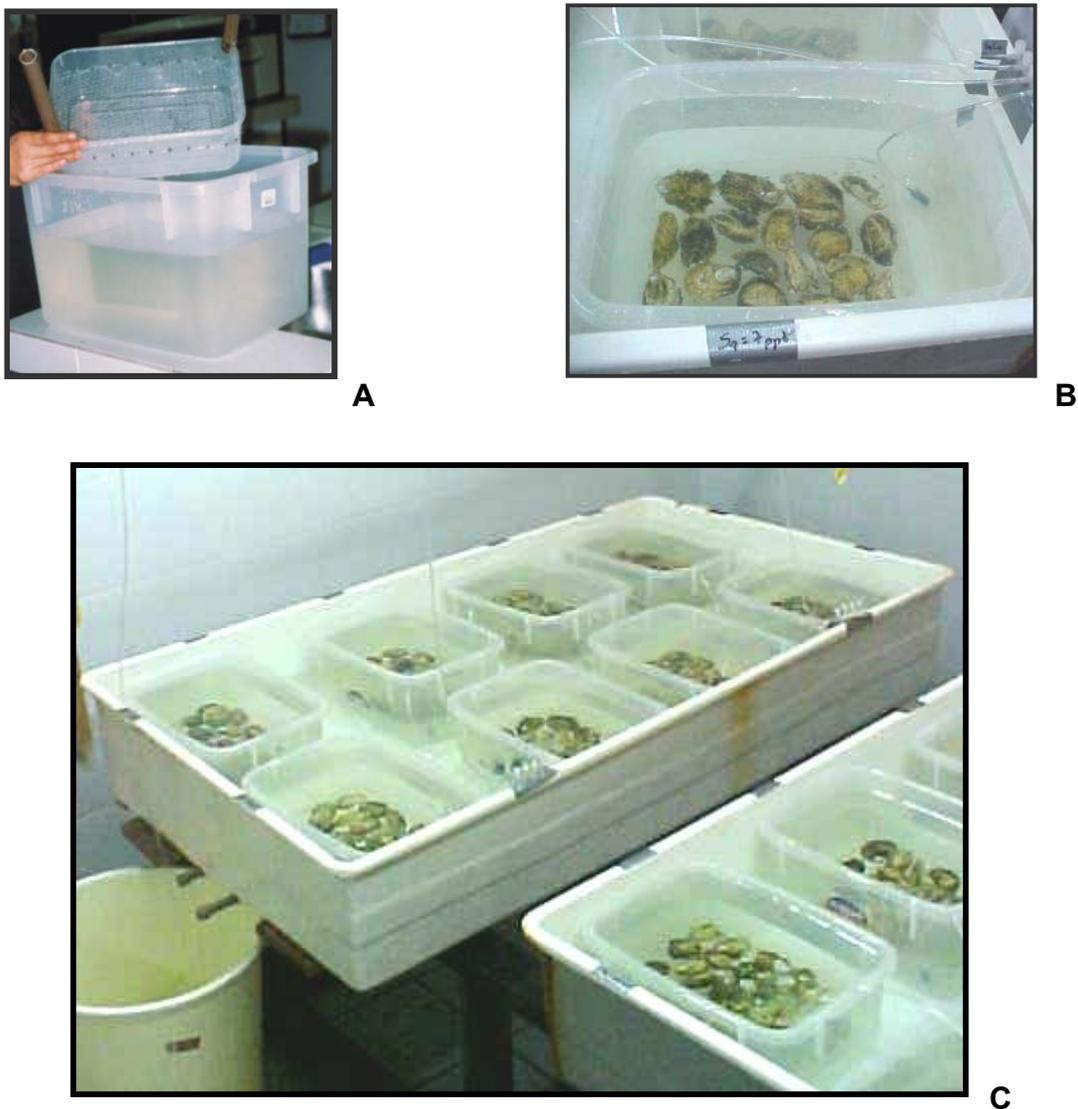


Figura 3.: Estrutura construída para realização do experimento. A) “cama” para suspender as ostras e aquário; B) disposição das ostras no aquário e, C) foto do experimento visualizando os tratamentos.

Durante o período de aclimação (adaptação dos animais às condições de laboratório) de 16 dias, a salinidade inicial de 35 foi gradualmente reduzida aos valores de salinidade determinados para o experimento, sendo que a cada diminuição da salinidade (de 35 para 25, depois de 25 para 15 e de 15 para 9) os animais permaneciam durante 4 dias em cada salinidade para minimizar o estresse. A

salinidade mais baixa utilizada no experimento foi 9, com base na observação visual de que abaixo deste valor os animais não se alimentavam e nem excretavam.

Após a aclimatação, as ostras foram expostas ao óleo diesel durante 7 dias. Em cada grupo experimental, o óleo diesel nas concentrações de 0,01 ml/L, 0,1 ml/L e 1 ml/L foi adicionado com o auxílio de uma pipeta em três aquários, sendo que um aquário permaneceu sem óleo diesel (controle) (Figura 4). O óleo utilizado foi adquirido em um posto de gasolina BR da Petrobras.



Figura 4.: Esquema mostrando a disposição dos grupos experimentais.

Após o período de exposição, as ostras foram mantidas em aquários com água limpa sem a presença do óleo diesel, iniciando a depuração dos animais por 24 horas e durante 7 dias. Os animais utilizados para as análises bioquímicas foram coletados em 4 momentos, sendo estes:

Períodos	N / Tratamento	N Total
Aclimatação	5	20
Exposição	5	80
Depuração 24 hs	5	80
Depuração 7 dias	5	80

Durante todo o período experimental foi realizada diariamente a troca de água dos aquários de modo a não permitir o acúmulo de fezes e a evaporação da água, o que poderia alterar as condições do experimento. Durante a exposição, as concentrações de óleo diesel foram repostas diariamente, junto com a troca de água. A temperatura da água do experimento foi mantida em $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As ostras foram alimentadas duas vezes ao dia com uma mistura das microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*, cultivadas no LCMM e usualmente utilizadas como alimento para as ostras mantidas neste laboratório.

4.3. Amostragem dos Animais

4.3.1. Coleta da Hemolinfa e Obtenção do Plasma

Foi feita a biometria e a coleta de material biológico nos animais amostrados ao final de cada período experimental.

A hemolinfa foi obtida individualmente pela inserção de agulha acoplada a uma seringa de 3 ml no músculo adutor posterior (Figura 5). A hemolinfa foi coletada em solução anticoagulante Alsever modificado por Bachère *et al.* (1988) (NaCl 338 mM, Glicose 115 mM, EDTA 10 mM, Citrato de Sódio 30 mM, pH 7,0) na proporção 1:1 (v:v), e mantida à -80°C .

Para obtenção da fração plasmática, a hemolinfa coletada foi centrifugada a 1.500 rpm por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante mantido a -80°C , para posterior análise.



Figura 5.: Coleta da hemolinfa com auxílio de seringa no músculo adutor da ostra *Crassostrea rhizophorae*.

4.3.2. Coleta da Glândula Digestiva e Obtenção da Fração Citosólica

As ostras foram dissecadas e sua glândula digestiva retirada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (-185°C) para preservação da atividade enzimática no tecido (Figura 6).

Posteriormente, as amostras de glândula digestiva foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 M, DTT 1 mM, PMSF 0,1 M, pH 7,6, na proporção 1:4 (v:v), utilizando o homogeneizador “Tissue tearor” (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado foi centrifugado a 9.000 g por 30 minutos a 4°C, para obtenção da fração S9 (sobrenadante) sendo congelado imediatamente a - 80°C para posterior análise enzimática.

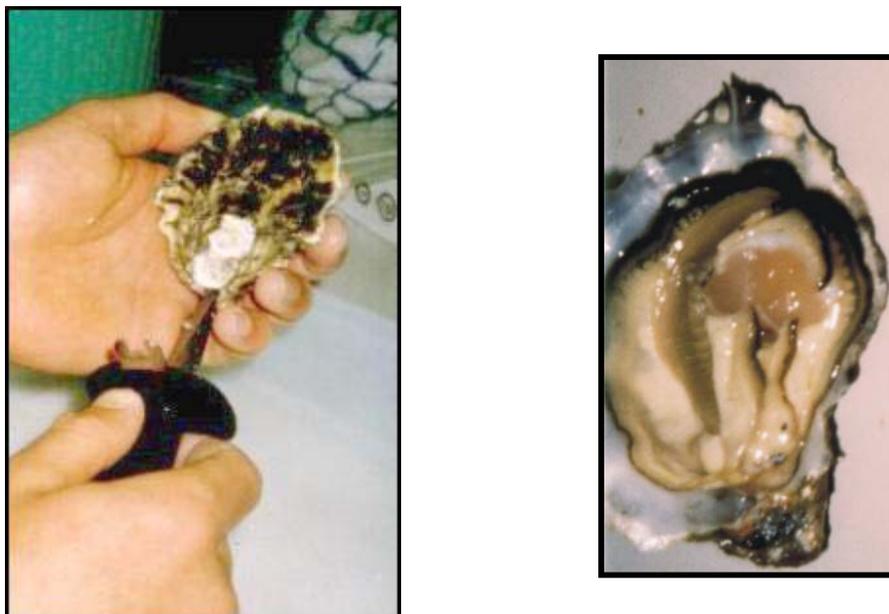


Figura 6.: Coleta da glândula digestiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*.

4.4. Análises Enzimáticas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB / UFSC).

4.4.1. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase (GST - EC 2.5.1.18) foi determinada pelo método descrito por Keen *et al.*, 1976 para ensaio com CDNB adaptada para microplaca TECAN-Sunrise®, a 340 nm à 30°C. Em cada poço da microplaca foi adicionado 10µL de homogeneizado de glândula digestiva (amostra), 45 µL de solução de trabalho CDNB 1mM (10 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno diluído em tampão fosfato de potássio 0,1 M) e 45 µL de glutathione reduzida 1mM (GSH) diluída em tampão

fosfato de potássio 0,1 M, pH 7. A dosagem foi realizada em triplicatas e a atividade da enzima foi expressa em μmol por minuto por miligrama de proteína.

4.4.2. Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

O método que calcula a atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH - EC 1.1.1.49), descrito por Glock & McLean (1953), foi adaptado para microplaca TECAN-Sunrise®. Este método baseia-se na redução de NADP^+ à NADPH por esta enzima, sendo seu aumento monitorado a 340 nm à 30°C. O meio de reação foi composto por Cloreto de Magnésio 0,2 M, NADP^+ e Glicose-6-Fosfato (substrato) diluídos em Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4. Em cada poço da microplaca foi adicionado 20 μL de homogeneizado de glândula digestiva (amostra) diluído 5 vezes e 80 μL do meio de reação, resultando em um volume final igual a 100 μL . Para cada amostra foi feito um branco sem o substrato da enzima (G6P). Todas as amostras foram dosadas em triplicatas. A atividade da G6PDH foi expressa em μmol por minuto por miligrama de proteína.

4.4.3. Catalase (CAT)

A técnica utilizada para medir a atividade da catalase (CAT - EC 1.11.1.6) foi descrita por Beutler (1975), a qual quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, através do decréscimo de absorbância à 240 nm à 30°C. O meio de reação contém 10 mM H_2O_2 , 0,1 M Tris e 0,5 mM EDTA em pH 8,0. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína, onde U corresponde a 1 μmol de substrato decomposto por minuto.

