

CLARISSA PELLEGRINI FERREIRA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E SUA RELAÇÃO COM METAIS EM OSTRAS
Crassostrea gasar MANTIDAS EM UM ESTUÁRIO NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, apresentado ao Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Karin Hahn Lüchmann Dr.

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Pellegrini Ferreira, Clarissa

Biomarcadores bioquímicos e sua relação com metais
em ostras *Crassostrea gasar* mantidas em um Estuário
no sul do Brasil / Clarissa Pellegrini Ferreira. -
Lages , 2018.

96 p.

Orientadora: Karim Hahn Lückmann

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular, Lages, 2018.

1. *Crassostrea gasar*. 2. Sistema Estuarino de
Laguna. 3. Metais. 4. Biomarcadores bioquímicos. I.
Hahn Lückmann, Karim. II. Universidade do Estado de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III.
Título.

CLARISSA PELLEGRINI FERREIRA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E SUA RELAÇÃO COM METAIS EM OSTRAS
Crassostrea gasar MANTIDAS EM UM ESTUÁRIO NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: 
(Dra. Karim Hahn Luchmann)
UDESC


Membros:
(Dr. Eduardo Alves de Almeida)
FURB


(Dra. Indianara Fernanda Barcarolli)
UDESC

Florianópolis, 18 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Wilson e Magda, minha tia Regina Célia, que me apoiaram em todas minhas decisões, por terem compreendido minhas ausências e, ajudarem a cuidar do meu filho Davi em alguns períodos de ausência.

Em especial a minha mãe que me motivou a continuar, mesmo quando parecia ter esgotado todas minhas forças.

Ao meu marido Bruno que esteve sempre ao meu lado, viajando comigo sempre que necessário e, me ajudando principalmente na coleta das ostras.

Aos meus irmãos Marcus Vinícius e Carla, pela ajuda nos estudos e conselhos dados.

À minha orientadora Karim Hahn Luchmann que foi de vital importância para o trabalho e pessoa a quem pude me reportar quando o trabalho passava por alguma fase crítica e, pelo auxílio de forma árdua e exaustiva me incentivando e não me deixando desistir.

À Equipe do LABCAI, Daína, Rapha, Bárbara, Flávia, Isis, Jacó e Clei, pela colaboração nas coletas das ostras em Florianópolis e, por ter permitido utilizar seu espaço, para as análises da pesquisa, sem eles seria impossível atender os requisitos que permearam este trabalho.

Ao Laboratório LMM na pessoa do professor Claudio Mello e Carlos Henrique Gomes pelo fornecimento das ostras para o referido estudo.

Ao Laboratório de UFMA, em especial à professora Marianna Basso Jorge, pelas análises químicas realizadas.

À Equipe do CERES, Juliano, Nicole, Ju Moser, Thaís Agda e João que auxiliaram nas coletas das ostras na lagoa e pelo companheirismo ao longo de todo o caminho percorrido durante o Mestrado.

À Mariana que sempre se prontificou em ajudar nas minhas análises e, em me acolher na sua residência quando de minha ida para Lages.

Ao apoio financeiro da FAPESC pela Bolsa de Estudos e ao CNPq por tornar realidade este projeto.

Agradeço às pessoas que diretamente e indiretamente me auxiliaram neste trabalho, tornando possível seu término. Obrigada!

... É saber se sentir infinito, num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar...
(Ana Vilela)

RESUMO

PELLEGRINI FERREIRA, Clarissa. **Biomarcadores bioquímicos e sua relação com metais em ostras *Crassostrea gasar* mantidas em um Estuário no Sul do Brasil**. 97p. 2018. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 2018.

O Sistema Estuarino de Laguna, representa importante fonte econômica para o sul de Santa Catarina, Brasil, contudo, recebe contaminação de variadas fontes. Quando organismos são expostos a xenobióticos o sistema de biotransformação é acionado, eliminando-os mais facilmente. Entretanto, pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Buscando homeostase, os organismos possuem o sistema de defesa antioxidante responsável por remover EROs. Ainda, muitos contaminantes podem afetar processos neurotóxicos. Representantes destes sistemas, são utilizados como biomarcadores bioquímicos em estudos ecotoxicológicos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os padrões de bioacumulação de metais e as respostas bioquímicas em ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, expostas por 45 dias no Sistema Estuarino de Laguna, SC. Para tanto, em outubro de 2017, ostras *C. gasar* foram transplantadas de um local referência na Caiera da Barra do Sul em Florianópolis, SC, para dois locais impactados por atividades antrópicas no Sistema Estuarino de Laguna, sul de SC. Dez animais não foram expostos e considerados como tempo inicial (T0), enquanto os demais foram expostos por 7 dias, 15 dias, 30 dias e 45 dias. Ao final de cada tempo de exposição, as atividades das enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathione S-transferase (GST), e acetilcolinesterase (AChE) foram determinadas em brânquias e glândulas digestivas de ostras provenientes do local referência e daquelas expostas, assim como a bioacumulação dos metais (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Sc, Se, Sn, V e Zn). As ostras bioacumularam metais, em especial o cádmio, nas brânquias e glândulas digestivas, em concentrações semelhantes à de locais considerados contaminados, principalmente nas brânquias dos indivíduos mantidos no P2. A presença de contaminantes pode ter aumentado a produção de EROs, conseqüentemente levando a depleção da GSH. Fato este, explicado, pelo decréscimo na atividade da GST, junto ao aumento da atividade da GPx e a não alteração na atividade da GR, nas brânquias dos organismos expostos após 45 dias. As respostas do presente estudo indicam o potencial da *C. gasar* como bioindicadores de contaminação aquática e recomenda a implantação de um programa de biomonitoramento no Sistema Estuarino de Laguna.

Palavras-chave: *Crassostrea gasar*. Sistema Estuarino de Laguna. Metais. Biomarcadores bioquímicos.

ABSTRACT

PELLEGRINI FERREIRA, Clarissa. **Biochemical biomarkers and their relationship with metals in oysters *Crassostrea gasar* kept in an estuary in southern Brazil.** 97p. 2018. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 2018.

The Laguna Estuarine System represents an important economic source on the south of Santa Catarina state, Brazil. The system receives contamination from various sources. When organisms are exposed to xenobiotics it activates the biotransformation system, which helps eliminating them more easily. On the other hand, that can lead to the increased production of reactive oxygen species (ROS). Seeking homeostasis, organisms have the antioxidant defense system responsible for ROS removal. Yet, many contaminants can affect neurotoxic processes. Representatives of these systems are utilized as biochemical biomarkers on ecotoxicological studies. Therefore, this paper had the objective of assessing the metal bioaccumulation patterns and the biochemical response by mangrove oysters, *Crassostrea gasar*, exposed for 45 days at the Laguna Estuarine System, SC. In October 2017, *C. gasar* oysters were moved from a reference site in Caiera da Barra do Sul in Florianópolis, SC, to two new locations impacted by anthropic activities on the Laguna Estuary System, south SC. Ten specimens were not exposed and considered as the initial time (T0), while the others were exposed for 7, 15, 30 and 45 days. At the end of each exposure, the activities of the catalase enzymes (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione S-transferase (GST), and acetylcholinesterase (AChE) were determinate on gills and digestive glands from oysters coming from the reference site and from the exposed sites, also was determinate the bioaccumulation of metals (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Sc, Se, Sn, V and Zn). The oysters bioaccumulated metals, in special cadmium, on the gills and digestive glands similar to known contaminated sites, especially on the gills of the oysters kept in P2. The presence of these contaminants could raise ROS generation, leading to a depletion in GSH, since there was an inhibition of GST together with an increase in GPx activities, while GR activities did not change in any significant form on the gills of the specimens exposed for 7, 15, 30 and 45 days. The study shows the potential *C. gasar* has as an aquatic contamination biomarker and recommends the implantation of a biomonitoring program on the Laguna Estuary System.

Keywords: *Crassostrea gasar*. Laguna Estuarine System. Metals. Biochemical Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sistema Estuarino de Laguna, Santa Catarina. Em vermelho as principais cidades em seu entorno. Em amarelo as lagoas que o compõem e o principal rio que deságua no sistema estuarino.....	24
Figura 2 –	Ostra do mangue, <i>Crassostrea gasar</i> , coletada no Sistema Estuarino de Laguna.....	35
Figura 3 –	Esquema simplificado do sistema de biotransformação de xenobióticos e efeitos negativos do desbalanço oxidativo na homeostase de uma célula. CAT: catalase; CYP: complexo enzimático citocromo; EROs: espécies reativas de oxigênio; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; GST: glutathiona S-transferase; GS-X: xenobiótico conjugado à glutathiona reduzida (GSH); SOD: superóxido dismutase; T: proteínas transportadoras de membrana; X: xenobiótico; X-OH: xenobiótico com grupo funcional exposto/adicionado.....	39
Figura 4 –	Esquema simplificado do sistema de defesa antioxidante: 6PG: 6-fosfogluconato; CAT: catalase; cys: cisteína; G6P: glicose 6-fosfato; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase; GCL: glutamato-cisteína ligase; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; gly: glicina; glu: ácido glutâmico; GS: glutathiona sintetase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona dissulfeto; GST: glutathiona S-transferase; GS-X: xenobiótico conjugado à GSH; MRP: proteína relacionada à resistência de múltiplas drogas; SOD: superóxido dismutase; X: xenobiótico.....	42
Figura 5 –	Esquema de ação da enzima acetilcolinesterase.....	45
Figura 6 –	Indicação dos pontos de exposição no Sistema Estuarino de Laguna, SC e do grupo referência localizado em Florianópolis, SC.....	51
Figura 7 –	Mini balsas flutuantes utilizadas para exposição das ostras do mangue, <i>Crassostrea gasar</i> , no Sistema Estuarino de Laguna, SC.....	52
Figura 8 –	Medida da altura (em cm) das ostras do mangue, <i>Crassostrea gasar</i> , amostradas no Sistema Estuarino de Laguna, SC.....	53
Figura 9 –	Ostras do mangue (<i>Crassostrea gasar</i>) antes da exposição (esquerda), após 45 dias de exposição (direita) no P2 no Sistema Estuarino de Laguna, SC.....	58
Figura 10 –	Atividade da enzima de fase II de biotransformação, glutathiona S-transferase, em brânquias e glândulas digestivas de ostras <i>Crassostrea gasar</i> da Caieira da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC.por 45 dias. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$	70

- Figura 11 – Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. gasar*, no grupo referência e expostas em diferentes pontos por 45 dias. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$ 72
- Figura 12 – Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, da Caiera da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Barras marcadas com ^{abc} indicam diferença entre tempos em um mesmo ponto; barras marcadas com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$ 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tipos de efluentes gerados na Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão (continua).....	27
Tabela 2 –	Resumo das respostas nos diferentes níveis organizacionais frente exposição aos xenobióticos.....	36
Tabela 3 –	Principais espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua ação e interação com biomoléculas.....	40
Tabela 4 –	Dados biométricos de ostras do mangue, <i>Crassostrea gasar</i> , da Caeira da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas em dois locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC (P1 e P2). Os valores estão representados como média ± desvio padrão.....	57
Tabela 5 –	Salinidade da água no Ribeirão da Ilha, Florianópolis (grupo referência), e nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC.....	58
Tabela 6 –	Níveis de metais ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue, <i>Crassostrea gasar</i> , da Caiera da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$. O sinal < indica abaixo dos níveis de detecção.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

~	aproximadamente
%	por cento
µg/g	micrograma por grama
µg/L	micrograma por litro
µg	micrograma
µL	microlitro
µs	microsegundos
·OH	radical hidroxila
¹ O ₂	oxigênio singlete
6PG	6-fosfogluconato
AA	aminoácidos
Ach	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
AgCl	cloreto de prata
Al	alumínio
Ba	bário
C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	hidroperóxido de cumeno
CAT	catalase
Cd(OH) ₂	hidróxido de cádmio
Cd	cádmio
CDNB	2,4-dicloronitrobenzeno
CERES	Centro de Educação Superior da Região Sul
cm	centímetros
Co	cobalto
CO	monóxido de carbono
CO ₂	dióxido de carbono
cols	colaboradores
Cr	cromo
Cu	cobre
Cu-ZnSOD	cobre-zinco superóxido dismutase
CYP	citocromo
CYP450	citocromo p450
cys	cisteína
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DEOLI	Departamento de Oceanografia e Limnologia
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe	ferro
Fe ²⁺	íon ferroso
Fe ³⁺	íon férrico
g	grama
G6P	glicose 6-fosfato
G6PDH	glicose 6-fosfato desidrogenase
GCL	glutamato-cisteína ligase
glu	ácido glutâmico
gly	glicina
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GS	glutaciona sintetase
GSH	glutaciona
GSSG	glutaciona dissulfeto
GST	glutaciona S-transferase
GS-X	xenobiótico conjugado à glutaciona reduzida
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HNO ₃	ácido nítrico
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
ICES	International Council for the Exploration of the Sea
K	potássio
KCl	cloreto de potássio
Km	quilômetros
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LBBM	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
M	molar
MDA	malondialdeído
mg/L	miligrama por litro
mg	miligrama
Milli-Q	água ultrapura
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
Mn	manganês
MnSOD	manganês superóxido dismutase
MRP	sistema de resistência a múltiplas drogas
ms	milissegundos
N ₂ O	óxido nitroso