4.4.4. Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7) foi quantificada pelo método proposto por Ellman *et al.* (1961), que se baseia na reação entre o produto da hidrólise do substrato acetiltiocolina (AtChI 0,3mM), tiocolina, com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), em pH 8,0, monitorado a 412 nm durante 3 minutos a 30°C. A atividade da AChE na fração S9 foi expressa em μmol de produto formado por minuto por miligrama de proteína.

4.5. Análise da Capacidade Antioxidante do Plasma

A capacidade antioxidante do plasma foi determinada com base no método descrito em Gutteridge & Quinlan (1993). O método baseia-se na capacidade do plasma (30 μL) em inibir a degradação da desoxirribose (10mM) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2 8,8 mM), na presença de ferro (Fe 1mM) e ácido ascórbico (7,5 mM) em tampão fosfato (0,08 M, pH 7,4). Após 1 hora de reação a 37°C em banho-maria, são adicionados o ácido tiobarbitúrico (TBA 1%) e o ácido tricloroacético (TCA 2,8%), reagindo por 15 minutos, à 95°C. A leitura é feita em espectrofotômetro à 532nm.

A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição em relação à degradação total da desoxirribose.

4.6. Concentração de Proteínas Totais

A dosagem de proteínas totais presentes no plasma da hemolinfa e no citosol da glândula digestiva foi determinada de acordo com a técnica descrita por Lowry

modificada por Peterson (1977), utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

4.7. Análise Estatística

Os dados das atividades enzimáticas e da capacidade antioxidante do plasma em cada tratamento dos grupos experimentais foram analisados quanto a aderência à distribuição normal. Para cada atividade enzimática, os animais coletados na praia do Sambaqui foram comparados com aqueles após a chegada ao laboratório, através do teste t de Student para variáveis independentes. Para o período experimental, as concentrações de óleo diesel foram comparados entre si e ao longo do tempo em cada salinidade através da análise de variância (ANOVA) de duas vias complementada pelo teste Tukey de comparações múltiplas, para $p < 0,05$ (Zar, 1984).

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidade de ostras

O comprimento médio dos organismos amostrados foi de $68,4 \pm 8$ mm e o peso total médio de $34,9 \pm 13,5$ g, sendo que não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Durante o período experimental, foi observado um elevado número de mortalidade de ostras entre os animais que foram expostos a maior concentração de óleo diesel (1 ml/L), principalmente na salinidade 35. Observou-se a mortalidade de 4 animais durante o período de exposição, 2 durante a depuração de 24 horas e 3 durante os 7 dias de depuração. Na salinidade 15 foi registrada apenas a mortalidade de 1 indivíduo durante a exposição na maior concentração de óleo diesel (1ml/L). Nas salinidades 25 e 9 não foram observadas mortalidades dos animais, assim como nos animais controle e nas concentrações de óleo diesel 0,01 e 0,1 ml/L.

5.2. Efeitos da Manipulação, Aclimação e Salinidade

A manipulação das ostras durante a coleta (LC) e posterior transporte dos animais para o laboratório (Lab), aumentou significativamente a atividade da GST ($p=0,005$) e da G6PDH ($p=0,01$) nos animais analisados antes do período de aclimação (Figura 7a e 7b), quando comparado com os animais amostrados logo após a coleta. Por outro lado, a atividade das enzimas CAT e AChE (Figura 8) não foram afetadas.

Após a aclimação de 16 dias, os animais mantidos nas salinidades de 15 ($p=0,043$) e 9 ($p=0,02$) apresentaram, respectivamente, uma atividade da GST 3,3 e 3,6 vezes maior que os animais coletados na Praia do Sambaqui (LC) (Figura 7a). Da mesma forma, foi observada uma atividade da G6PDH 2,2 vezes maior nas ostras que permaneceram nas salinidades de 25 ($p=0,013$) e 35 ($p=0,035$) após a aclimação (Figura 7b), quando comparadas às do LC.

Por outro lado, foi observada uma diminuição significativa na atividade da GST entre os animais controles analisados após a aclimação e após a exposição, mantidos nas salinidades 25 e 15 (Figura 7a).

De uma maneira geral, a atividade da GST nos animais mantidos na salinidade 9 foi maior que os animais que permaneceram nas demais salinidades (Figura 7a). No entanto, estas diferenças foram estatisticamente significativas, respectivamente, nos animais analisados após o período de exposição e depuração 24h.

Tanto a atividade da CAT, como a da AChE não foram alteradas nos grupos controles após a aclimação dos animais às diferentes salinidades, bem como após 7 dias de exposição, 24 horas e 7 dias de depuração (Figura 8a e 8b).

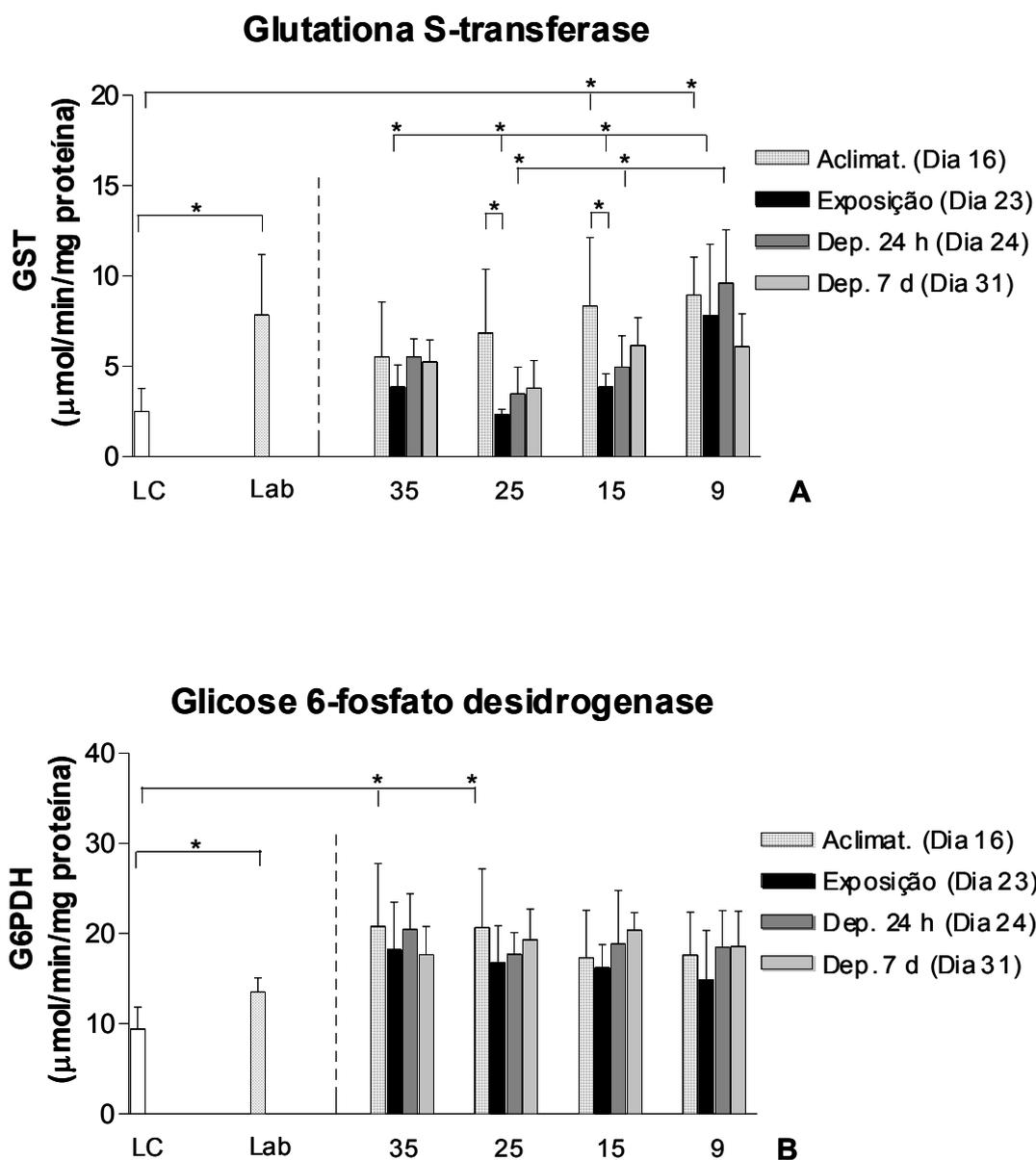


Figura 7.: Atividade específica da (A) Glutationa S-transferase (GST) e (B) Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) na glândula digestiva de *C. rhizophorae* amostradas imediatamente após a coleta (LC) e transporte para o laboratório (Lab), e dos animais controles analisados nos respectivos períodos experimentais em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos.

* indica diferença significativa para $p < 0,05$.

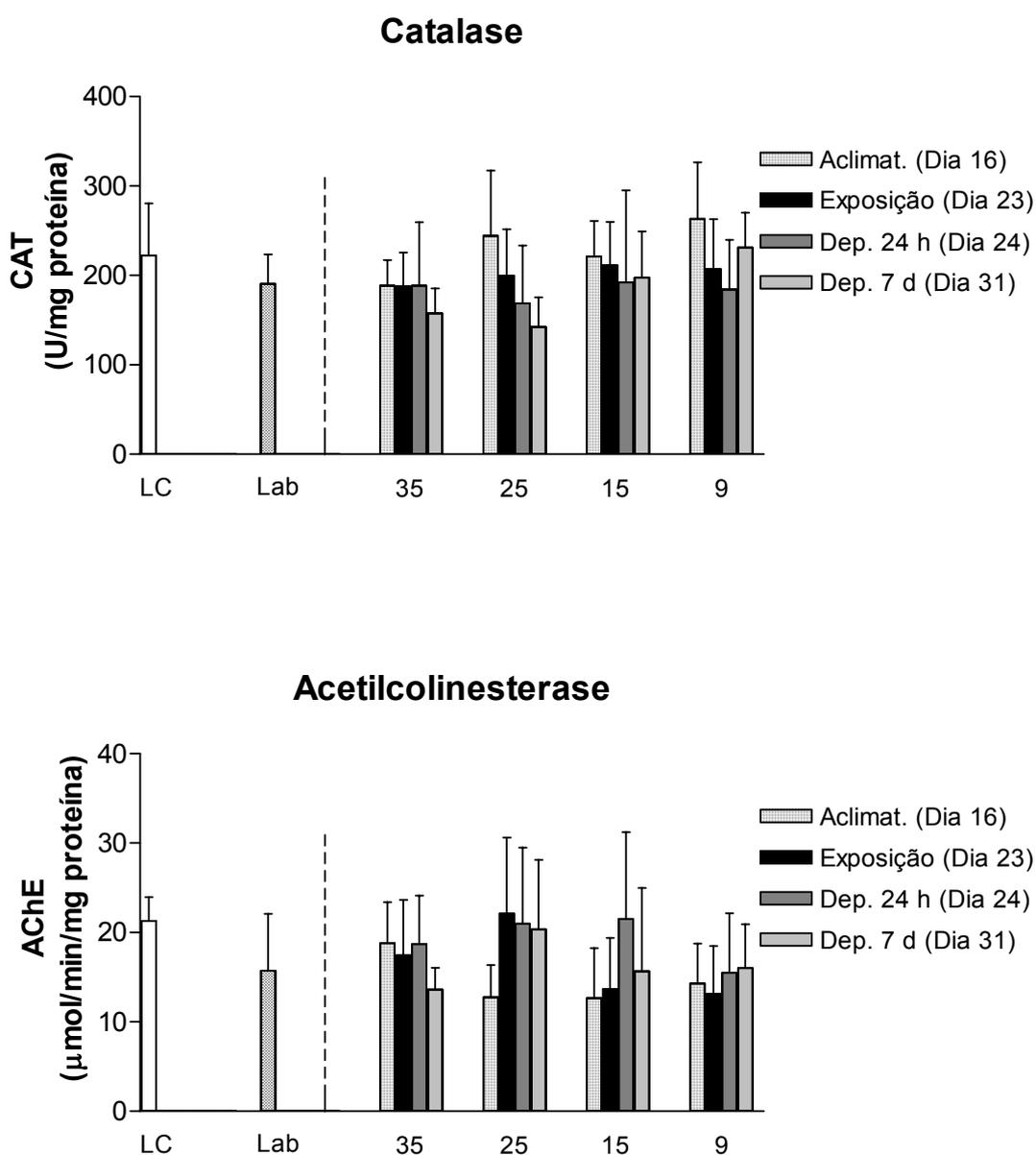


Figura 8.: Atividade específica da (A) Catalase (CAT) e (B) Acetilcolinesterase (AChE) na glândula digestiva de *C. rhizophorae* amostradas imediatamente após a coleta (LC) e transporte para o laboratório (Lab), e nos animais controles, analisados nos respectivos períodos experimentais, em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos.

5.3. Análise dos Biomarcadores Enzimáticos na Glândula Digestiva

As atividades da GST na glândula digestiva das ostras coletadas, respectivamente, após os períodos de aclimação, exposição e os dois períodos de depuração nas diferentes salinidades testadas, podem ser observadas nas Figuras 9 e 10. Os animais expostos ao óleo diesel e mantidos nas salinidades 25 e 15 (Figuras 9b e 10a) apresentaram um aumento da atividade da GST proporcional a concentração de óleo em que foram expostos ($r= 0,73$ e $0,67$). Após o período de depuração de 24 horas, a atividade da GST nos animais expostos ao óleo diesel, nestas salinidades, apresentaram o mesmo perfil, no entanto sem diferença significativa do controle (Figuras 9b e 10a). Mesmo após 7 dias de depuração, na salinidade 25, as ostras expostas às maiores concentrações de óleo diesel ainda apresentaram uma atividade da GST maior em relação ao grupo não exposto, porém, sem diferença significativa ($p=0,53$).

As ostras expostas às diferentes concentrações de óleo diesel e mantidas nas salinidades de 35 e 9 não apresentaram alterações na atividade da GST (Figuras 9a e 10b).

Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade das enzimas G6PDH, CAT e AChE na glândula digestiva das ostras expostas às diferentes concentrações de óleo diesel, nas diferentes salinidades (Figuras 11 a 16). Da mesma forma, não foram verificadas modificações na atividade destas enzimas, tanto nos animais depurados por 24 horas, como nos animais depurados por 7 dias, nas diferentes salinidades (Figuras 11 a 16).

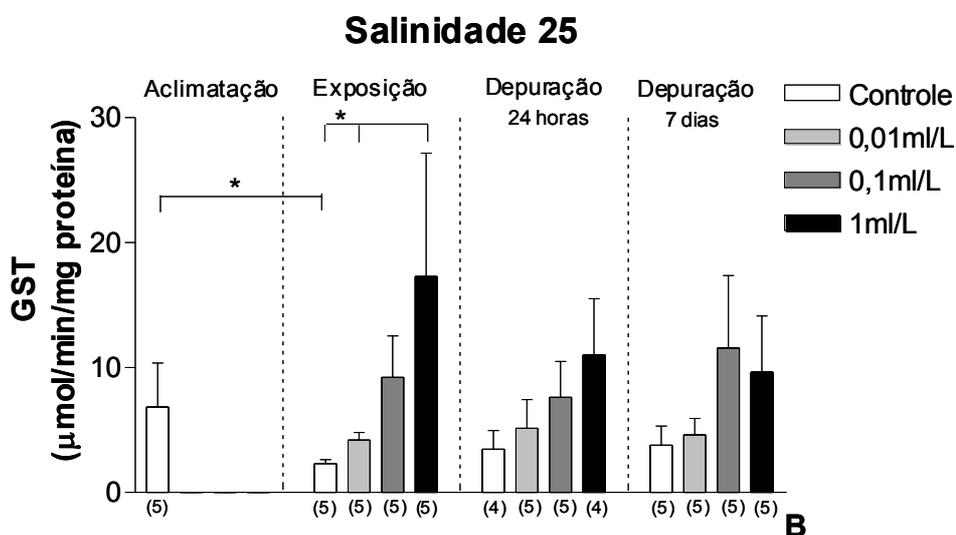
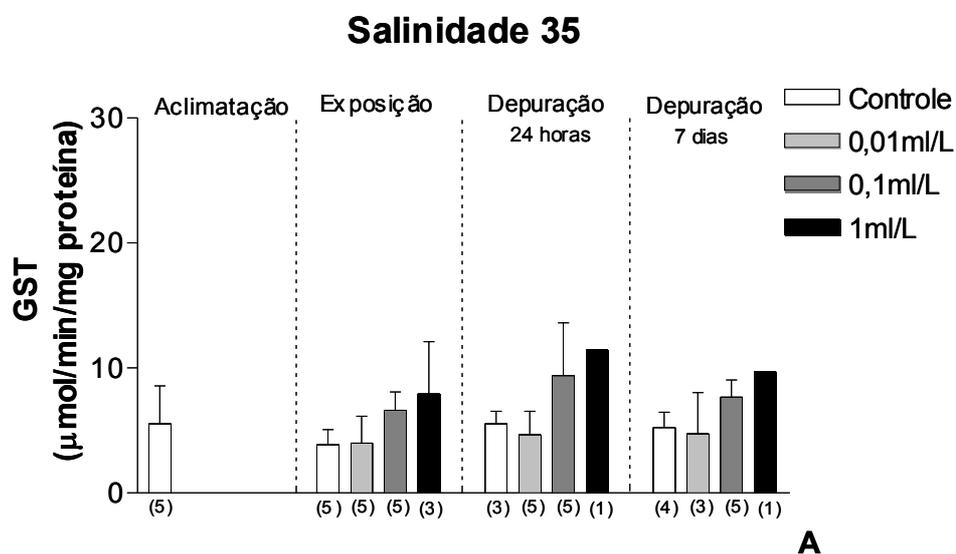


Figura 9.: Atividade específica da Glutationa S-transferase (GST) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

* indica diferença estatística ($p < 0,05$).

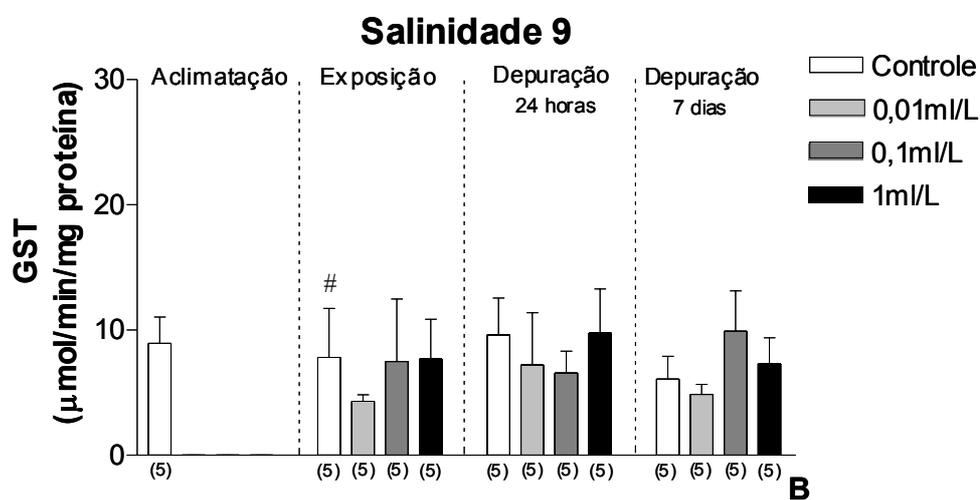
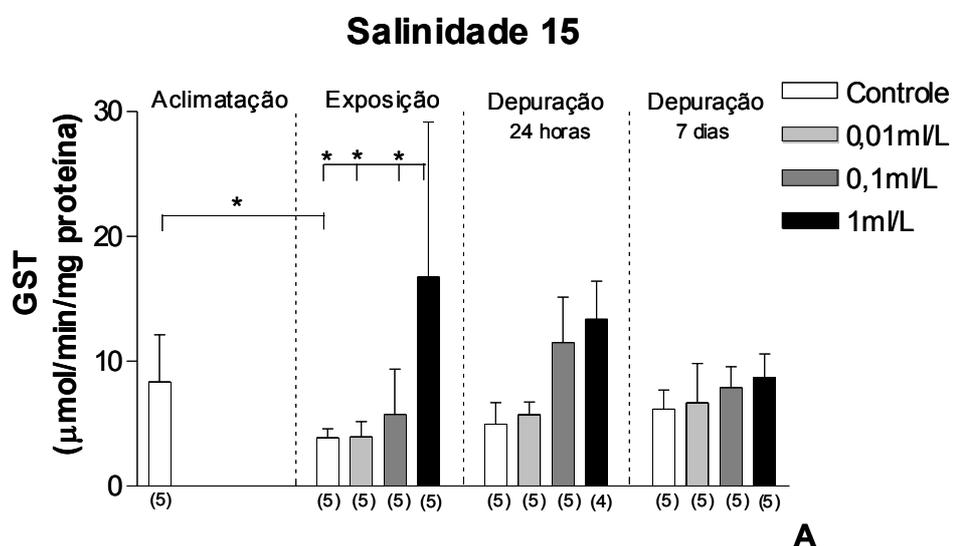


Figura 10.: Atividade específica da Glutathiona S-transferase (GST) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão. * indica diferença estatística ($p < 0,05$). #Indica diferença estatística entre os grupos controle dos animais mantidos na salinidade 9 e os mantidos nas salinidades 35, 25 e 15, respectivamente.