Na	sódio
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NEPAq	Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola
NH ₂	amina
NH ₃	amoníaco
NH ₄	amônia
Ni	níquel
nm	nanômetro
N ^o	número
Nox	óxidos de nitrogênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
O ₂	oxigênio
°C	graus celsius
OH	hidroxila
p	página
P	fósforo
<i>p</i>	significância estatística
P1	centro de Laguna
P2	ponte Anita Garibaldi
Pb	chumbo
PbCO ₃	carbonato de chumbo
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fenil-metil-sulfunil-fluoreto
POPs	poluentes orgânicos persistentes
ps	peso seco
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados
Ref	referência
Sb	antimônio
Sc	escândio
Se	selênio
SH	sulfidrila
Sn	estanho
SOD	superóxido dismutase
SOSBAI	Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado
Sox	óxidos de enxofre
sp.	espécie do gênero
SULT	sulfotransferase
T	proteínas transportadoras de membrana
Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USEPA	United States Environmental Protection Agency

V	vanádio
V79	fibroblastos de pulmão de hamster chinês
WHO	World Health Organization
X	xenobiótico
X-OH	xenobiótico com grupo funcional exposto/adicionado
Zn	zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	ESTUÁRIOS: IMPORTÂNCIA E IMPACTOS AMBIENTAIS.....	23
1.2	O SISTEMA ESTUARINO DE LAGUNA.....	24
1.3	METAIS: FONTES, PROPRIEDADES E ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	31
1.4	BIOMONITORAMENTO DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	33
1.4.1	Escolha da espécie bioindicadora	34
1.4.2	Uso de biomarcadores em ostras para avaliação da contaminação aquática.....	36
1.4.2.1	Biotransformação de xenobióticos.....	37
1.4.2.2	Sistema de defesa antioxidante.....	40
1.4.2.3	Parâmetros Neurotóxicos.....	44
2	JUSTIFICATIVA.....	47
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	49
4	METODOLOGIA.....	51
4.1	ÁREA DE ESTUDO E EXPERIMENTO DE CAMPO.....	51
4.2	ANÁLISES DE METAIS.....	53
4.3	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	54
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, TEMPERATURA E SALINIDADE...	57
5.2	METAIS EM OSTRAS DO MANGUE <i>Crassostrea gasar</i>	59
5.3	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM OSTRAS DO MANGUE <i>Crassostrea gasar</i>	69
5.3.1	Sistema de biotransformação de xenobióticos.....	69
5.3.2	Sistema de defesa antioxidante.....	71
5.3.3	Processos neurotóxicos.....	75
6	CONCLUSÃO.....	79
7	PERPECTIVAS FUTURAS.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTUÁRIOS: IMPORTÂNCIA E IMPACTOS AMBIENTAIS

Os estuários, localizados na zona costeira, possuem um dos gradientes ambientais mais acentuados, onde terra, mar e atmosfera interagem de modo único, trocando energia e matéria. São considerados corpos d'água semifechados, pois possuem uma ligação livre com o oceano, e à medida que a água do mar adentra vai sendo diluída pelo aporte de água fluvial, determinando o grau de mistura entre estas duas massas de água (PRITCHARD, 1967). Desta maneira, os sistemas biológicos, físicos e químicos são dinamicamente intensos nos estuários, uma vez que flutuações de salinidade, aporte de água doce, maré, luz e estratificação de temperatura são constantes (CARLETON RAY; MCCORMICK-RAY, 2013). Sendo assim, os organismos precisam ser adaptados para residir nos estuários, até mesmo para aqueles que passam apenas uma fase de sua vida nestes.

Os estuários ocupam 18% da superfície da Terra e contam com 0,5% do volume dos oceanos. Possuem as mais diversas funções ecológicas, em que fornecem 50% da desnitrificação global, 80% da matéria orgânica, 90% da mineralização sedimentar e 50% da deposição de carbonato (CARLETON RAY; MCCORMICK-RAY, 2013). Adicionalmente, promovem $\frac{1}{4}$ da produção primária mundial, aproximadamente 14% da produção oceânica e 90% da captura pesqueira mundial. Contudo, cerca de 75 a 90% dos efluentes de rios, incluindo os elementos químicos e contaminantes associados, também acabam nos estuários (CROSSLAND et al., 2005). De acordo com Crossland e colaboradores (2005), cerca de 45% da população humana e 75% das cidades estão localizados próximo a regiões estuarinas. Entretanto, a má conduta antrópica impacta a sustentabilidade dos estuários resultando em pressões, como contaminação, eutrofização, industrialização, desenvolvimento urbano desordenado, desmatamento, produção agrícola e aquícola em áreas nada propícias, além da pesca predatória (CROSSLAND et al., 2005).

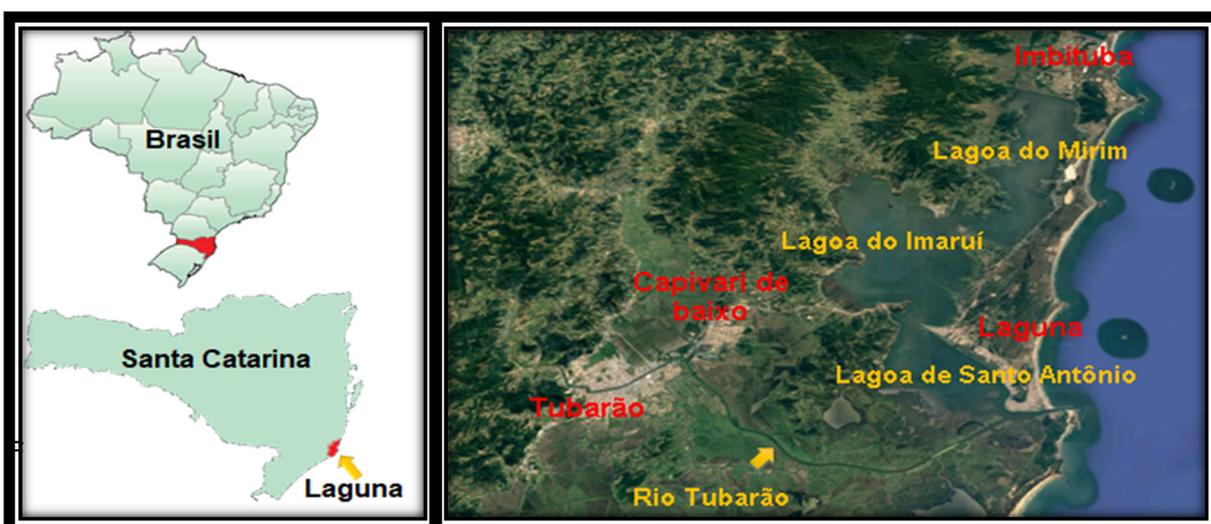
A exploração de recursos naturais durante décadas, associada à falha em proteger tais ecossistemas, resultam em impactos negativos da urbanização ao longo dos estuários. Portanto, o desenvolvimento urbano, juntamente à aquicultura, pesca predatória, lançamento contínuo de contaminantes e alterações hidrológicas contribuem para a degradação e podem levar a um decréscimo na biodiversidade de

tais ambientes (SAAD; CUNHA; COLPO, 2018). Ainda, a contaminação ambiental pode gerar efeitos deletérios nos organismos aquáticos e também na saúde humana (MACEDA et al., 2015). Desta forma, é possível observar um conflito entre os bens e serviços ecológicos e econômicos providos pelos estuários e a má gestão destes recursos afetado pela pressão antrópica.

1.2 O SISTEMA ESTUARINO DE LAGUNA

O Sistema Estuarino de Laguna (Figura 1) localiza-se ao sul do estado de Santa Catarina, entre os municípios de Imbituba e Laguna, sendo composto por três principais lagoas: Lagoa do Mirim, Lagoa de Imaruí e Lagoa de Santo Antônio dos Anjos (MACHADO, 2008). O Sistema Estuarino é a porção final da Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão. O Rio Tubarão, responsável pelo principal aporte de água doce na região, nasce nas encostas da Serra do Rio do Rastro, no município de Lauro Müller com a confluência do Rio Rocinha e o Rio Bonito, e percorre um trajeto de 120 Km até encontrar seu destino, a Lagoa Santo Antônio dos Anjos, em Laguna.

Figura 1 – Sistema Estuarino de Laguna, Santa Catarina. Em vermelho as principais cidades em seu entorno. Em amarelo as lagoas que o compõem e o principal rio que deságua no sistema estuarino



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O Sistema Estuarino de Laguna é ecologicamente rico e bastante produtivo (EICHLER et al., 2006), sendo fonte de sustento para muitas famílias da região. Ao longo dele distribui-se grande número de comunidades que exercem atividades de

agricultura, pesca artesanal e turismo (MACHADO, 2008). Entretanto, estas e outras atividades, bem como as realizadas no entorno da Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão, podem contribuir com a degradação da qualidade da água de suas lagoas.

A pesca artesanal da tainha (*Mugil sp.*) é um conhecido atrativo turístico da região, onde botos-da-tainha (*Tursiops truncatus gephyreus*) cooperativamente conduzem cardumes de tainhas na direção dos pescadores, e “sinalizam” por *displays* comportamentais quando e onde os pescadores devem jogar suas redes (DAURA-JORGE et al., 2012; SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998). Em 1997, a população de botos-da-tainha tornou-se patrimônio natural da cidade de Laguna (Lei Municipal N° 521), visando a proteção dos botos, evitando ou coibindo atividades que possam causar danos aos mesmos. Em 2015, foi aprovado um projeto de lei na Comissão de Cultura da Câmara dos Deputados, que confere à Laguna o título de Capital Nacional dos Golfinhos Pescadores. No entanto, a população de botos encontra-se ameaçada pela potencial contaminação antrópica que afeta o sistema estuarino e a qualidade de vida dos organismos que ali habitam (RIGHETTI, 2017).

A pesca artesanal do camarão, outra atividade econômica bastante realizada no estuário, é uma atividade noturna que utiliza um atrativo luminoso acoplado a uma bateria, atraindo, assim, a presa para dentro da rede denominada “aviãozinho”. Estima-se que entre os anos de 2004 e 2005, cerca de 55 toneladas de camarão foram capturadas, porém os dados apontam que em pouco mais de seis anos houve uma redução de 90% da pesca deste recurso. Estes dados indicam que o recurso encontra-se em níveis tão baixos de abundância que sua recuperação está comprometida (HAIMOVICI; HAIMOVICI; ANDRIGUETTO FILHO; SUNYE, 2014). Para o secretário do *Sindicato dos Pescadores de Laguna* (SindiPesca), Volnei dos Santos Tomé, a escassez deste recurso está relacionada ao uso indiscriminado de agrotóxicos, falta de saneamento básico das cidades do entorno e pesca predatória (ROSA, 2015). No entanto, a própria pesca pode gerar impactos negativos no estuário através da perda de baterias, que são fonte de ácido sulfúrico e metais, como o chumbo, para o ambiente.

Tratando-se de agrotóxicos, Santa Catarina é o segundo maior produtor de arroz do país, no qual a maior produção encontra-se no sul do estado (61,9% da produção total) (SOSBAI, 2016). Para a produção e proteção das plantas são utilizados fertilizantes, herbicidas, inseticidas e fungicidas e, se não manejados corretamente, tais agroquímicos possuem potencial de contaminação no ambiente. Os agrotóxicos incluem vários grupos de compostos que foram desenvolvidos um após o outro, como

organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, neonicotinóides e biopesticidas (CARVALHO, 2017). Diversos são os agrotóxicos e doses recomendadas para o uso no cultivo de arroz em Santa Catarina, tais como piretróides (Cipermetrina), neonicotinóides (Imidacloprido, Tiametoxam), dentre outros, que podem ser encontrados no *site* da *Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado* (SOSBAI, 2016). Apesar de esforços de instituições como a *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (Embrapa) e a *Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina* (EPAGRI) para o correto uso de agroquímicos, a água de irrigação do arroz pode ser o jeito mais rápido em que estes chegam ao Sistema Estuarino de Laguna, afetando organismos não-alvo e promovendo impactos negativos ao ambiente (SOSBAI, 2016). Adicionalmente, aviões “teco-tecos”, que sobrevoam as lavouras de arroz pulverizando agrotóxicos, atuam como possível fonte de contaminantes no estuário (ROSA, 2015). Na tentativa de combater pragas em lavouras de arroz, novas fórmulas de agrotóxicos são utilizadas, fora aqueles já banidos no Brasil e de muitos países por seus conhecidos efeitos negativos no homem e em outros organismos (COLLINS; ALVAREZ; CHAUHAN, 2014).

Em estudos prévios realizados em 2013 e 2014 por nosso grupo de pesquisa, ostras *Crassostrea gasar* foram transplantadas de regiões de cultivo de Florianópolis, SC, para o Sistema Estuarino de Laguna, onde permaneceram por uma semana. Após o período de exposição, foi observada a presença de Endosulfan II e DDT nos organismos amostrados, dois dos pesticidas organoclorados banidos do Brasil há mais de uma década (SOUZA, 2015). Por outro lado, o uso de agrotóxicos considerados “modernos” como os piretróides e neonicotinóides, que não causam efeitos tóxicos ao homem, podem contribuir para a mortalidade de outros organismos, como o camarão, contribuindo para a diminuição de sua abundância (HOOK et al., 2018). De fato, Hook e colaboradores (2018) observaram o efeito de pesticidas modernos, como o Imidacloprido, em fazendas de camarões na Austrália, em concentrações já observadas para outros crustáceos, que causaram inibição do consumo de alimentos e mortalidade destes organismos.