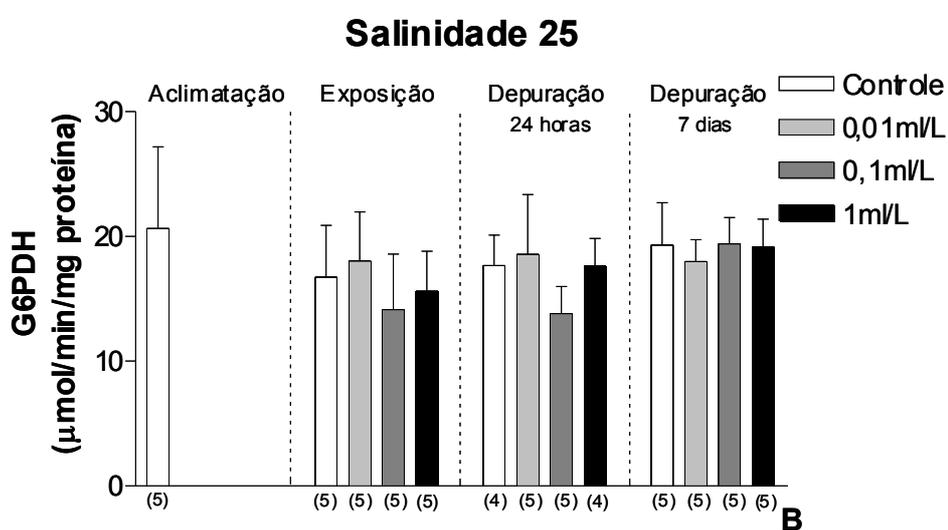
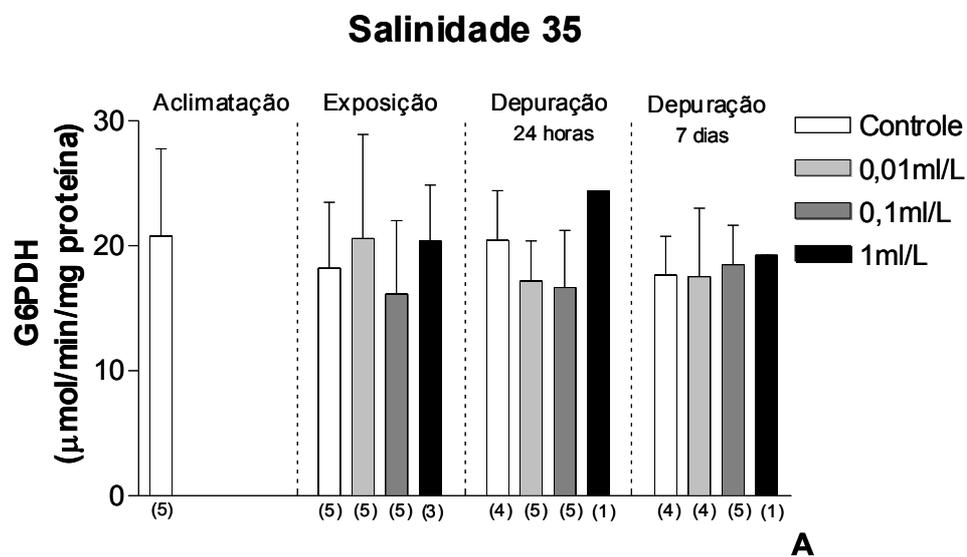


Figura 11.: Atividade específica da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

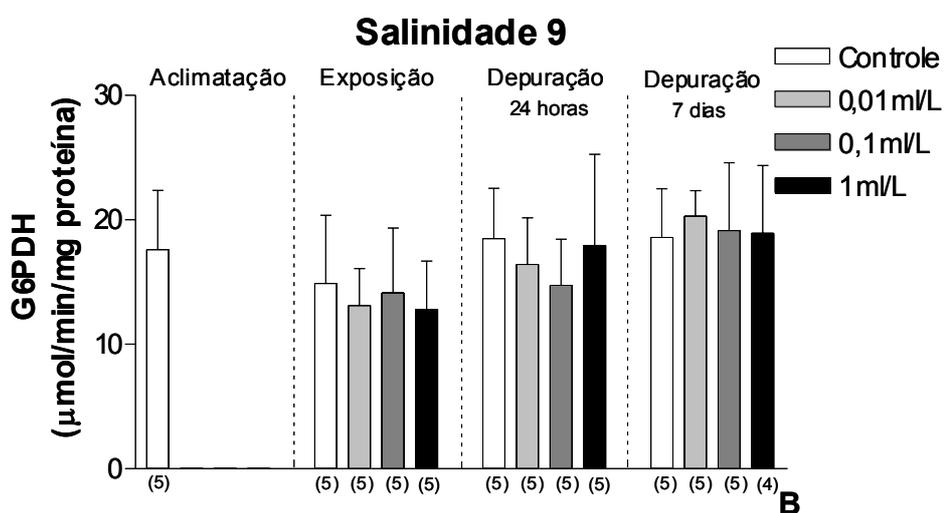
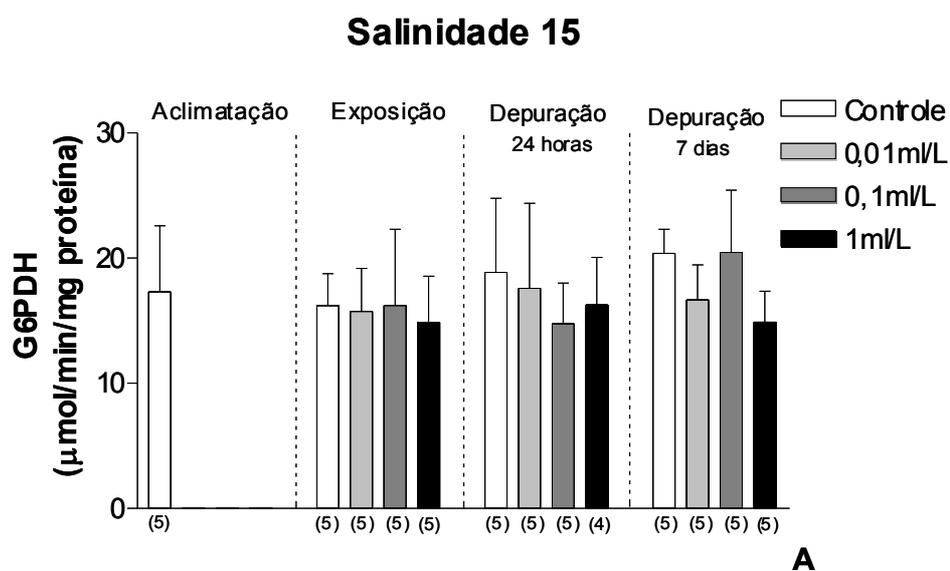


Figura 12.: Atividade específica da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

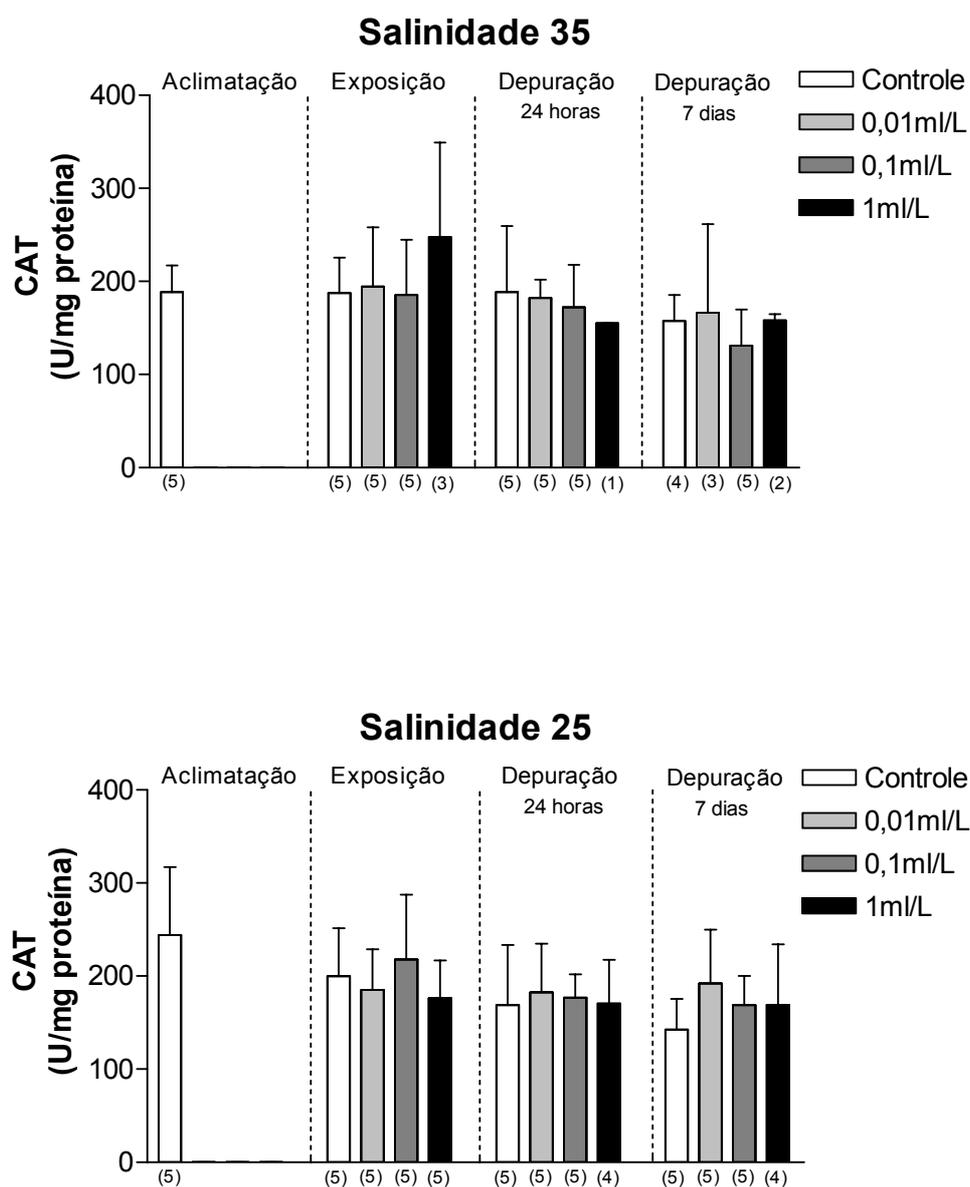


Figura 13.: Atividade específica da Catalase (CAT) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

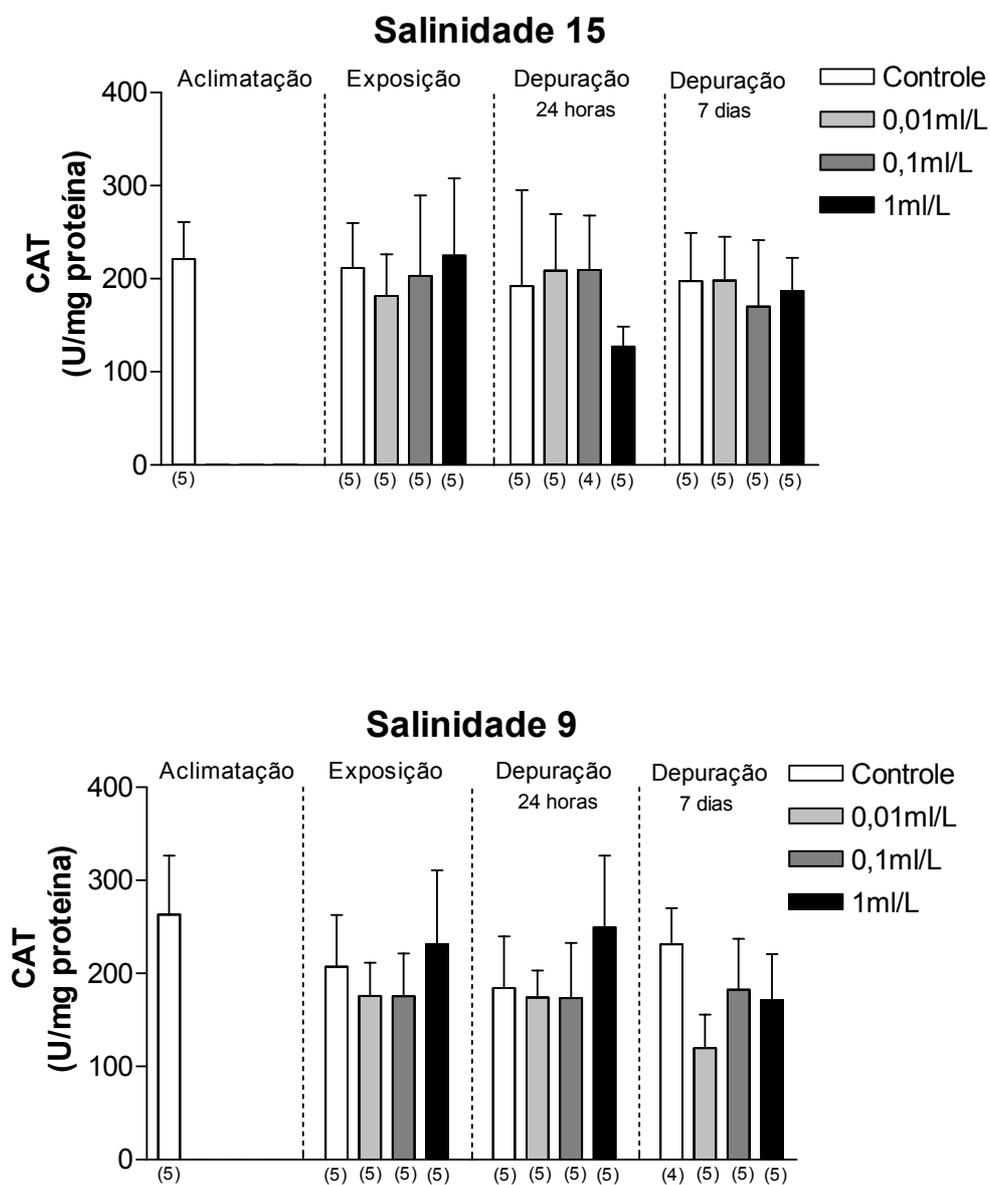


Figura 14.: Atividade específica da Catalase (CAT) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

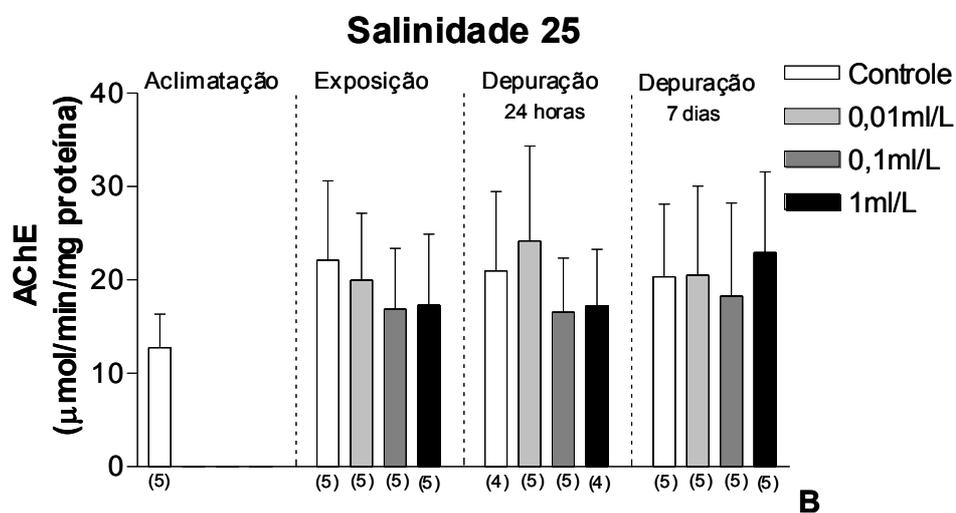
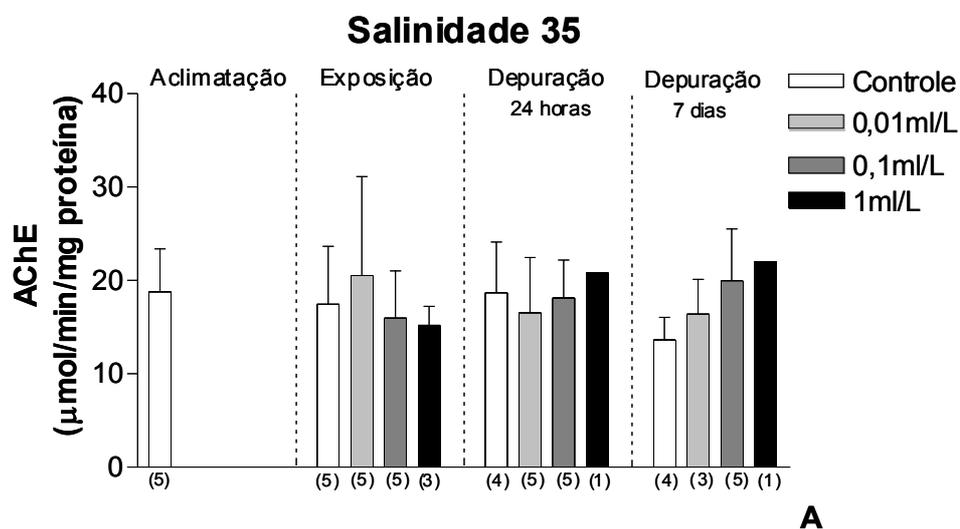


Figura 15.: Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

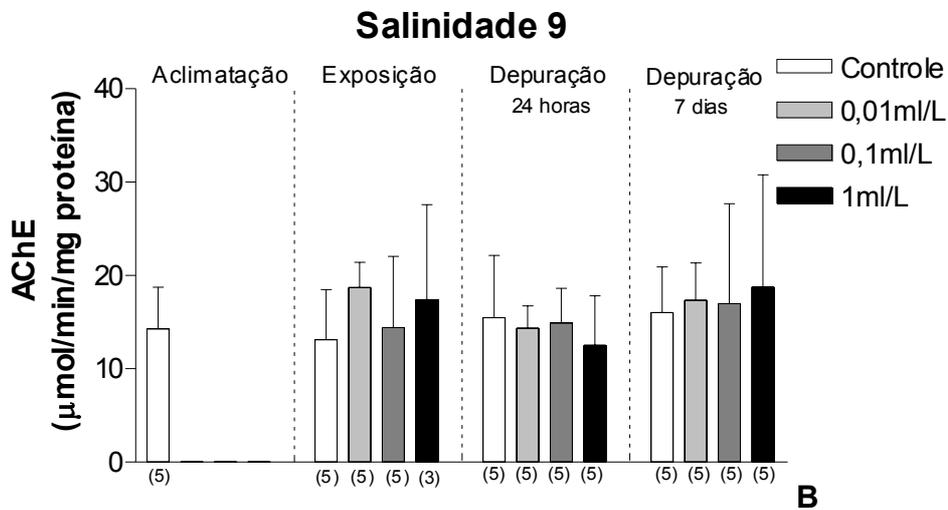
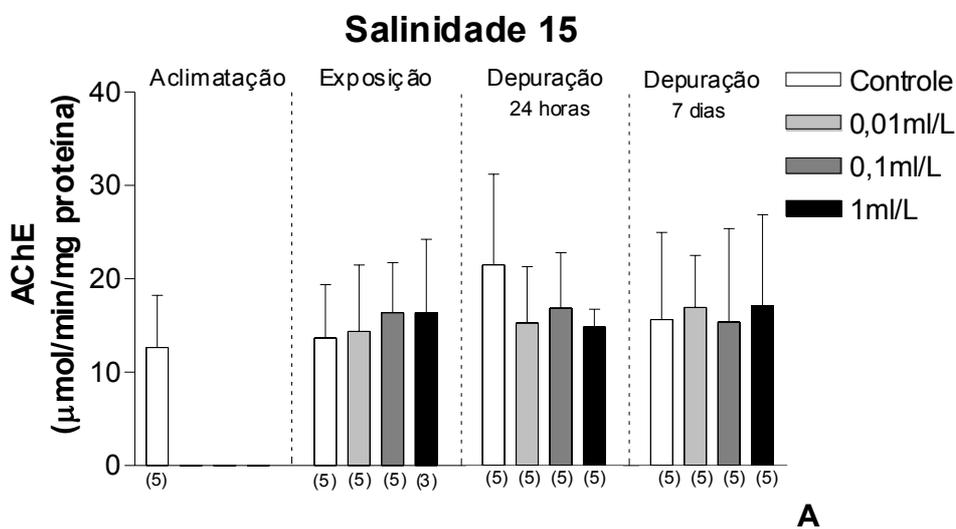


Figura 16.: Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

5.4. Análise da Capacidade Antioxidante do Plasma

A capacidade antioxidante do plasma dos animais coletados (LC) e transportados até a Barra da Lagoa (Lab) manteve-se entre 50 e 80%, assim como os animais controle nos diferentes tratamentos analisados ao longo do período experimental (Figura 17). Durante o período de exposição e depuração, não foram observadas diferenças significativas na capacidade antioxidante do plasma dos animais mantidos nas diferentes salinidades e concentrações de óleo diesel (Figuras 18 e 19).

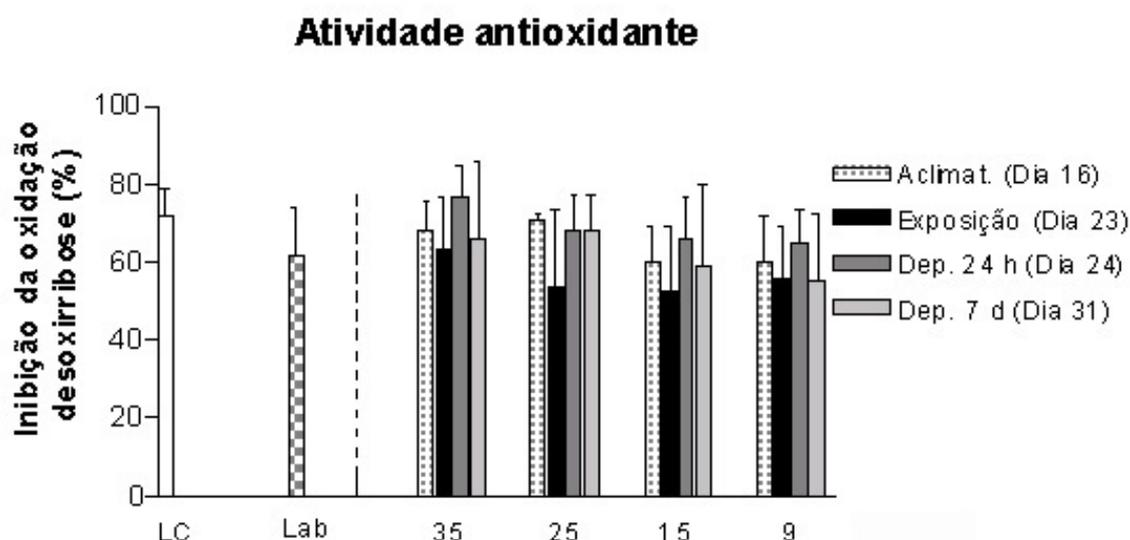


Figura 17.: Capacidade antioxidante do plasma de *C. rhizophorae*, analisadas nos animais amostrados imediatamente após a coleta (LC), transporte para o laboratório (Lab), e nos animais controles após os respectivos períodos experimentais, em cada salinidade. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de 5 indivíduos.