Além dos impactos provenientes das atividades pesqueiras e agrícolas citadas anteriormente, a Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão, recebe, em seu longo caminho percorrido, contaminantes de diversas fontes, conforme apresentado na Tabela 1. Desta forma, químicos orgânicos e inorgânicos são continuamente lançados nas águas do Sistema Estuarino de Laguna.

Tabela 1 – Tipos de efluentes gerados na Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão (continua)

Atividade/ efluente	Sólidos	Líquidos	Atmosféricos	Principais agentes
Engenho de farinha de mandioca	Pastas/lodo de amido/féculas resultantes de decantação natural dos efluentes líquidos	Água da lavação das raízes e da prensagem	Combustões incompletas da queima de lenhas/ cavacos no forno de farinha	Cianeto; matéria orgânica; sólidos sedimentáveis ar: - materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO) e CO ₂ NO _x
Fecularias	Pastas/lodo de amido/féculas resultantes de decantação natural dos efluentes líquidos	Água	Combustões incompletas da queima de lenhas/ cavacos ou óleos combustíveis em caldeiras e secadores de féculas	Cianeto; matéria orgânica; sólidos sedimentáveis ar: - materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO) e CO ₂ NO _x e SO _x
Reciclagem de solventes	Lodos orgânicos das evaporações/ destilações		Combustões incompletas da queima de óleos combustíveis e outros solventes resíduos em geradores de calor	Materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO ₂) e óxidos de nitrogênio (NO _x) e óxidos de enxofre (SO _x)
Postos de combustíveis ativos ou desativado com passivo ambiental; Lavação de veículos	Areia contaminada	Lavação da pista de descarga e ilha de bombas e vazamento de tanques		Benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno; sólidos sedimentáveis, detergentes; óleos e graxas
Fábrica de bebidas alcoólicas e refrigerantes		Lavação de piso e vasilhames		Cloro e detergentes
Suinocultura	Dejetos, compostos orgânicos	Lixiviação de NH ₃ , Cu e Zn Escoamento de fosfatos	Odores, NH ₄ e N ₂ O	Matéria orgânica; sólidos sedimentáveis
Abatedouros, frigoríficos, industrialização de produtos animais	Lodos (gorduras e micro vísceras)	Água e sangue do abate	Combustões incompletas da queima de óleos combustíveis em caldeiras	Matéria orgânica; sólidos sedimentáveis e detergentes - materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO ₂) e óxidos de nitrogênio (NO _x)

Tabela 1 – Tipos de efluentes gerados na Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão (continuação)

Laticínios		Lavação de pisos e vasilhames		Matéria orgânica; sólidos sedimentáveis e detergentes; óleos e graxas
Beneficiamento do arroz		Água da parbolização	Combustões incompletas da queima de lenha/ cavacos ou cascas de arroz em caldeira	Sulfatos, sulfitos, nitratos, nitritos, matéria orgânica; sólidos sedimentáveis: materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO) e CO ₂ NOx
Esmaltação de produtos cerâmicos	Lodos/ resíduos de esmalte	Água de lavação de equipamentos		Corantes de esmalte, ácido sulfúrico chumbo, materiais particulados (cinzas e fuligem)
Reciclagem de baterias	Borra de fundição de chumbo	Água contendo ácido sulfúrico e chumbo	Vapores de chumbo de operações de fusão; Combustões incompletas da queima de lenha/ cavacos ou óleos combustíveis em aquecedores	Monóxido de carbono (CO) e CO ₂ NOx e SOx
Fábrica de baterias	Borra de fundição de chumbo	Água contendo ácido sulfúrico e chumbo	Vapores de chumbo de operações de fusão; Combustões incompletas da queima de lenha/ cavacos ou óleos combustíveis em aquecedores	Ácido sulfúrico e chumbo; materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO) e CO ₂ NOx
Óleo de cozinha		Resto de óleo		Óleos e gordura animal
Serigrafia		Água de lavação de telas		Tintas
Oficina mecânica		Água de lavação de pças		Tolueno, etilbenzeno e xileno; sólidos sedimentares; óleos e graxas

Tabela 1 – Tipos de efluentes gerados na Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão (conclusão)

Oficina de chapeação e pintura		Água de lavação de peças	Vapores de solventes orgânicos da pintura; fumos metálicos das soldas	Solvente das tintas: solventes aromáticos (xileno, tolueno) e alifáticos (cetonas, acetatos, etc.)
Lavanderias		Água de lavação		Detergentes Corantes Cloro
Fábrica de equipamentos (com fundição)	Areias de moldagem contaminadas por resinas		Materiais particulados / fumos metálicos	Fumos metálicos Resinas fenólicas
Fábricas de produtos químicos		Água contendo diversos produtos químicos		Diversos produtos químicos
Lavação, tingimento, alvejamento, estamparia e/ou amaciamento		Água de lavação		Detergentes, corantes e cloro
Fabricação de alimentos em geral		Água de lavação		Matéria orgânica; sólidos sedimentáveis; óleos e gordura animal
Tanques autônomos de consumidor final de combustíveis líquidos		Derramamento na área de descarga e vazamento em tanques		Tolueno, etilbenzeno e xileno; sólidos sedimentáveis; óleos e graxas
Incineradores hospitalares	Cinzas residuais do incinerados		Combustões incompletas na queima	Materiais particulado, cloretos, fluoretos. monóxido de carbono (CO) NOx e SOx. Organoclorados (dioxinas e furanos)
Efluentes de aterros sanitários		Chorume		Diversos
Fabricação de telhas de barro cozido	cinzas		Combustões incompletas da queima de lenha/ cavacos nos fornos	Materiais particulados (cinzas e fuligem), monóxido de carbono (CO), CO ₂ NOx
Armazenamento temporário de resíduos classe I, II, III		Diversos		Diversos

Fonte: DAMIANI e COLS., 2008, p. 26-28.

O Rio Tubarão vem sendo impactado por atividades de mineração de carvão há mais de 50 anos (RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al., 2016). O carvão é uma mistura heterogênea contendo componentes orgânicos e inorgânicos, como metais. De acordo com León-Mejía et al. (2016), a presença de tais elementos pode gerar diversos problemas ambientais relacionados à atividade de mineração. No entanto, é um dos combustíveis fósseis mais abundantes do planeta, utilizado em usinas termelétricas (DRAGOVIĆ et al., 2013), no qual sua combustão parcial é fonte de diversos outros contaminantes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (ROHR et al., 2013), tornando-se, então, uma das principais causas de contaminação de origem antrópica para o meio ambiente. O Complexo Termelétrico Jorge Lacerda, localizado entre os municípios de Tubarão e Capivari de Baixo, em Santa Catarina, é a maior usina termelétrica da América Latina e teve, até o ano de 2008, um ciclo aberto de cinzas e uma bacia de sedimentação diretamente ligada ao Rio Tubarão (RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al., 2015). Contudo, apesar de passada uma década, muitos dos contaminantes ora liberados pela usina são persistentes no ambiente e possivelmente continuam a gerar impactos.

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) englobam um grupo diversificado de contaminantes orgânicos, caracterizados pela sua toxicidade, persistência e capacidade de acumulação ao longo da cadeia trófica. Entretanto, são gerados através de atividades industriais e agrícolas, e causam risco à saúde dos mais diversos organismos a eles expostos (BATOOL et al., 2016). Quanto aos metais, alguns podem ser essenciais ao funcionamento de enzimas e mecanismos celulares, porém, dependendo de suas concentrações podem ser tóxicos. Por outro lado, metais não essenciais (xenobióticos), podem ser tóxicos mesmo em pequenas concentrações (JAKIMSKA et al., 2011). Contaminantes orgânicos e inorgânicos podem bioacumular no tecido dos organismos e como consequência amplificar a persistência desses compostos no ambiente através da biomagnificação, ou seja, na transferência do composto através da cadeia alimentar (SUEDEL et al., 1994). Este processo pode representar risco ecológico e os efeitos deletérios associados a estes contaminantes surgem anos após a exposição (RIGHETTI, 2017).

Sendo a contaminação decorrente das mais diversas fontes, estudos em regiões que impactam direta ou indiretamente o Sistema Estuarino de Laguna vem sendo realizados recentemente. Dentre os parâmetros analisados, destacam-se a quantificação de metais em água e/ou solo (RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al.,

2015, 2016), a análise da bioconcentração de metais em ostras (PIAZZA, 2016), além de estudos da bioacumulação de contaminantes orgânicos e/ou inorgânicos associada a respostas de biomarcadores de contaminação aquática em ostras (FERREIRA, 2015; LOPES, 2002; SOUZA, 2015) e botos-da-tainha (RIGHETTI, 2017). Estudos recentes também analisaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos em linhagens celulares V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) de amostras de carvão e cinzas coletadas próximo ao Complexo Termelétrico Jorge Lacerda (LEÓN-MEJÍA et al., 2016).

1.3 METAIS: FONTES, PROPRIEDADES E ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS

Na ecotoxicologia, o termo “metal pesado” relaciona-se a contaminantes ambientais, enquanto “metais traços” corresponde a metais apresentados em concentrações traços (BLASCO et al., 2016). No entanto, muitas vezes os termos são empregados referindo-se ao mesmo metal (DUFFUS; IUPAC, 2002), sendo necessária a uniformização da terminologia. Assim, o presente trabalho utilizará o termo “metais” para se referir a alguns dos metais ecotoxicologicamente relevantes ao Sistema Estuarino de Laguna.

Além das fontes naturais de metais, atividades antropogênicas são responsáveis pela entrada destes elementos nos ambientes. Os metais podem ser introduzidos nos estuários por meio de efluentes de rios, transporte atmosférico, fluxos hidrotermais, infiltração de águas subterrâneas, difusão do sedimento e transporte aquático. As principais fontes de contaminantes, incluindo metais, no Sistema Estuarino de Laguna foram previamente destacadas na seção 1.2.

Dentre as suas características, os metais não são degradáveis, e seu destino, comportamento e toxicidade dependem das propriedades químicas e físico-químicas do ambiente, podendo acumular-se nos seus componentes onde manifestam sua toxicidade (BAIRD; CANN, 2014; LIBES, 2009). Ecossistemas estuarinos são afetados por diversas reações físicas, químicas, bioquímicas, geoquímicas e biogeoquímicas (FARAJNEJAD; KARBASSI; HEIDARI, 2017). Dependendo das condições ambientais, os metais podem ser removidos da coluna d'água, ficando retidos no sedimento, ou serem reciclados tornando-se novamente biodisponíveis (FARAJNEJAD; KARBASSI; HEIDARI, 2017; LIU et al., 2015). Processos químicos, incluindo espécies dissolvidas, precipitação, dissolução, transformação *redox* e

adsorção são variáveis a serem consideradas nestes ambientes (BLASCO et al., 2016). Ainda, a especiação que os metais sofrem é o principal processo que controla seu comportamento, reatividade, toxicidade e riscos ecológicos, formando complexos inorgânicos, tais como cloretos ($AgCl$), carbonatos ($PbCO_3$) e íons hidroxilas ($Cd(OH)_2$) (BLASCO et al., 2016).

Metais, como o cobre, ferro, manganês, selênio e zinco são essenciais aos seres vivos. Ainda que em pequenas concentrações, têm importante papel no metabolismo dos organismos aquáticos, pois participam de vários processos biológicos (BOURGEOIS, 2015a; JOHNSON, 2015; MORRIS; COYLE, 2015). A maioria dos organismos necessita de cobre (Cu) e zinco (Zn) para algum processo biológico, sendo cofator essencial para diversas enzimas, como é o caso da isoforma da enzima superóxido dismutase Cu-ZnSOD, envolvida na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHALIGRAM; CAMPBELL, 2013). De acordo com Liu e Wang (2013), o Zn está associado a processos que facilitam a bioacumulação de outros metais, como o cádmio em organismos aquáticos. Uma hipótese levantada pelos autores é que o Zn induz a expressão de metalotioneínas, proteínas que regulam os níveis de metais nas células, disponibilizando, portanto, mais sítios de ligação para este metal, uma vez que este se liga mais fortemente a estas proteínas do que o Zn. Além disso, enzimas que contêm Cu catalisam reações de absorção de ferro e biossíntese do grupo *heme* (COLOTTI et al., 2013). O ferro (Fe), por sua vez, é um componente da hemoglobina e de diversos sistemas enzimáticos, como os citocromos, além de atuar na catalase, outra enzima responsável pela remoção de EROs (REID et al., 1981; SCHMIDT-NIELSEN, 2002). O manganês (Mn) é um componente essencial para o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos, síntese e metabolismo de neurotransmissores e também utilizado como cofator para diversas enzimas, como a isoforma MnSOD, também atuando na remoção de EROs (BOWMAN et al., 2011). Outra enzima envolvida em manter a homeostase em organismos aquáticos é a glutatona peroxidase selênio-dependente, mostrando assim, um exemplo do papel do selênio (Se) em processos biológicos.