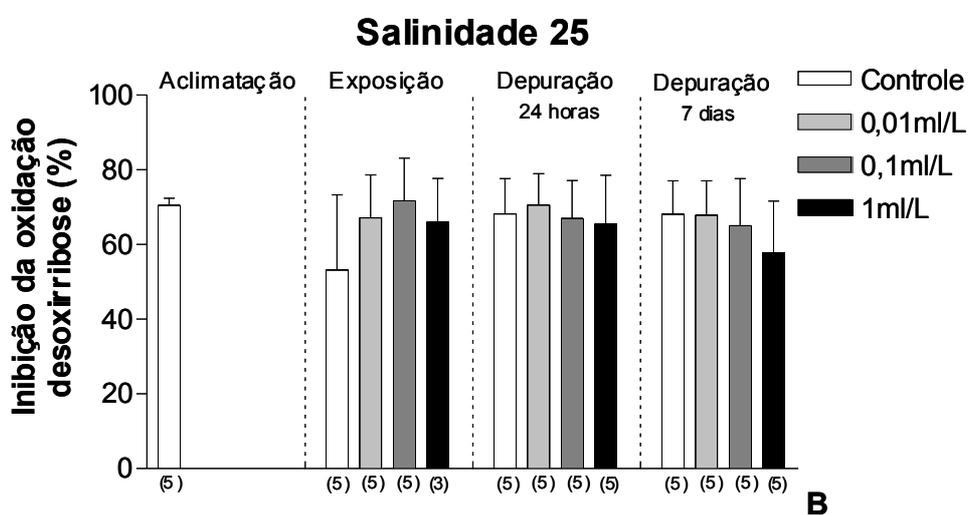
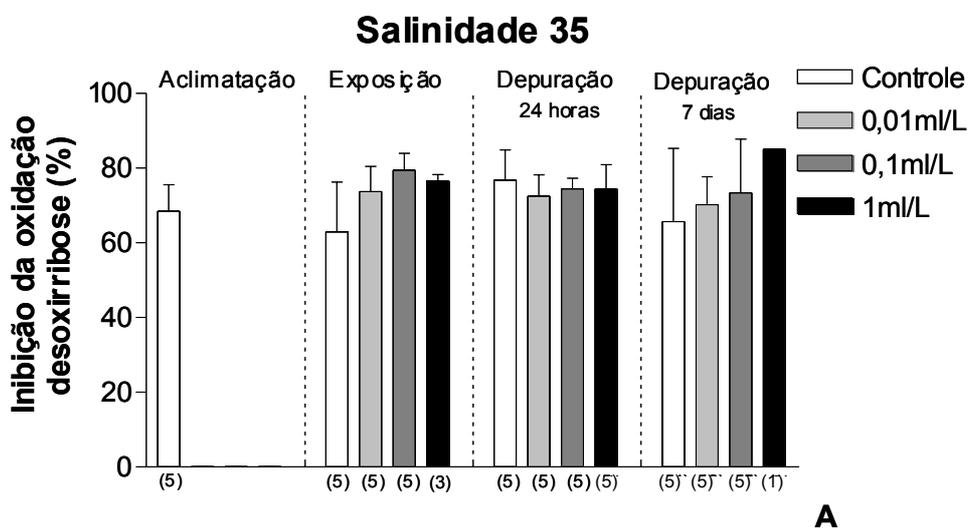


Figura 18.: Capacidade antioxidante do plasma nas salinidades 35 (A) e 25 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

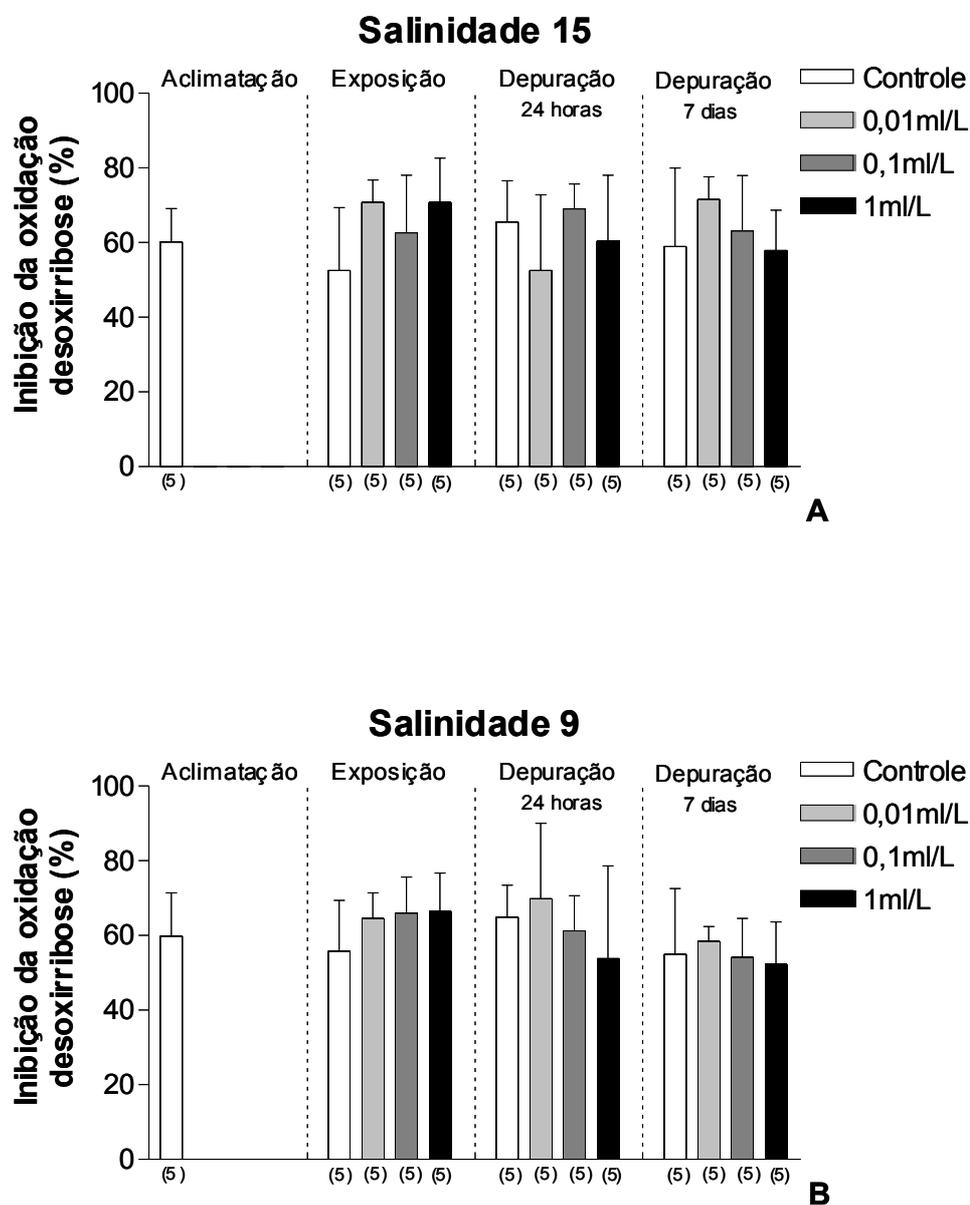


Figura 19.: Capacidade antioxidante do plasma nas salinidades 15 (A) e 9 (B). Os números entre parênteses no eixo das ordenadas representam o tamanho amostral de cada grupo. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

A identificação da influência de possíveis interferentes abióticos, como o manuseio e a salinidade, na resposta de biomarcadores enzimáticos torna-se muito importante na medida em que se pretende utilizar espécies de moluscos bivalves eurihalinos, como organismos sentinelas em programas de monitoramento. No caso da ostra *C. rhizophorae*, esta interação é especialmente importante por se tratar de uma espécie nativa com ampla distribuição na costa brasileira e que ocorre em abundância nas zonas estuarinas, onde freqüentes episódios de contaminação de origem doméstica e industrial podem ser observados.

Na parte inicial do trabalho foram realizados estudos para avaliar se o procedimento de coleta e manuseio dos animais, bem como a alteração da salinidade em que os animais foram expostos posteriormente, poderiam alterar os biomarcadores analisados. Os resultados mostraram que a metodologia utilizada durante a coleta e manuseio dos animais não causou modificações na atividade das enzimas CAT e AChE. No entanto, foi observada uma maior atividade da GST e G6PDH nas ostras analisadas após o manuseio e transporte para o laboratório. Estes valores permaneceram em um patamar mais elevado durante o período de aclimação de 16 dias nas diferentes salinidades. Possivelmente o estresse mecânico da limpeza das conchas e a manutenção dos animais fora da água durante aproximadamente 6 horas, tenham sido a causa das alterações bioquímicas observadas neste período. Estudos anteriores realizados por Lushchak *et al.* (2001) mostraram um aumento na atividade da G6PDH em cérebro de peixes *Carassius auratus*, após 8 horas de anoxia. Um aumento na atividade da GST também foi observado em estudos realizados com o mexilhão *Perna perna* mantidos em condições hipóxicas durante 4 horas (dados não publicados).

A atividade da GST nos animais controle após o período de exposição, que permaneceram nas salinidades 25 e 15, retornou aos níveis encontrados no momento da coleta, enquanto que aqueles que permaneceram nas salinidades de 35 e 9 não apresentaram a mesma resposta. Possivelmente, os animais mantidos nas salinidades 25 e 15 encontraram condições favoráveis a um melhor desempenho fisiológico. Isto foi confirmado ao analisarmos a capacidade de resposta da GST nos animais expostos ao óleo diesel.

Exposição

Durante a exposição e os períodos de depuração, foi observada uma grande mortalidade de ostras entre os animais que foram mantidos na salinidade 35 e expostos a maior concentração de óleo diesel (1 ml/L). Isso, de certa forma, pode estar associado à diminuição da capacidade de conjugação de xenobióticos destes organismos, como observado na atividade da GST que permaneceu em níveis baixos durante todo o experimento. Isto pode ter acarretado um aumento do conteúdo de metabólitos tóxicos intracelulares, comprometendo a homeostasia do animal e causando conseqüentemente uma maior mortalidade.

Diversos autores têm observado uma correlação positiva entre o aumento na concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e a atividade da GST na glândula digestiva de moluscos bivalves. Estudos realizados em campo mostraram que HPAs de alto peso molecular encontrado no mexilhão *M. edulis* estão relacionados com o aumento na atividade da GST na glândula digestiva (GOWLAND *et al.*, 2002). Le Pennec e Le Pennec (2003), realizaram uma exposição *in vitro* de células da glândula digestiva da vieira *Pecten maximus* à HPA durante 96 horas. Os autores observaram

um aumento significativo na atividade da GST até 48 horas, sendo que após este período foi observada uma atividade menor que o controle e também uma elevada morte celular. Da mesma forma, estudos realizados por Cheung *et al.* (2001) mostraram uma correlação positiva entre a presença de HPA e o aumento da atividade da GST em mexilhões *Perna viridis* coletados em locais poluídos.

No presente estudo, as ostras aclimatadas às salinidades de 25 e 15 e expostas ao óleo diesel por 7 dias apresentaram uma relação positiva entre a atividade da GST e a concentração de óleo diesel. Este efeito não foi observado nos animais mantidos nas salinidades de 35 e 9. Segundo Castro *et al.* (1985), ostras da espécie *C. rhizophorae* apresentam uma maior taxa de filtração nas salinidades 20 e 25, com valores de 1,33 e 1,43 L/h a temperatura de 24°C. Nas salinidades de 10 e 35, os valores obtidos foram de 0,85 e 0,4 L/h. Com base neste estudo, podemos sugerir que os animais aclimatados às salinidades de 25 e 15 estariam mais adaptados fisiologicamente, possivelmente devido a uma maior taxa de filtração, com maior disponibilidade de energia oriunda da alimentação, propiciando condições mais adequadas para uma eficiente conjugação de xenobióticos. Cabe ressaltar que, durante todo o período experimental, os animais receberam diariamente a alimentação com microalgas.

Zanette *et al.* (2003), em trabalho realizado conjuntamente com o presente estudo, demonstraram um aumento na peroxidação lipídica nas brânquias das ostras expostas ao óleo diesel e mantidas nas salinidades 9, 15 e 35, mas este aumento não foi observado nas ostras que permaneceram na salinidade 25. Este resultado pode estar associado com a maior ativação da atividade da GST na salinidade 25, o que provavelmente estaria protegendo o organismo contra o estresse oxidativo nas brânquias. De maneira similar, no presente trabalho o aumento da atividade da GST

nas salinidades 25 e 15 pode estar relacionado com uma proteção do organismo contra o estresse oxidativo.

A resposta da GST nos animais mantidos na salinidade 9, onde foi observado o mesmo nível de atividade nos animais controle e nas demais concentrações de óleo diesel, pode ter sido causado pelo maior gasto energético destes organismos para a adaptação às condições hipo-osmóticas do meio externo. Além disso, pode ter ocorrido uma menor acumulação do óleo diesel pelos animais, pois nesta salinidade, Castro *et al.* (1985) observaram uma menor taxa de filtração. Segundo Dame (1996) e Gosling (2003), muitos bivalves respondem imediatamente às mudanças na salinidade do ambiente através do fechamento de suas valvas, como estratégia de proteção contra um estresse osmótico. Este comportamento foi verificado por diversos autores, que demonstraram que em salinidades baixas, animais como o mexilhão *Perna perna* (SALOMÃO; MAGALHÃES; LUNETTA, 1980) e o berbigão *Anomalocardia brasiliana* (LEONEL; MAGALHÃES; LUNETTA, 1983) conseguem isolar-se do meio através do fechamento de suas valvas. É importante destacar que a ausência de diferenças significativas na resposta da GST nas ostras expostas ao óleo diesel na salinidade 9 poderia estar associada aos elevados níveis de atividade da GST observados nos animais controles. A etiologia deste aumento permanece para ser esclarecida.

A atividade da G6PDH não foi alterada significativamente na glândula digestiva dos animais expostos ao óleo diesel durante 7 dias nas diferentes salinidades. A G6PDH é a principal enzima reguladora da via das pentoses fosfato que é uma das vias responsáveis pela produção de NADPH intracelular, necessário para a manutenção da capacidade antioxidante (SIES, 1993), biossíntese de ácidos graxos (BAYNE, 1976) e biotransformação de xenobióticos (TIMBRELL, 1991). Quanto a primeira função, o

NADPH fornece os elétrons necessários para a redução da glutatona oxidada pela glutatona redutase (GR), reciclando a glutatona reduzida (GSH) necessária para a atividade da GST. Considerando que não houve modificação na atividade da G6PDH neste tecido, podemos sugerir que o suprimento de NADPH não foi comprometido durante o período de exposição nas diferentes salinidades em que os animais foram mantidos. Estudos anteriores realizados por Bainy *et al.* (1996) observaram uma diminuição na atividade das enzimas G6PDH, GR e no conteúdo de GSH em peixes *Oreochromis niloticus* oriundos de um local poluído por efluentes domésticos e industriais.

A atividade da CAT manteve-se praticamente constante nas diferentes salinidades durante todo o período experimental, mostrando apenas algumas flutuações, mas sem seguir um padrão claro. Considerando que a CAT é uma importante enzima antioxidante que decompõe peróxido de hidrogênio produzido em maior quantidade durante o processo de biotransformação, pode-se sugerir que este sistema antioxidante não esteja comprometido pela exposição dos animais ao óleo diesel nas concentrações testadas. No entanto, tal afirmação deve ser feita com cautela, uma vez que alguns trabalhos têm demonstrado uma correlação positiva entre a atividade da CAT com os níveis de HPAs na glândula digestiva da ostra *Saccostrea cucullata* (NIYOGI *et al.*, 2001a), no tecido digestivo da craca *Balanus balanoides* (NIYOGI *et al.*, 2001b) e na brânquia do mexilhão *Perna viridis* (CHEUNG *et al.*, 2001). Por outro lado, este último autor observou uma correlação inversa da CAT com a presença de hidrocarbonetos na glândula digestiva dos mesmos animais. Krishnakumar, Càssilas e Varanasi (1997) não observaram uma correlação entre a atividade da CAT e a concentração de HPAs na glândula digestiva de *Mytilus edulis*

expostos à HPA microencapsulados durante 6 e 30 dias. As diferenças observadas nestes resultados, aparentemente contraditórias, podem ser devidas a fatores como: diferenças nas espécies utilizadas, tecido analisado, tempo de exposição, metodologia empregada e composição qualitativa dos HPAs utilizados.

A inibição da AChE tem sido extensivamente utilizada como um biomarcador de efeito e exposição a inseticidas, principalmente organofosforados e carbamatos, com o objetivo de monitorar os efeitos destes contaminantes nos organismos vivos (BOCQUENÉ; ROIG; FOURNIER, 1997). Alguns autores observaram a inibição da AChE em mexilhões causada por metais pesados (NAJIMI *et al.*, 1997), por efluentes domésticos e derivados de petróleo (PAYNE *et al.*, 1996). El-Alfy & Schlenk (1998), observaram uma maior inibição da atividade da AChE em peixes eurihalinos *Oryzias latipes* expostos ao pesticida carbamato aldicarb e mantidos em salinidades elevadas. No presente trabalho não foi observada uma resposta significativa de inibição ou aumento da atividade da AChE em relação à exposição ao óleo diesel e às variações na salinidade, indicando que o sistema de transmissão de impulso nervoso manteve-se ativo na glândula digestiva desta espécie de ostra.

Depuração

Após os períodos de depuração de 24 horas e 7 dias, as ostras expostas às maiores concentrações de óleo diesel mantidas nas salinidades 25 e 15 apresentaram uma diminuição na atividade da GST em relação ao período de exposição. Tal decréscimo pode estar associado a uma diminuição do conteúdo intracelular de metabólitos tóxicos devido a uma eficiente excreção dos conjugados pela depuração.

Além dos sistemas de conjugação, é possível que as monooxigenases também estivessem ativadas nas ostras durante o período de exposição e depuração. Estudo similar realizado por Livingstone *et al.* (1985) mostrou um aumento na atividade do citocromo P450 após a exposição de *Mytilus edulis* ao óleo diesel durante 4 meses e que, após um período de depuração de 8 dias, estes valores retornaram aos níveis do grupo controle. Wallner-Kersanach *et al.* (2000) observaram que ostras da espécie *C. rhizophorae*, expostas por 60 dias a um ambiente contaminado por metais e depuradas por 30 dias, conseguiram eliminar 35% de chumbo. Desta forma, com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos sugerir que após 24 horas, as ostras conseguiram realizar depuração de uma boa parte dos metabólitos tóxicos. Após 7 dias de depuração, a GST ainda permaneceu levemente ativada nas concentrações mais elevadas de óleo diesel apenas naqueles animais mantidos na salinidade 25, evidenciando condições mais propícias para uma maior eficiência de depuração dos animais nestas salinidade.

Assim como no período de exposição, durante a depuração não foram observadas alterações na atividade das enzimas G6PDH, CAT e AChE.

Capacidade Antioxidante do Plasma

Alguns autores sugerem a utilização da análise do sistema de defesa imunológico em bivalves para determinar o efeito deletério de alguns contaminantes (AUFFRET; OUBELLA, 1997; FISHER *et al.*, 2000). Grundy, Ratcliffe e Moore (1996) demonstraram, através da exposição à hidrocarbonetos em *M. edulis* por 2 e 4 semanas, danos na membrana lisossomal e conseqüente diminuição da fagocitose celular nos hemócitos presentes na hemolinfa destes animais. Os autores sugerem que

o HPA pode agir diretamente, causando um distúrbio físico na membrana lisossomal, ou ainda, gerando um aumento de oxirradicais, podendo causar peroxidação lipídica. Desta maneira, a exposição à HPAs poderia produzir alterações nos níveis de oxirradicais na hemolinfa, com o conseqüente aumento da produção de antioxidantes.

No presente trabalho, a capacidade antioxidante do plasma das ostras, quantificada pelo método de inibição da oxidação da desoxirribose induzida por ferro, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com a presença do óleo diesel, assim como nas diferentes salinidades. Da mesma forma, um trabalho realizado por Alves (2003) também não encontrou diferença significativa na capacidade antioxidante do plasma de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas por 7 dias em um local contaminado por efluente industrial. Pires *et al.* (2003) estudando o mexilhão *P. perna*, exposto à óleo diesel (1 ml/L) durante 7 dias, não encontrou diferença significativa na produção do ânion superóxido (O_2^-). Com base nestes resultados, através da metodologia empregada e nas condições testadas, podemos sugerir que não houve alteração na capacidade antioxidante no plasma das ostras analisadas nas concentrações de óleo diesel e salinidades testadas.

7. CONCLUSÕES

- ❖ O procedimento de manuseio e transporte das ostras para o laboratório alterou a atividade das enzimas GST e G6PDH na glândula digestiva, possivelmente devido ao estresse mecânico da limpeza das conchas e a manutenção dos animais fora da água.
- ❖ Na salinidade 35 verificou-se uma elevada mortalidade dos indivíduos que permaneceram na maior concentração de óleo diesel, o que foi associado à uma diminuição na capacidade de conjugação de xenobióticos destes organismos.
- ❖ As ostras mantidas nas salinidades 25 e 15 apresentaram um aumento da atividade da GST da glândula digestiva dependente do aumento da concentração de óleo diesel. Estes animais estariam mais adaptados, possivelmente devido a uma maior taxa de filtração e maior disponibilidade de energia oriunda da alimentação, propiciando condições mais adequadas para uma eficiente conjugação de xenobióticos.
- ❖ Na salinidade 9, os animais expostos ao óleo diesel apresentaram níveis da atividade da GST semelhantes aos animais controle, o que pode ter sido causado por um maior gasto energético destes organismos para a adaptação às condições hipo-osmóticas do meio externo associada a uma menor taxa de filtração.
- ❖ A atividade da G6PDH na glândula digestiva das ostras não foi significativamente alterada, indicando que o suprimento de NADPH não foi afetado pela presença do óleo diesel em diferentes salinidades.