Além destes metais, outros podem ser encontrados nos estuários, sendo ou não essenciais aos diversos organismos, e associados à toxicidade nestes, como é o caso do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e níquel (Ni), que são considerados contaminantes preocupantes sob o ponto de vista ecotoxicológico (HOODA, 2010). O Pb é capaz de acumular em vários organismos vivos, promovendo diversos sintomas de toxicidade,

tais como efeitos neurotóxicos (MASON et al., 2014), alterações nas defesas antioxidantes (SHENAI-TIRODKAR et al., 2017), dentre outros. A similaridade química do Cd com o Zn, explica em parte a toxicidade deste. O Zn sendo essencial ao metabolismo de várias espécies animais e vegetais, acaba substituído pelo Cd, prejudicando processos metabólicos, tais como no metabolismo do cálcio, fósforo e vitamina D (CAMPBELL, 2006; WEBER et al., 1990, ROCHA, 2009). Já o Ni é considerado um metal essencial, porém não existe nenhuma evidência direta sobre sua “essencialidade” em animais aquáticos, apenas sendo considerado essencial, pois avaliações indiretas sugerem que estes organismos regulem tal metal (YIN; WANG, 2018). Embora o Ni não apresente toxicidade aguda de metais como Cd e Pb, ele pode ser genotóxico e potencialmente perigoso para os organismos aquáticos (PYLE; COUTURE, 2011).

Em suma, diversas são as fontes de metais encontradas no ambiente aquático, podendo ser encontrados em pequenas concentrações ou em substâncias mais complexas, como sais, além de outras substâncias, tanto orgânicas como inorgânicas. Desta forma, pode ser difícil avaliar os impactos negativos e riscos ecológicos dos metais em qualquer ambiente. Visto que a área de estudo deste trabalho é considerada uma importante fonte de alimento e renda para a região, associado ao fato de ela ser potencialmente afetada por contaminantes de variadas fontes que podem trazer riscos à saúde dos organismos que fazem uso do estuário, incluindo o homem, é de extrema importância a avaliação da contaminação do Sistema Estuarino de Laguna. Para esta avaliação, sugere-se o uso de ferramentas viáveis, como as aplicadas em diferentes programas de biomonitoramento ambiental.

1.4 BIOMONITORAMENTO DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Os programas de biomonitoramento ambiental são usados para medir a resposta e recuperação de comunidades aquáticas perante à distúrbios sofridos, proteger a biodiversidade, além de avaliar e aprimorar a compreensão da relação entre componentes físicos, químicos e biológicos em ambientes dinâmicos (HERSHEY et al., 2010). Entretanto, a maioria dos programas de monitoramento aquático fazem uso apenas de parâmetros físico-químicos, que em sua maioria estão associados a condições físico-químicas do ambiente, não refletindo condições ambientais a longo-prazo. Adicionalmente, parâmetros físico-químicos geralmente

trazem informações sobre a natureza do contaminante e suas concentrações no ambiente, mas não conseguem avaliar a biodisponibilidade e o efeito deles nos organismos expostos (DALZUCHIO et al., 2016).

Desta forma, o *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES) recomenda aos programas: o uso de organismos bioindicadores de contaminação; análises químicas, que determinam a bioacumulação dos contaminantes; e o uso de biomarcadores, que refletem os impactos dos contaminantes nos organismos (ICES, 2004), melhorando assim, a precisão de métodos na avaliação do risco ambiental de atividades antrópicas. Consequentemente, levarão em conta efeitos sinérgicos e/ou antagonistas entre os contaminantes e os efeitos biológicos nos organismos expostos (AZEVEDO et al., 2013; FUZINATTO et al., 2013).

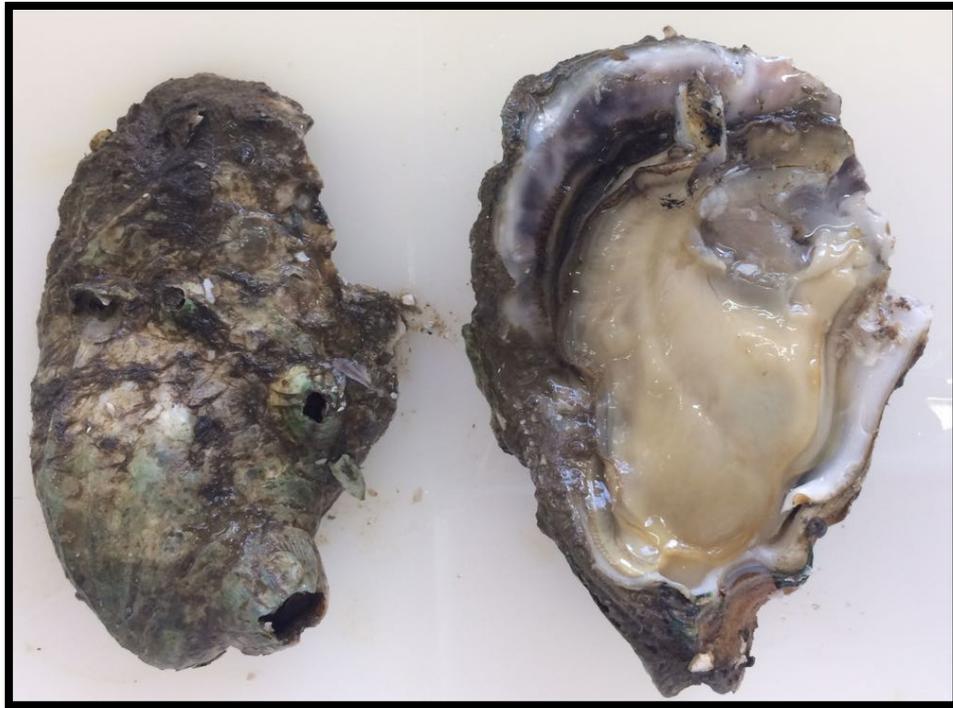
1.4.1 Escolha da espécie bioindicadora

Os diferentes organismos utilizados em programas de biomonitoramento ambiental podem ser categorizados em: indicadores, onde o gradiente de poluição é indicado pela presença ou ausência de determinada espécie; monitores, através de medidas que indicam efeitos adversos em suas funções/performance, tais como parâmetros histológicos, fisiológicos e bioquímicos e; sentinelas, utilizadas por refletirem as frações de contaminantes biodisponíveis no ambiente, pois os acumulam (BEEBY, 2001). Já para Holt e Miller (2011), qualquer espécie, comunidade ou processo biológico utilizado para avaliar a qualidade ambiental é um indicador biológico ou bioindicador. No presente estudo o termo que mais se encaixa é o “bioindicador”, entretanto, como escolher a espécie bioindicadora correta?

Para responder à questão levantada, é preciso levar em conta diferentes aspectos, tais como o prévio conhecimento sobre a distribuição da espécie, que deve permitir comparações espaço-temporais além de garantir um monitoramento de longo prazo. Escolhas comuns de bioindicadores geralmente envolvem organismos sésseis e filtradores, como os moluscos bivalves, amplamente utilizados para monitorar a presença de contaminantes biodisponíveis em um determinado ambiente e seus efeitos (DALZUCHIO et al., 2016). Um clássico programa de biomonitoramento baseado na bioacumulação de contaminantes que refletem a fração biodisponível de contaminantes é o “*Mussel Watch*”, implementado na década de 70, que fez uso de mexilhões como bioindicadores (GOLDBERG et al., 1978).

Ainda, para programas que visam o biomonitoramento de estuários, espécies eurihalinas devem ser levadas em consideração, pois toleram grandes variações de salinidade (BLASCO et al., 2016). A ostra do mangue, *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757; sin. *Crassostrea brasiliiana*, LAMARCK, 1819) (Figura 2), tem sido bastante utilizada em estudos ecotoxicológicos, pois tolera grandes variações de salinidade e possui ampla distribuição geográfica. No Brasil, ocorre de Santa Catarina ao Pará (LAZOSKI et al., 2004), sendo também, uma espécie nativa no Sistema Estuarino de Laguna (MELO et al., 2010).

Figura 2 – Ostra do mangue, *Crassostrea gasar*, coletada no Sistema Estuarino de Laguna



Fonte: Arquivo pessoal da autora, 2018.

Por serem organismos filtradores, os moluscos bivalves acumulam altas taxas de contaminantes em seus tecidos, contribuindo para o seu uso como bioindicadores em programas de biomonitoramento da contaminação aquática no Brasil (ZANETTE, 2009). De fato, diferentes pesquisadores fazem uso desta espécie bioindicadora (BARROS; BARBIERI, 2012; KURANCHIE-MENSAH et al., 2016; LIMA et al., 2018; LÜCHMANN et al., 2014; MÜLLER et al., 2018; PESSATTI et al., 2016; TREVISAN et al., 2017; ZACCHI et al., 2017), sendo esta também utilizada em estudos prévios realizados no Sistema Estuarino de Laguna (FERREIRA, 2015; PIAZZA, 2016;

SOUZA, 2015), permitindo comparações entre os dados provenientes dos diferentes trabalhos.

1.4.2 Uso de biomarcadores em ostras para avaliação da contaminação aquática

Conforme mencionado anteriormente, os estuários recebem continuamente compostos xenobióticos, como os metais, resultantes das mais variadas atividades antrópicas. A exposição crônica a concentrações sub-letais de contaminantes podem induzir efeitos que são difíceis de serem quantificados, e tais efeitos podem chegar a diferentes níveis organizacionais, brevemente descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das respostas nos diferentes níveis organizacionais frente exposição aos xenobióticos

Nível	Resposta adaptativa	Resposta destrutiva	Resultados no próximo nível
Molecular-bioquímico-celular	Bioacumulação Detoxificação		Adaptação do organismo
		Estresse Oxidativo Rompimento da membrana Desbalanço energético	Redução em condições do organismo
Organismo	Defesa contra doença Ajustes de funções internas Evitar/Fuga		Regulação e adaptação de populações
		Mudanças metabólicas Aberrações comportamentais Maior incidência de doenças Redução nas taxas de crescimento e reprodução	Redução na performance da população
População	Adaptação do organismo ao estresse Dinâmica populacional inalterada		Comunidade inalterada
		Mudança na dinâmica populacional	Efeitos em organismos coexistentes e comunidades
Comunidade	Adaptação da população ao estresse		Comunidade, diversidade e estabilidade inalteradas Adaptação ecossistêmica
		Mudanças na composição de espécies e diversidade Redução no fluxo energético	Mudanças na estrutura e funções ecossistêmicas

Fonte: LIBES, 2009.

Desta forma, os biomarcadores, que normalmente são utilizados em programas de biomonitoramento ambiental, representam o primeiro nível da Tabela 2, e compreendem as respostas moleculares, bioquímicas, citológicas e/ou fisiológicas que refletem o impacto biológico de contaminantes nos organismos (LIU; WANG, 2016a). Os biomarcadores têm sido aplicados como ferramentas em programas de biomonitoramento, junto à análises químicas em água, sedimento e amostras biológicas (CHANDURVELAN et al., 2015; EDGE et al., 2014; TURJA et al., 2014). Entretanto, as respostas de biomarcadores muitas vezes podem não representar uma relação causal direta (LIU; WANG, 2016b). Este fato é ainda mais relevante em um ambiente tão dinâmico como o estuário, no qual a compreensão das variações nas respostas de biomarcadores pode ser uma tarefa desafiadora.

O uso de biomarcadores bioquímicos oferece algumas vantagens, pois geralmente são um dos primeiros a serem detectados e são sensíveis à presença de determinados contaminantes. Adicionalmente, alguns apresentam alta especificidade, possuem relativo baixo custo de análise e podem fornecer informações a respeito do efeito metabólico causado pelo contaminante (BERENGER, 2013). Dentre os biomarcadores bioquímicos comumente utilizados em estudos ambientais com organismos aquáticos estão aqueles relacionados às moléculas envolvidas nos sistemas de biotransformação de xenobióticos e defesa antioxidante, bem como processos neurotóxicos.

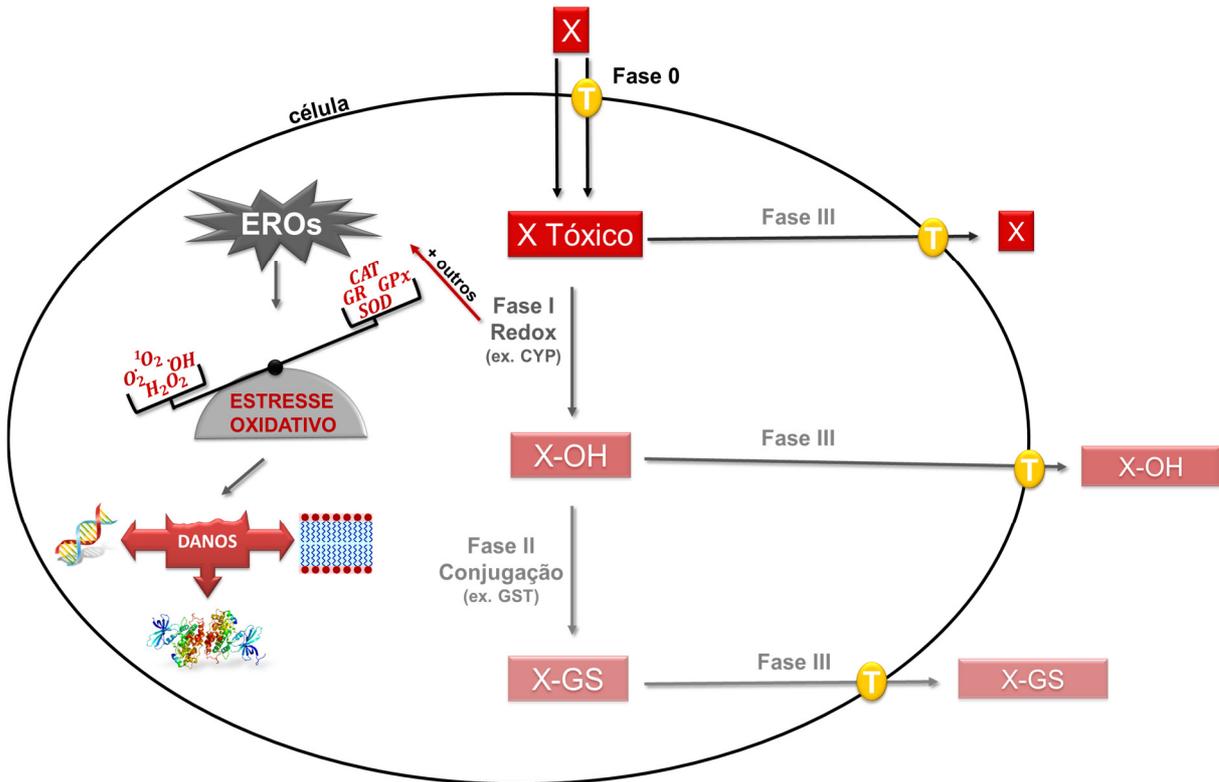
1.4.2.1 Biotransformação de xenobióticos

Muitos xenobióticos, substâncias químicas estranhas aos organismos, podem ser lipofílicos e pouco excretados pelas células (LÜCHMANN, 2012; ZANETTE, 2009). Entretanto, estes compostos podem ser alterados quimicamente através de reações metabólicas do sistema de biotransformação de xenobióticos.