- ❖ A atividade da CAT na glândula digestiva das ostras não foi significativamente alterada durante o experimento, sugerindo que o sistema antioxidante de decomposição do peróxido de hidrogênio não foi comprometido pela exposição dos animais ao óleo diesel.
- ❖ Não foi observada uma resposta significativa de inibição ou aumento da atividade da AChE na glândula digestiva das ostras em relação à exposição ao óleo diesel e variações na salinidade, indicando que o sistema de transmissão de impulso nervoso manteve-se ativo na glândula digestiva desta espécie de ostra.
- ❖ Após o período de depuração de 24 horas e 7 dias, a atividade da GST na glândula digestiva das ostras apresentou uma diminuição nos animais mantidos nas salinidades 15 e 25, indicando uma eficiente excreção dos metabólitos tóxicos.
- ❖ Não foi observada uma alteração na capacidade antioxidante no plasma das ostras expostas ao óleo diesel nas salinidades testadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.R.C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC.** 2003. 52 f.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ALVES, S.R.C.; SEVERINO, P.C.; IBBOTSON, D.P.; SILVA, A.Z.; LOPES, F.R.A.S.; SAÉNZ, L.A.; BAINY, A.C.D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research.** v. 54, p. 241-245, 2002.

AUFFRET, M.; OUBELLA, R. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118A, n. 3, p. 705-712, 1997.

BACHÈRE, E.; CHAGOT, D.; GRIZEL, H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. **Developmental & Comparative Immunology.** v. 12, n. 3, p. 549-559, 1988.

BAYNE, B.L. **Marine mussels: their ecology and physiology.** Cambridge University Press, 1976. 411p.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology.** v. 34, n. 2, p. 151-162, 1996.

BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research.** v. 50, p. 411-416, 2000.

BARTH, T. **Parâmetros hemato-imunológicos e perfil histológico de alguns tecidos da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae***. 2002. 60f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BEUTLER, E. **Red cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. 2 ed. Grune & Straton, New York, 1975. 160 p.

BRASIL. **Macrodiagnóstico da zona costeira do Brasil na Escala da União**. Brasília, MMA, UFRJ, FUJB, LAGET, Programa Nacional do Meio Ambiente, 280 p., 1996.

BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. n. 00, p. 1-6, 1997.

BURGEOT, T.; BOCQUENÈ, G; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L.M.; PFHOL-LESZKOWICS, A.; RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**. v. 131, p. 125-141, 1996.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science Total Environment**. v. 247, p. 295-311, 2000.

CANCIO, I.; ORBEA, A.; VOLK, A.; DARIUSH FAHIMI, H.; CAJARAVILLE, M.P. Induction of peroxisomal oxidases in mussels: Comparative effects of lubricant oil and Benzo(a)pyrene structure and function in *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 149, p. 61-73, 1997.

CASASBELLAS, M.A.C. **Depuración de Moluscos**, Xunta de Galicia, v. 18, 1991. 60p.

CASTRO, E.M.; URPÍ, O.P.; MADRIZ, E.Z.; QUESADA, R.Q.; MONTOYA, J.A. Tasa de filtración del ostión de manglar (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828), a diferentes salinidades y temperaturas. **Revista de Biología Tropical**, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

CHEUNG, C.C.C.; ZHENG, G.J.; LI, A.M.Y.; RICHARDSON, B.J.; LAM, P.K.S. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidant responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**. v. 52, p. 198-203, 2001.

CIMA, 1991. Subsídios técnicos para elaboração do relatório nacional do Brasil para a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. Brasília, 172p. In: BASE DE DADOS TROPICAL (BDT). **Workshop: Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha**. Porto Seguro, 1999.

COSSU, C.; DOYOTTE, A.; JACQUIN, M.C.; BABUT, M.; EXINGER, A.; VASSEUR, P. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 38, p. 122-131, 1997.

DAME, R.F. Physical-Environmental Interactions. In: **Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach**. Florida: CRC Press, 1996. p. 19 – 34.

DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINETON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 8, 1103-23, 1989.

EL-ALFY, A.; SCHLENK, D. Potential mechanisms of the enhancement of aldicarb toxicity to japanese medaka, *Oryzias latipes*, at high salinity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 152, 175-183, 1998.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.O.; ANDRRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Phamacology**. v. 7, p. 88-98, 1961.

FISHER, W.S.; OLIVER, L.M.; WINSTEAD, J.T.; LONG, E.R. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminants burdens. **Aquatic Toxicology**. v. 51, p. 115-138, 2000.

GLOCK, G.E.; McLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconato dehydrogenase of rat liver. **Biochemistry Journal**. v. 55, p. 400-08, 1953.

GOSLING, E. Circulation, Respiration, Excretion and Osmoregulation. In: **Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture**. Fishing News Books, 2003. p. 201 - 225.

GOWLAND, B.T.G.; McINTOSH, A.D.; DAVIES, I.M.; MOFFAT, C.F.; WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Enviromental Research**. v. 54, p. 231-235, 2002.

GRUNDY, M.M.; RATCLIFFE, N.A.; MOORE, M.N. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Enviromental Research**. v. 42, n. 1-4, p. 187-190, 1996.

GUTTERIDGE, J.M.C.; QUINLAN, G.J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-

binding and iron-oxidising proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1156, p. 144-150, 1993.

GUZENSKI, J. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias húmicas no crescimento de *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828)**. 1996. 63f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HINE, P.M. The inter-relationship of bivalve haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 9, 367-385, 1999.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA (ICES). **Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants**. Tromso, 2003.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JACOBY, W, B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-Transferases. **Journal of Biology and Chemistry**. v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KENNISH, M.J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. CRC Press. Boca Raton, 1997. 524p.

KRISHNAKUMAR, P.K.; CÀSSILAS, E.; VARANASI, U. Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex expodes to microencapsulated HPAs or PCBs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 118C, n.1, p. 11-18, 1997.

LE PENNEC, G; LE PENNEC, M. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. **Aquatic Toxicology**. v. 64, p. 131-142, 2003.

LEONEL, R.M.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; LUNETTA, J.E. Sobrevivência de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca:Bivalvia), em diferentes salinidades. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 7, p. 63-72, 1983.

LIVINGSTONE, D.R. Responses of the detoxification/toxification enzyme systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. **Marine Pollution Bulletin**. v. 16, n. 4, p. 158-164, 1985.

LIVINGSTONE, D.R.; MOORE, M.N.; LOWE, D.M.; NASCI, C.; FARRAR, S.V. Responses of the cytochrome P-450 monooxygenase system to diesel oil in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. **Aquatic Toxicology**. v.7, p. 79-91, 1985.

LUSHCHAK, V.I.; LUSHCHAK, L.P.; MOTA, A.A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**. v. 280, 100-107, 2001.

MEDEIROS, I. **Estudo dos hemócitos e de alguns fatores humorais presentes na hemolinfa do mexilhão Perna perna (Mollusca: Bivalvia)**. 1996. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M.E.R.; BARBANTI, S.M.; SILVA, G.C.; MASSONE, C.G. Brazilian oil spills chemical characterization – case studies. **Environmental Forensics**. v. 3, p. 303-321, 2002.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H; PEREIRA, S.A.; SAMPAIO DE ARAÚJO, M.M; SILVA, M.A.; MARIANI, A.M. Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v.3, p. 449-458, 2000.

NAJIMI, S.; BOUHAIMI, A.; DAUBÈZE, M.; ZEKNI, A.; PELLERIN, J.; NARBONNE, J.F.; MOUKRIM, A. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 58, p. 901-908, 1997.

NARBONNE, J.F.; DAUBÈZE, M.; CLÉRANDÉAU, C.; GARRIGUES, P. Scale of classification based on biochemical markers mussels: application to pollution monitoring in European coasts. **Biomarkers**. v. 4, n. 6, p. 415-424, 1999.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A.G. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hoogly Estuary (India): seasonality and its consequences. **The Science of the Total Environment**. v. 281, p. 237-246, 2001a.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A.G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**. v. 52, p. 13-26, 2001b.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yasmuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schnn.). **The Science of the Total Environment**. v. 309, p. 105-115, 2003.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**. v. 83, p. 346-356, 1977.

PIRES, K.; GARGIONI, R.; SANDRINI, Z. J.; BARRACCO, M. A.. Evaluation of some haemato-immunological parameters in the brown mussel *Perna perna* experimentally exposed to diesel oil. In: **Molluscan Shellfish Safety**. VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, J.L. & BEIRAS, R. (ed). Conselleria de Pesca da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, p. 581-592. 2003.

QUEIROZ, C.; JÚNIOR, N.S. **Cultivo de ostras**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Ed. ACARESC. 1990. 25p.

RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2 ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125p.

REBELO, M.F.; AMARAL, M.C.R.; PFEIFER, W.C. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 10. p. 1341-1358, 2003.

SALOMÃO, L.C.; MAGALHÃES, A.R.M.; LUNETTA, J.E. Influência da salinidade na sobrevivência de *Perna perna* (Mollusca:Bivalvia). **Boletim de Fisiologia Animal**, São Paulo, n. 4, p. 143-152, 1980.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Grupo de ecossistemas: manguezal, marisma e apicum. In: BASE DE DADOS TROPICAL (BDT). **Workshop: Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha**. Porto Seguro, 1999. Disponível em <http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/mangue/>. Acesso em: 14 dezembro 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. v. 215, n. 2, p. 213 - 219, 1993.

SILVA, C.A.R.; RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D.; SANTOS, Z.L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**. v. 35, n. 17, 4072-4078, 2001.

STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., Di GIULIO, R.T., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M. & VAN HELD, P.A. Molecular responses to environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Eds. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. Lewis Publishers. p. 235-335, 1992.

TENDENGREN, M.; KAUTSKY, N. Comparative stress response to diesel oil and salinity changes of the blue mussel, *Mytilus edulis*, from the Baltic and North Seas. **Ophelia**. v. 28, n. 1, p. 1-9, 1987.

TIMBREL, J.A. **Principles of biochemical toxicology**. Ed. London: Taylor & Francis, 1991.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACO, M.A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, com énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. México, 2001. v.1, p. 127-146.

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

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

WALLNER-KERSANACH, M.; THEEDE, H.; EVERSBERG, U.; LOBO, E.S. Accumulation and elimination of trace metals in a transplanted experiment with

Crassostrea rhizophorae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.38, p. 40-45, 2000.

WANG, J.; GRISLE, S.; SCHLENK, D. Effects of salinity on aldicarb toxicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and striped bass (*Morone saxatilis x chrysops*). **Toxicological Sciences**. v. 64, p. 200-207, 2001.

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

ZANETTE, J.; FREITAS, F.A.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Análises bioquímicas em *Crassostrea rhizophorae* expostas e depuradas ao carbofuran em diferentes salinidades. In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2002, Vitória, ES. **Livro de Resumos Ecotox**. v.1, p. 107, 2002.

ZANETTE, J.; SILVA, A.Z.; ALMEIDA, E.A.; FREITAS, F.A.; TRIVELLA, D.B.B.; SOLIMAN, L.A.P.; DI MASCIO, P.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Oxidative stress in *Crassostrea rhizophorae* induced by diesel oil at different salinities. In: VI Congresso SETAC Latinoamérica, 2003, Buenos Aires, Argentina. **Libro de Resúmenes VI Congreso SETAC Latinoamérica**, v. 1, p. 26, 2003.

ZAR, J.H. **Bioestatistical Analysis**. Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1984.