Estas reações são mediadas por enzimas, resultando em metabólitos mais polares e fáceis de serem excretados, do que os compostos parentais. O processo de biotransformação facilita, portanto, a remoção de compostos xenobióticos, que poderiam bioacumular até níveis tóxicos ao organismo (BLASCO et al., 2016). Fatores bióticos e abióticos, ora mencionados, interferem na biodisponibilidade dos contaminantes. Quando biodisponíveis, pode-se iniciar o processo de biotransformação que, segundo Döring e Petzinger (2014), em eucariotos é dividido

em quatro fases: fase 0, caracterizada pelo transporte inicial do contaminante para dentro da célula; fase I, no qual reações metabólicas expõem ou adicionam grupos funcionais (-OH, -NH₂, -SH) ao composto parental, através de oxidação, redução ou hidrólise. Estas reações são catalisadas, principalmente, por enzimas do citocromo P450 (CYP450 ou CYP), tornando o composto mais polar e pronto para ser excretado, ou ainda, permitindo as reações de conjugação da fase II (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Na fase II, há a conjugação do composto parental ou seu metabólito a um ligante endógeno polar (BLASCO et al., 2016). Tais reações de conjugação são principalmente catalisadas por enzimas como glutathione S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT) e glucoronosiltransferases, através das quais compostos lipofílicos tornam-se hidrofílicos (LÜCHMANN et al., 2015; WALKER, 1996); e, finalmente, fase III, formada por proteínas de membrana, como as do sistema de resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance-related protein* – MRP), que transportam os metabólitos para fora da célula (Figura 3) (DÖRING; PETZINGER, 2014; REGOLI; GIULIANI, 2014).

Figura 3 – Esquema simplificado do sistema de biotransformação de xenobióticos e efeitos negativos do desbalanço oxidativo na homeostase de uma célula. CAT: catalase; CYP: complexo enzimático citocromo; EROs: espécies reativas de oxigênio; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; GST: glutathiona S-transferase; GS-X: xenobiótico conjugado à glutathiona reduzida (GSH); SOD: superóxido dismutase; T: proteínas transportadoras de membrana; X: xenobiótico; X-OH: xenobiótico com grupo funcional exposto/adicionado



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Enzimas de fase II, como as GSTs, são amplamente utilizadas como biomarcadores para avaliar a exposição de organismos aquáticos a xenobióticos. São enzimas responsáveis por catalisar a conjugação da glutathiona (GSH) a xenobióticos, muitos dos quais carcinogênicos, sendo sua excreção essencial para a célula (BLASCO et al., 2016). De fato, GSTs são isoenzimas multifuncionais que atuam na defesa celular contra xenobióticos, promovendo proteção aos organismos (BLANCHETTE; FENG; SINGH, 2007). Embora os metais não sejam substratos naturais para GSTs, alguns estudos demonstraram variações em invertebrados aquáticos expostos a diversos metais (BREITWIESER et al., 2018; MARTÍN-DÍAZ et al., 2007; MOREIRA et al., 2006; VERLECAR; JENA; CHAINY, 2007; YOLOĞLU; UÇKUN; UÇKUN, 2018). Já as reações de fase I de biotransformação estão

geralmente ligadas à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LINHART; BARTSCH; SEITZ, 2014). Para tanto, todos os organismos são dotados de defesas antioxidantes responsáveis pela eliminação e/ou neutralização de tais espécies.

1.4.2.2 Sistema de defesa antioxidante

O oxigênio (O_2) é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons, onde é reduzido a água (H_2O), além de sua utilização em inúmeras vias metabólicas (BERENGER, 2013). Entretanto, muitos processos metabólicos endógenos reduzem parcialmente o oxigênio, resultando na formação de EROs, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGET, 1984). As principais formas estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua ação e interação com biomoléculas

EROs	$\frac{1}{2}$ vida(s)	Ação e Interação
Ânion superóxido (O_2^-)	1-4 μs	Reage com duplas ligações DNA: não Proteínas: via Fe-Center Lipídios: Muito baixa
Peroxido de Hidrogênio (H_2O_2)	1 ms	Oxida proteínas e forma $\cdot OH$ DNA: não Proteínas: ataca resíduos e cisteína Lipídios: Muito baixa
Radical hidroxila ($\cdot OH$)	1 ns	Extremamente reativo DNA: extremamente rápido Proteínas: extremamente rápido Lipídios: extremamente rápido
Oxigênio <i>singlete</i> (1O_2)	1-4 μs	Oxida DNA, lipídios e proteínas DNA: resíduos de Guanina Proteínas: ataca diversos resíduos de AA Lipídios: PUFA*

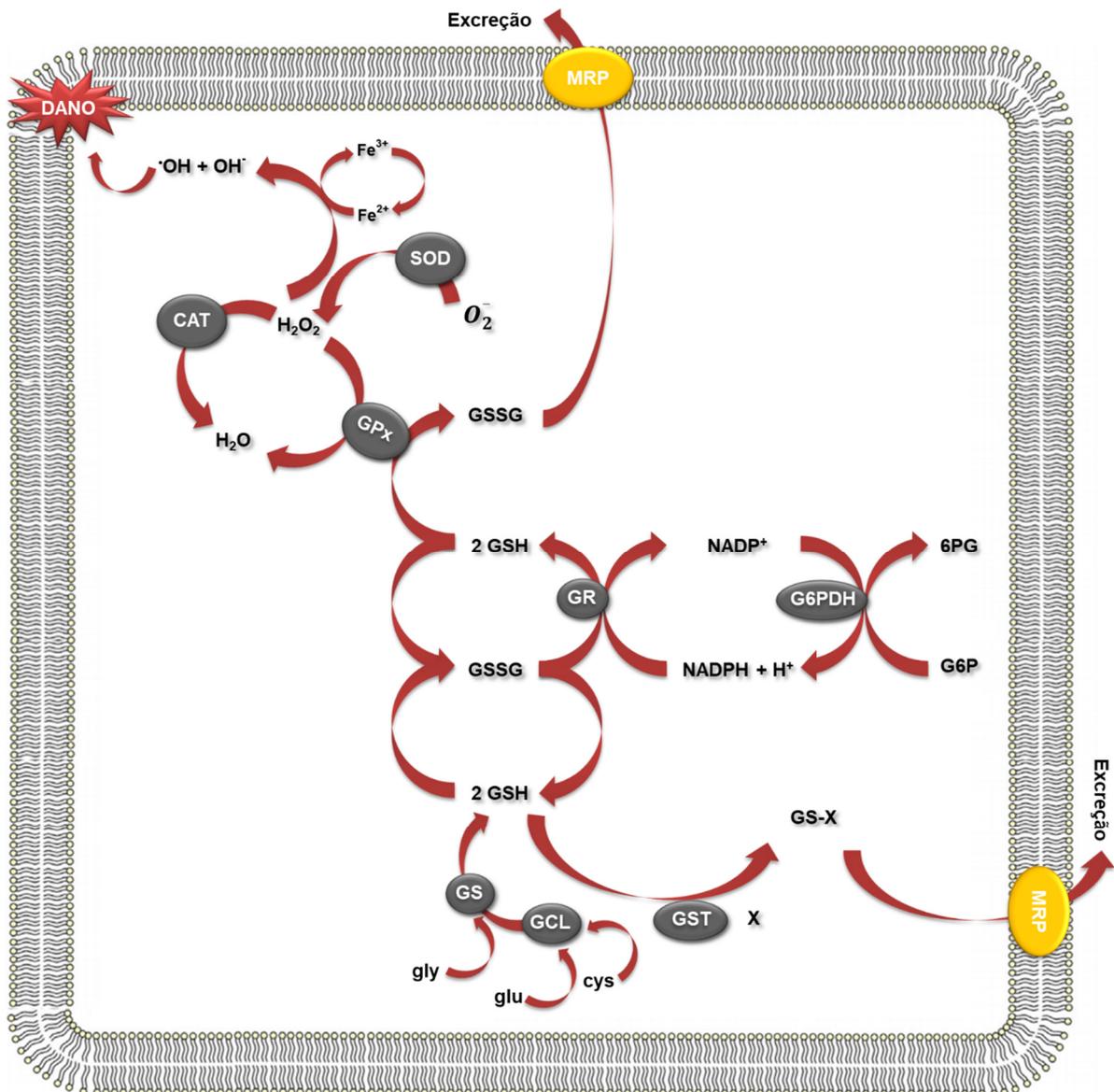
*PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
Fonte: KAUSHIK e ROYCHOUDHURY, 2014.

Há alguns mecanismos endógenos de geração de EROs. Por exemplo, a reação não enzimática do H_2O_2 com o Fe^{2+} resulta na produção do $\cdot OH$, na chamada reação de Fenton. A reação do O_2^- com o Fe^{3+} gerado a partir da reação anterior também pode gerar o $\cdot OH$ através da reação de Haber-weiss (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 2007). Ainda, xenobióticos podem aumentar a produção de $\cdot\text{OH}$, espécie mais reativa dentre as EROs, através de reações *redox* com outros metais de transição, tais como cobre (Cu), níquel (Ni) e cobalto (Co), desta forma, a produção de EROs evidencia o mecanismo de toxicidade de diversos contaminantes (BLASCO et al., 2016).

Como visto, as EROs são naturalmente formadas. No entanto, a produção destas EROs pode ser acentuada na presença de xenobióticos, o que pode levar a um quadro de estresse oxidativo. O estresse oxidativo se estabelece quando EROs transpassam as defesas antioxidantes (FERNANDES et al., 2018). Para tanto, os organismos são dotados de um sistema de defesa antioxidante (Figura 4), formado por moléculas não-enzimáticas e enzimáticas que previnem os efeitos negativos relacionados às EROs, tais como desbalanço *redox*, inativação de enzimas e peroxidação lipídica. Estas moléculas interagem em uma rede sofisticada, agindo direta ou indiretamente, auxiliando para que a detoxificação ocorra, sendo então, responsáveis por neutralizar EROs e proteger os organismos contra o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; REGOLI; GIULIANI, 2014).

Figura 4 – Esquema simplificado do sistema de defesa antioxidante: 6PG: 6-fosfogluconato; CAT: catalase; cys: cisteína; G6P: glicose 6-fosfato; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase; GCL: glutamato-cisteína ligase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; gly: glicina; glu: ácido glutâmico; GS: glutatona sintetase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona dissulfeto; GST: glutatona S-transferase; GS-X: xenobiótico conjugado à GSH; MRP: proteína relacionada à resistência de múltiplas drogas; SOD: superóxido dismutase; X: xenobiótico



Fonte: Adaptado de REGOLI e COLS., 2011.

As biomoléculas não enzimáticas que fazem parte deste elaborado sistema são responsáveis por sequestrar estas EROs, sendo estas, polifenóis, ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, glutatona reduzida, dentre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; REGOLI et al., 2011). Já as enzimáticas, são ubíquas e

altamente conservadas em sua natureza catalítica (CHAINY; PAITAL; DANDAPAT, 2016). Dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) atua dismutando o ânion superóxido em H_2O_2 , que pode ser neutralizado por duas enzimas, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A CAT decompõe o H_2O_2 em oxigênio e água, enquanto a GPx reduz este e outros hidroperóxidos orgânicos, utilizando como cofator a glutathione reduzida (GSH), gerando, conseqüentemente, glutathione dissulfídica (GSSG). A glutathione redutase (GR) exerce um papel essencial em reduzir a GSSG, às custas da coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) à GSH. Por sua vez, o NADP é regenerado em NADPH pela enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Os excessos de GSSG, assim como metabólitos (GS-X), resultantes da conjugação da glutathione (GSH) com xenobióticos, mediada pela glutathione S-transferase (GST) são eliminados através do MRP (REGOLI; GIULIANI, 2013). Diante do exposto, a glutathione (GSH) exerce papel fundamental tanto na biotransformação de xenobióticos, quanto na detoxificação de EROs e a biossíntese desta molécula ocorre em duas etapas, a primeira através da enzima glutamato-cisteína ligase (GCL), formando o dipeptídeo γ -glutamil-cisteína e a segunda etapa através da adição da glicina pela enzima glutathione sintetase (GS) (REGOLI et al., 2011).

O sistema de defesa antioxidante é, então, uma importante ferramenta para monitorar a presença e efeitos de EROs, possuindo papel fundamental no balanço celular entre contaminantes que promovem oxidação e antioxidantes, mantendo, assim, a homeostase celular. Sua indução previne o estresse oxidativo, porém exposições prologadas a agentes estressores podem causar depleção de alguns dos seus principais componentes, desregulando alguns processos metabólicos, levando ao aumento de danos oxidativos às biomoléculas (CHAINY; PAITAL; DANDAPAT, 2016; LUSHCHAK, 2011).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), as principais implicações do estresse oxidativo são:

- a) Proliferação celular: aumento da taxa de divisão celular como resposta a um leve estresse oxidativo;
- b) adaptação e/ou regulação do sistema de defesas celulares, podendo: proteger completamente contra danos; proteger parcialmente contra danos;

“superproteger” – a célula torna-se resistente a altos níveis de estresse oxidativo que estão por vir;

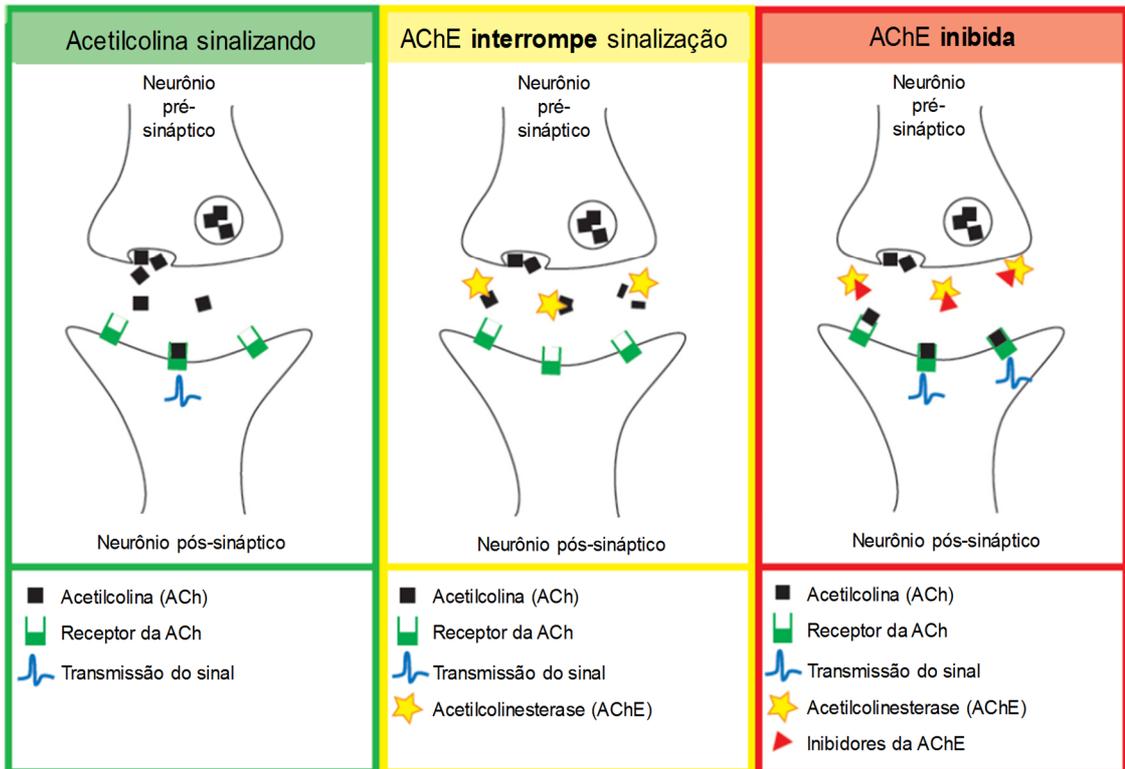
- c) dano celular: danos a um ou mais tipos de moléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc. Tais danos podem ser o “gatilho” que leva à adaptação;
- d) senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido;
- e) morte celular: após o dano, a célula pode: recuperar-se do dano oxidativo promovendo seu reparo ou substituindo-a; sobreviver com danos oxidativos irreparáveis; ou danos oxidativos, em especial ao DNA, podem desencadear morte celular por apoptose, por necrose ou morte celular de mecanismos intermediários a estes extremos.

Desta forma, existe um crescente interesse em estudos sobre o estresse oxidativo em organismos aquáticos, especialmente em moluscos bivalves, por terem grandes variações em suas defesas antioxidantes quando expostos a diferentes contaminantes.

1.4.2.3 Parâmetros neurotóxicos

A enzima acetilcolinesterase (AChE), pertencente à família das colinesterases (ChE), exerce papel central no término da transmissão de impulsos nervosos, catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em várias vias colinérgicas nos sistemas nervosos central e periférico. Após ativação de receptores da acetilcolina, a AChE hidrolisa a ACh (BLASCO et al., 2016), formando colina e acetato na membrana pós sináptica, como apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema de ação da enzima acetilcolinesterase



Fonte: Adaptado de “Organophosphate Pesticides and Child Health: A Primer for Health Care Providers - Acute Poisoning”. (2018).

A atividade AChE vem sendo utilizada há décadas como biomarcador da contaminação por pesticidas organofosforados e carbamatos, conhecidos inibidores da enzima (LIONETTO et al., 2013). Quando a enzima é inibida, ocorre o acúmulo de ACh promovendo estímulos contínuos dos receptores de ACh, resultando em toxicidade colinérgica e estado de tetanização (BONACCI; CORSI; FOCARDI, 2009). Adicionalmente, alguns estudos mostraram efeitos inibitórios de metais, HPAs, detergentes e outras misturas complexas na atividade desta enzima em diferentes organismos aquáticos (JEBALI et al., 2006; LIONETTO et al., 2003; PÉREZ; BLASCO; SOLÉ, 2004; RICHETTI et al., 2010). Em estudos realizados com zebrafish (*Danio rerio*) os autores observaram, que altas concentrações dos metais cádmio e chumbo, são capazes de causar alterações fisiológicas nos animais, inibindo assim a atividade da AChE (LIMA et al., 2013). Por outro lado, a atividade da AChE já foi determinada em diferentes organismos aquáticos, tais com o peixe *Solea solea*, em invertebrados *Palaemon serratus*, *Crangon crangon*, *Mytilus edulis*, *C. gigas* e *Nereis sp*, para avaliar inibição por pesticidas organofosforados e carbamatos, pesticidas frequentemente utilizados em atividades de agrícolas.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da contextualização apresentada sobre os problemas ambientais presentes no Sistema Estuarino de Laguna, associada à sua importância ecológica e econômica para a região, torna-se pertinente o biomonitoramento para avaliação da sua qualidade ambiental. Desta forma, este trabalho apresenta respostas de biomarcadores bioquímicos e sua relação com a presença de metais bioacumulados em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. gasar* expostas, por até 45 dias, em dois locais do Sistema Estuarino de Laguna. Os resultados aqui mostrados representam subsídios para a aplicação de um efetivo programa de biomonitoramento do sistema.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os padrões de bioacumulação de metais e as respostas bioquímicas em ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, expostas por 45 dias no Sistema Estuarino de Laguna, SC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

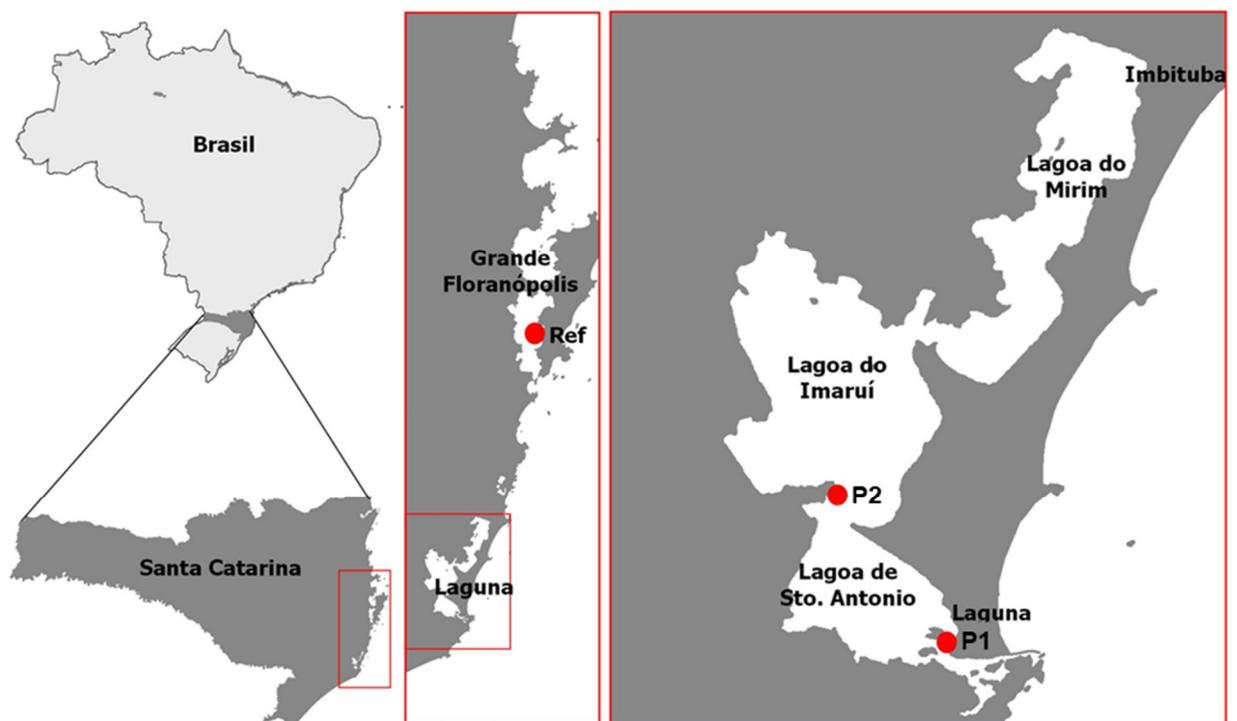
- a) Determinar a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e acetilcolinesterase (AChE) em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue mantidas no grupo referência e expostas *in situ* no Sistema Estuarino de Laguna, durante 7, 15, 30 e 45 dias;
- b) Avaliar a variação espaço-temporal das atividades das enzimas supracitadas em brânquias e glândulas digestivas da ostra do mangue;
- c) Avaliar o padrão de bioacumulação de metais (alumínio, bário, cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, fósforo, chumbo, antimônio, escândio, selênio, estanho, vanádio e zinco) em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue mantidas no grupo referência e expostas *in situ* no Sistema Estuarino de Laguna, durante 7, 15, 30 e 45 dias.

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE ESTUDO E EXPERIMENTO DE CAMPO

A escolha dos locais de estudo no Sistema Estuarino de Laguna foi baseada em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (FERREIRA, 2015; PIAZZA, 2016; SOUZA, 2015). Os pontos escolhidos possuem características distintas, sendo estas: P1 - centro de Laguna, caracterizado por receber efluentes domésticos e urbanos do município de Laguna, e localizado próximo à foz do Rio Tubarão, sendo fortemente impactado por efluentes gerados no entorno do rio. P2 - ponte Anita Garibaldi, encontra-se sob forte influência de atividades de rizicultura intensiva. De acordo com a Polícia Militar Ambiental de Laguna e pescadores locais, a região da ponte é um ponto de recuo das marés (vazante e cheia), ocorrendo grande aporte de sedimento no local; Ref - Grupo referência localizado em uma baía ao sul da ilha em Florianópolis, na Caeira da Barra do Sul, local considerado sem contaminação, onde são cultivadas ostras comercializadas para o consumo humano (Figura 6).

Figura 6 – Indicação dos pontos de exposição no Sistema Estuarino de Laguna, SC e do grupo referência localizado em Florianópolis, SC



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em outubro de 2017, aproximadamente 150 ostras do mangue adultas, *Crassostrea gasar*, com $6,31 \pm 0,31$ cm de altura, foram transplantadas da Caiera da Barra do Sul em Florianópolis, SC, para os dois pontos de estudo (P1 e P2) no Sistema Estuarino de Laguna, SC. Destes, dez animais foram imediatamente amostrados e caracterizados como tempo inicial, enquanto os demais foram expostos em mini balsas flutuantes (Figura 7) por 7, 15, 30 e 45 dias. As ostras eram do mesmo lote proveniente do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM, UFSC).

Figura 7 – Mini balsas flutuantes utilizadas para exposição das ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, no Sistema Estuarino de Laguna, SC



Fonte: Arquivo pessoal da autora, 2015.

Após 7, 15, 30 e 45 dias, 16 ostras de cada ponto de exposição e do grupo referência foram coletadas, antes de as balsas do grupo de exposição retornarem à água era feita a limpeza das incrustações, nas conchas e na balsa, após as ostras eram transportadas para dois laboratórios para o imediato processamento dos tecidos. As ostras de P1 e P2 foram dissecadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM, CERES/UFSC), em Laguna, enquanto os animais do grupo Ref foram dissecados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI, NEPAq/UFSC), em Florianópolis. De cada grupo amostrado, dez ostras foram destinadas às análises de biomarcadores, e as seis restantes foram usadas para análise química de bioacumulação de metais. Para ambos os parâmetros, foram separadas brânquias e glândulas digestivas.

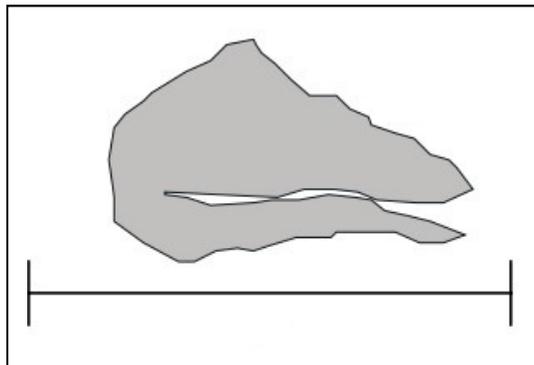
Para biomarcadores, as brânquias e glândulas digestivas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Estes parâmetros foram analisados em colaboração com o LABCAI, UFSC.

Para a análise química de metais bioacumulados em ostras, as brânquias e glândulas digestivas dissecadas foram lavadas três vezes com água artificialmente salgada na salinidade de 25 e colocadas, individualmente, em criotubos de 2 mL previamente pesados e marcados. Os criotubos foram mantidos abertos em estufa a 60°C por 15 dias até desidratação completa das amostras. Após desidratação, os criotubos foram fechados e pesados novamente para a determinação do peso seco da amostra em gramas. As análises químicas de metais foram realizadas pelo Departamento de Oceanografia e Limnologia (DEOLI) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

De cada ostra dissecada, foi realizada a biometria, que consistiu na determinação de medida da altura (Figura 8), com paquímetro de precisão de duas casas decimais, e a pesagem dos animais (com e sem concha). Os pesos foram obtidos através de balança analítica com precisão de 0,01 g. Para obtenção do peso da carne das ostras, subtraiu-se o peso das ostras com concha, do peso apenas das conchas.

A salinidade e temperatura foram medidas no momento de cada coleta.

Figura 8 – Medida da altura (em cm) das ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, amostradas no Sistema Estuarino de Laguna, SC



Fonte: Adaptada de LOPES (2008).

4.2 ANÁLISES DE METAIS

Cerca de 0,1 g de tecido de ostra desidratado foram pesados em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g e colocados em tubos de *teflon*. Após a pesagem, 2 mL de ácido nítrico a 65% foram adicionados para o procedimento de digestão da amostra a uma temperatura de 200°C. As amostras foram resfriadas e o material

obtido foi transferido para tubos *Falcon* de 50 mL. Foram adicionados ao tubo de teflon, cerca de 10 mL de água Milli-Q para recuperar todo o material restante, transferindo-os em seguida para seus respectivos tubos *Falcon*. Ao final desse processo, as amostras foram aferidas com água Milli-Q a um volume final de 30 mL.

As análises de metais foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado-ICP-OES (marca: Shimadzu; modelo: ICPE-9800). As concentrações da curva de calibração foram obtidas através de diluições de um padrão para 15 elementos, cujas concentrações foram o branco (água+HNO₃); 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/L. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Foram analisados no total 17 metais, sendo eles: alumínio (Al), bário (Ba), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), fósforo (P), chumbo (Pb), antimônio (Sb), escândio (Sc), selênio (Se), estanho (Sn), vanádio (V) e zinco (Zn). As concentrações foram expressas em µg/g de peso seco (ps).

4.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Foram realizadas análises de enzimas representantes do sistema de defesa antioxidante, que incluíram as enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), além das enzimas auxiliares glutathione reductase (GR) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Também foi analisada a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) como representante da fase II do sistema de biotransformação de xenobióticos e como representante de processos neurotóxicos, através da atividade da (AChE).

A homogeneização das amostras de brânquias e glândulas digestivas foram realizadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6, contendo EDTA 1 mM, sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM, e centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi separado em alíquotas para as análises bioquímicas, e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

A atividade da CAT foi quantificada de acordo com Aebi (1984), medindo a velocidade de decomposição de H₂O₂ pela enzima, através do decréscimo de absorbância a 240 nm a 25°C. A atividade GPx foi medida indiretamente monitorando a taxa de oxidação de NADPH a 340 nm, utilizando hidroperóxido de cumeno (C₆H₅C(CH₃)₂OOH) (WENDEL, 1981). A GR utiliza elétrons do NADPH para reduzir

o substrato glutationa dissulfídica (GSSG). O decréscimo de absorvância no comprimento de onda de 340 nm foi quantificado como medida indireta da atividade desta enzima (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade G6PDH foi determinada com o aumento de absorvância gerado pela redução de NADP⁺ à NADPH, no comprimento de onda de 340 nm (GLOCK; MCLEAN, 1953).

A determinação da atividade GST foi quantificada, baseada na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH, realizando uma leitura em espectrofotômetro a 340 nm (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

A análise da atividade da AChE foi realizada de acordo com o método de Ellman et al. (1961), baseado na reação entre o produto da hidrólise da acetilticolina, a tiocolina, com o ácido 5,5'-ditio-(2-nitrobenzoico) (DTNB). A reação torna-se amarela ao longo do tempo, sendo então, quantificado durante 2 minutos a 412 nm, a 25 °C.

A dosagem total de proteínas presentes na fração sobrenadante foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), que envolve a ligação do *Coomassie Brilliant Blue G-250* às proteínas, quantificado a 595 nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Todas as análises foram realizadas em duplicatas em espectrofotômetro de placas SpectraMax® M5 (Molecular Devices®).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos resultados, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett) e, quando necessário, os dados sofreram transformação logarítmica. Dados discrepantes foram removidos de acordo com o teste de Grubbs. Os dados foram comparados através de uma análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), considerando os fatores ponto e tempo. Para verificar a fonte de variação, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de Tukey HSD. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas através do *software* R.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, TEMPERATURA E SALINIDADE

Os parâmetros biométricos altura (cm) e peso (g) das ostras estudadas estão apresentados na Tabela 4. Os valores iniciais foram mensurados no tempo inicial e ao final de cada período de exposição. Em P1, são apresentados os dados de 7, 15 e 30 dias, devido à perda da mini balsa antes dos 45 dias de exposição *in situ*.

Aparentemente as ostras mantidas no Sistema Estuarino de Laguna não tiveram variações na altura (cm) e peso da carne (g). Por outro lado, as ostras do grupo referência tinham alturas menores nas coletas realizadas em 7 e 15 dias, refletindo nos menores pesos nestes tempos de amostragem. O peso total foi maior nas ostras mantidas no estuário (Tabela 4), que também possuíam maiores incrustações em suas valvas (Figura 9), o que possivelmente influenciou no seu peso total.

Tabela 4 – Dados biométricos de ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, da Caeira da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas em dois locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC (P1 e P2). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão

	Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Altura (cm)					
Ref	6,31 \pm 0,31	5,53 \pm 0,46	5,73 \pm 0,67	6,22 \pm 0,45	6,88 \pm 0,61
P1	6,31 \pm 0,31	6,76 \pm 0,55	6,61 \pm 0,66	6,88 \pm 0,69	-
P2	6,31 \pm 0,31	6,74 \pm 0,73	6,69 \pm 0,51	7,06 \pm 0,67	6,96 \pm 0,76
Peso da carne (g)					
Ref	25,17 \pm 4,26	18,34 \pm 4,28	17,53 \pm 4,97	22,76 \pm 4,51	25,71 \pm 4,35
P1	25,17 \pm 4,26	28,08 \pm 5,73	26,10 \pm 4,58	28,05 \pm 3,96	-
P2	25,17 \pm 4,26	29,11 \pm 6,27	26,74 \pm 3,41	28,87 \pm 5,52	30,14 \pm 7,77
Peso total (g)					
Ref	88,85 \pm 15,98	66,725 \pm 9,08	56,01 \pm 8,97	84,16 \pm 18,91	98,77 \pm 10,41
P1	88,85 \pm 15,98	95,93 \pm 17,06	87,95 \pm 14,66	92,18 \pm 11,90	-
P2	88,85 \pm 15,98	97,65 \pm 23,67	93,91 \pm 10,65	99,15 \pm 15,72	94,67 \pm 19,77

Ref – grupo referência; P1 – centro de Laguna; P2 – ponte Anita Garibaldi
 Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 9 – Ostras do mangue (*Crassostrea gasar*) antes da exposição (esquerda), após 45 dias de exposição (direita) no P2 no Sistema Estuarino de Laguna, SC



Fonte: Arquivo pessoal da autora, 2018.

A temperatura atmosférica no período do experimento foi de $26,54^{\circ}\text{C} \pm 3,23^{\circ}\text{C}$, enquanto a temperatura da água foi de $23,14^{\circ}\text{C} \pm 2,06^{\circ}\text{C}$. Inicialmente a salinidade registrada foi de 29, mostrando maiores variações, principalmente no P2 que apresentou a menor salinidade (24) após 7 dias de exposição, e P1 apresentando a maior salinidade (34) após 30 dias de exposição, como observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Salinidade da água no Caiera da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC

Salinidade	Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Ref	29	29	31	32	28
P1	29	29	30	34	-
P2	29	24	29	32	32

Ref – grupo referência; P1 – centro de Laguna; P2 – ponte Anita Garibaldi

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Analisar ambientes naturais é muito mais complexo, do que estudos em sistemas controlados, sendo difícil identificar a relação entre os fatores ambientais e

a biota associada (SHENAI-TIRODKAR et al., 2018). De fato, parâmetros como salinidade e temperatura da água, e sua relação com a bioacumulação de contaminantes e resposta de biomarcadores, têm sido incessantemente investigados em bivalves marinhos, o que reforça a influência de tais parâmetros nestes organismos (LIMA et al., 2018; MOREIRA et al., 2017; MÜLLER et al., 2017; YANG et al., 2016; ZACCHI et al., 2017). Entretanto, os dados apresentados no presente trabalho não mostraram variações abruptas nestes parâmetros ao longo do tempo e pontos de exposição, possivelmente, pela falta de precipitação durante o período de estudos. Visto que a chuva contribui para o aumento do nível do Rio Tubarão, aumentando o aporte de água doce no estuário e a salinidade chegando a ser menor que 10 (PIAZZA, 2016).

5.2 METAIS EM OSTRAS DO MANGUE *Crassostrea gasar*

As concentrações de metais nas brânquias e glândulas digestivas das ostras amostradas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de metais ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, da Caiera da Barra do Sul, Florianópolis (grupo referência), e expostas nos diferentes locais do Sistema Estuarino de Laguna, SC. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$. O sinal <LD indica abaixo dos limites de detecção (continua)

Metal		Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
<i>Alumínio (Al)</i>						
	Ref	105,48 \pm 17,73	120,42 \pm 44,03	148,51 \pm 49,96	129,68 \pm 16,09	133,79 \pm 30,83
Brânquia	P1	105,48 \pm 17,73	126,41 \pm 12,74	126,72 \pm 9,22	112,11 \pm 16,85	-
	P2	105,48 \pm 17,73	171,34 \pm 30,51	109,13 \pm 8,29	110,21 \pm 13,12	89,87 \pm 38,69
Glândula digestiva	Ref	106,33 \pm 27,31	133,86 \pm 41,57	111,79 \pm 34,60	83,90 \pm 22,63	139,84 \pm 55,83
	P1	106,33 \pm 27,31	187,75 \pm 81,59	217,43 \pm 132,01	170,28 \pm 21,87	-
	P2	106,33 \pm 27,31	173,90 \pm 37,47	154,03 \pm 64,81	137,05 \pm 49,52	154,20 \pm 39,63

(continuação)

Metal		Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
<i>Bário (Ba)</i>						
	Ref	0,15±0,17	0,06±0,03	0,09±0,06	0,01±0,02	0,24±0,26
Brânquia	P1	0,15±0,17	0,10±0,02	<LD	<LD	-
	P2	0,15±0,17	0,08±0,03	<LD	0,16±0,19	0,04±0,05
Glândula digestiva	Ref	0,35±0,06 ^{ab}	0,38±0,22 ^{ab}	0,33±0,13 ^{ab}	0,14±0,04 ^a	0,54±0,17 ^{bA}
	P1	0,35±0,06 ^{ab}	0,37±0,17 ^{ab}	0,59±0,31 ^a	0,19±0,08 ^b	-
	P2	0,35±0,06	0,31±0,05	0,29±0,08	0,13±0,08	0,22±0,06 ^B
<i>Cádmio (Cd)</i>						
	Ref	5,03±1,17 ^{ab}	4,87±0,96 ^{abA}	3,55±0,48 ^{aA}	5,03±0,88 ^{abA}	5,90±0,92 ^{bA}
Brânquia	P1	5,03±1,17 ^a	6,69±0,72 ^{abB}	7,76±1,19 ^{bB}	7,70±1,36 ^{bB}	-
	P2	5,03±1,17 ^a	11,83±3,01 ^{bC}	11,47±2,89 ^{bC}	12,72±2,34 ^{bC}	12,07±3,42 ^{bB}
Glândula digestiva	Ref	2,38±0,31	2,81±0,97	2,47±0,23	2,49±0,50 ^A	3,59±0,31 ^A
	P1	2,38±0,31	3,31±0,25	3,70±0,62	3,03±0,30 ^{AB}	-
	P2	2,38±0,31 ^a	3,64±0,98 ^{ab}	3,69±0,87 ^{ab}	4,95±1,15 ^{bcB}	5,81±1,68 ^{cB}
<i>Cobalto (Co)</i>						
	Ref	1,72±0,18 ^{ab}	2,52±0,47 ^{aA}	1,31±0,31 ^{bA}	2,02±0,40 ^a	2,20±0,22 ^a
Brânquia	P1	1,72±0,18 ^a	1,53±0,22 ^{aB}	1,56±0,19 ^{aA}	1,40±0,35 ^a	-
	P2	1,72±0,18 ^a	2,46±0,65 ^{abA}	2,69±0,35 ^{bB}	1,44±0,19 ^a	1,94±0,81 ^{ab}
Glândula digestiva	Ref	1,57±0,19 ^a	1,43±0,36 ^{ab}	0,85±0,19 ^b	0,82±0,16 ^{bA}	1,09±0,19 ^{ab}
	P1	1,57±0,19 ^a	1,65±0,12 ^a	1,28±0,34 ^{ab}	0,74±0,39 ^{bA}	-
	P2	1,57±0,19 ^a	0,98±0,37 ^{ab}	1,13±0,25 ^{ab}	1,47±0,47 ^{abB}	0,86±0,46 ^b
<i>Cromo (Cr)</i>						
	Ref	4,09±0,09	4,17±0,22	4,12±0,10	4,51±0,53	4,74±0,57 ^A
Brânquia	P1	4,09±0,09	4,09±0,09	4,11±0,15	3,95±0,14	-
	P2	4,09±0,09	4,60±0,54	4,09±0,19	4,08±0,05	3,62±0,29 ^B
Glândula digestiva	Ref	4,44±0,24	4,56±0,13	4,44±0,18	4,35±0,20	4,41±0,23
	P1	4,44±0,24	4,42±0,17	4,62±0,22	4,21±0,33	-
	P2	4,44±0,24	4,62±0,41	4,27±0,11	4,21±0,09	4,16±0,07
<i>Cobre (Cu)</i>						
	Ref	16,09±3,01	13,28±3,22	13,70±3,27	16,21±5,18	19,28±2,12
Brânquia	P1	16,09±3,01	18,53±3,78	19,37±2,12	17,39±3,55	-
	P2	16,09±3,01 ^{ab}	20,54±5,22 ^a	19,12±6,30 ^{ab}	11,67±5,41 ^b	17,95±5,38 ^{ab}
Glândula digestiva	Ref	11,42±4,58	15,25±5,97	12,96±2,43	9,87±2,63	16,48±5,19
	P1	11,42±4,58	14,66±3,61	13,41±4,38	13,45±2,55	-
	P2	11,42±4,58	15,28±0,72	16,10±4,87	11,75±7,39	23,03±12,43

(continuação)

Metal		Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
<i>Ferro (Fe)</i>						
	Ref	96,98±10,32	101,43±14,59	84,16±7,20	103,10±21,94	108,52±12,78 ^A
Brânquia	P1	96,98±10,32 ^{ab}	104,78±7,11 ^a	96,46±6,86 ^{ab}	80,95±15,65 ^b	-
	P2	96,98±10,32 ^{ab}	123,14±13,94 ^a	106,99±22,83 ^{ab}	82,08±6,81 ^{bc}	63,16±13,85 ^{cB}
Glândula digestiva	Ref	79,06±6,90 ^{ab}	84,94±24,00 ^{ab}	81,38±16,10 ^{ab}	65,33±10,44 ^a	111,05±12,34 ^b
	P1	79,06±6,90	123,17±37,84	114,25±16,50	112,99±14,00	-
	P2	79,06±6,90	134,42±52,40	94,49±24,40	72,23±9,11	92,39±20,71
<i>Manganês (Mn)</i>						
	Ref	4,73±0,61	5,04±0,31	4,29±0,53 ^A	5,21±1,21	5,56±1,24
Brânquia	P1	4,73±0,61	6,24±1,26	4,90±0,72 ^{AB}	6,03±1,10	-
	P2	4,73±0,61 ^a	6,93±0,74 ^b	6,52±1,12 ^{abB}	5,86±1,42 ^{ab}	4,95±1,24 ^{ab}
Glândula digestiva	Ref	5,68±0,61	7,65±0,33	6,01±0,72	5,40±0,88 ^A	7,50±1,21
	P1	5,68±0,61 ^a	8,27±1,07 ^b	8,62±2,12 ^b	8,91±1,42 ^{bbB}	-
	P2	5,68±0,61	8,55±2,64	7,30±1,59	7,04±3,50 ^{AB}	7,97±1,66
<i>Níquel (Ni)</i>						
	Ref	2,88±0,16 ^{ab}	3,12±0,29 ^{ab}	2,77±0,20 ^{aA}	3,24±0,46 ^{ab}	3,47±0,28 ^{bA}
Brânquia	P1	2,88±0,16	3,16±0,15	3,24±0,13 ^B	3,11±0,33	-
	P2	2,88±0,16	2,98±0,27	3,01±0,20 ^{AB}	3,05±0,18	2,71±0,30 ^B
Glândula digestiva	Ref	2,69±0,20	2,81±0,19	2,62±0,18	2,61±0,50	2,69±0,09
	P1	2,69±0,20	2,61±0,11	2,81±0,14	2,61±0,27	-
	P2	2,69±0,20	2,68±0,15	2,62±0,07	2,64±0,26	3,25±0,85
<i>Fósforo (P)</i>						
	Ref	4070,5±373,9 ^{ab}	4165,1±410,9 ^{ab}	3587,9±202,1 ^{aA}	4176,1±643,9 ^{ab}	4544,3±427,1 ^b
Brânquia	P1	4070,5±373,9	4652,1±194,3	4513,4±227,5 ^B	4621,6±240,1	-
	P2	4070,5±373,9	5188,1±545,5	4573,9±487,4 ^B	4750,8±604,6	4434,4±589,2
Glândula digestiva	Ref	3072,9±151,4 ^a	3424,5±554,2 ^{ab}	3212,2±149,4 ^{ab}	3153,8±153,1 ^a	3859,0±194,6 ^b
	P1	3072,9±151,4 ^a	3819,6±180,6 ^b	3826,91±21715 ^b	3842,14±426,22 ^b	-
	P2	3072,9±151,4 ^a	3807,6±687,7 ^{ab}	3537,0±348,2 ^{ab}	3825,1±435,5 ^b	3979,2±348,2 ^b
<i>Chumbo (Pb)</i>						
	Ref	0,64±0,28	0,57±0,31	0,64±0,12	0,59±0,06	0,64±0,36
Brânquia	P1	0,64±0,28	0,62±0,24	0,66±0,29	0,51±0,16	-
	P2	0,64±0,28	0,66±0,29	0,57±0,19	0,62±0,30	0,42±0,14
Glândula digestiva	Ref	0,77±0,13	0,87±0,25	0,74±0,23	0,78±0,09	0,82±0,11
	P1	0,77±0,13	0,78±0,27	0,54±0,20	0,74±0,41	-
	P2	0,77±0,13	0,88±0,56	0,67±0,17	0,85±0,09	0,94±0,45

(continuação)

Metal		Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
<i>Antimônio (Sb)</i>						
	Ref	<LD	<LD	<LD	0,75±0,12 ^a	1,02±0,07 ^b
Brânquia	P1	<LD	0,73±0,09	0,82±0,05	0,83±0,06	-
	P2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Glândula digestiva	Ref	0,54±0,05 ^a	0,56±0,12 ^{aA}	0,55±0,01 ^{aA}	0,69±0,05 ^b	0,77±0,04 ^b
	P1	0,54±0,05	0,61±0,06 ^{AB}	0,66±0,04 ^{AB}	0,74±0,15	-
	P2	0,54±0,05 ^a	0,70±0,09 ^{bB}	0,73±0,07 ^{bB}	<LD	<LD
<i>Escândio (Sc)</i>						
	Ref	0,51±0,03 ^a	0,72±0,10 ^{bA}	0,52±0,05 ^{aA}	0,60±0,04 ^{abA}	0,63±0,10 ^{abA}
Brânquia	P1	0,51±0,03	0,49±0,03 ^B	0,45±0,02	0,43±0,05 ^B	-
	P2	0,51±0,03 ^{ac}	0,69±0,13 ^{bA}	0,63±0,13	0,43±0,06 ^{cdB}	0,31±0,14 ^{dB}
Glândula digestiva	Ref	0,73±0,06	0,69±0,10	0,53±0,03	0,49±0,03	0,58±0,14
	P1	0,73±0,06	0,69±0,06	0,58±0,07	0,50±0,04	-
	P2	0,73±0,06	0,51±0,04	0,50±0,03	0,66±0,12	0,52±0,06
<i>Selênio (Se)</i>						
	Ref	1,32±0,77	2,50±1,10	2,39±1,05	1,67±1,69	1,27±0,57
Brânquia	P1	1,32±0,77	<LD	<LD	<LD	-
	P2	1,32±0,77	3,27±1,94	2,53±1,31	2,48±1,81	2,74±0,61
Glândula digestiva	Ref	2,50±1,82	2,89±1,21	2,28±0,32	1,41±1,27	2,81±1,14
	P1	2,50±1,82	3,38±0,85	2,21±1,40	1,53±1,38	-
	P2	2,50±1,82	2,04±1,22	1,38±0,96	2,35±1,07	3,45±2,50
<i>Estanho (Sn)</i>						
	Ref	0,25±0,10	0,48±0,11	0,41±0,24	0,41±0,09	0,36±0,36
Brânquia	P1	0,25±0,10	0,40±0,23	0,21±0,15	0,33±0,15	-
	P2	0,25±0,10	0,43±0,23	0,25±0,14	0,36±0,21	0,33±0,13
Glândula digestiva	Ref	0,38±0,18	0,41±0,18	0,38±0,21	0,42±0,25	0,41±0,28
	P1	0,38±0,18	0,45±0,08	0,92±0,85	0,63±0,09	-
	P2	0,38±0,18	0,40±0,21	0,40±0,18	0,33±0,19	0,41±0,12
<i>Vanádio (V)</i>						
	Ref	0,36±0,07	0,26±0,06	0,31±0,08	0,29±0,06	0,37±0,06 ^A
Brânquia	P1	0,36±0,07	0,36±0,12	0,32±0,04	0,42±0,04	-
	P2	0,36±0,07 ^a	0,30±0,05 ^{ab}	0,33±0,14 ^{ab}	0,32±0,07 ^{ab}	0,19±0,09 ^{bB}
Glândula digestiva	Ref	4,35±0,72 ^a	2,24±0,67 ^b	5,16±1,14 ^{abA}	3,14±0,76 ^{abA}	3,25±0,24 ^{abA}
	P1	4,35±0,72 ^a	1,17±0,16 ^b	1,10±0,05 ^{bB}	0,86±0,41 ^{bB}	-
	P2	4,35±0,72 ^a	1,02±0,14 ^b	1,07±0,24 ^{bB}	0,99±0,19 ^{bB}	0,89±0,04 ^{bB}

(conclusão)

Metal		Inicial	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
<i>Zinco (Zn)</i>						
	Ref	283,1±45,5 ^{ab}	247,4±39,5 ^a	216,6±33,3 ^{aA}	284,3±51,5 ^{abA}	401,7±47,9 ^b
Brânquia	P1	283,1±45,5 ^a	305,8±42,1 ^{ab}	357,8±60,5 ^{abB}	448,3±47,4 ^{bB}	-
	P2	283,1±45,5	340,6±48,2	384,8±80,8 ^B	404,3±172,8	399,0±149,1
Glândula digestiva						
	Ref	141,7±34,9	168,9±52,5	124,3±26,2	132,7±43,9	173,9±40,6
Glândula digestiva	P1	141,7±34,9	164,1±30,8	170,6±14,6	194,9±36,3	-
	P2	141,7±34,9	166,7±17,9	181,0±38,4	160,5±77,9	237,7±128,0

Ref – grupo referência; P1 – centro de Laguna; P2 – ponte Anita Garibaldi.
 Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os metais alumínio (Al), chumbo (Pb), estanho (Sn) e selênio (Se) não foram significativamente diferentes ao longo do tempo e pontos de exposição nos dois tecidos estudados. O bário (Ba) não apresentou diferenças nas brânquias, enquanto cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni), e zinco (Zn) não diferiram nas glândulas dos organismos amostrados.

As concentrações de Ba nas brânquias não diferiram significativamente entre os locais e tempos de exposição, porém após 15 e 30 dias estavam abaixo do limite de detecção em P1, e em 15 dias no P2. Na glândula digestiva, houve um aumento da concentração deste metal em P1 após 15 dias ($0,59 \pm 0,31 \mu\text{g/g ps}$) no entanto, após 30 dias estavam próximos aos valores iniciais ($0,35 \pm 0,06 \mu\text{g/g ps}$). No P2, os valores quantificados no final do estudo estavam menores ao identificado no mesmo período do grupo referência. As concentrações de bário encontradas no presente estudo variaram de 0,1 a 0,6 $\mu\text{g/g ps}$ nos organismos expostos e encontravam-se abaixo das concentrações detectadas em ostras *Crassostrea virginica* amostradas em uma área de proteção ambiental no Golfo do México, cujos níveis variaram de 1,1 a 2,4 $\mu\text{g/g ps}$ (AGUILAR et al., 2012). Estes resultados indicam que o Ba não é um contaminante para o estuário.

Por outro lado, as concentrações de cádmio (Cd) foram estatisticamente maiores nas ostras expostas no Sistema Estuarino de Laguna, quando comparadas ao grupo referência, bem como ao longo do tempo. Nas brânquias, os animais mantidos em P2 apresentaram as maiores concentrações de Cd chegando a aproximadamente 15 $\mu\text{g/g ps}$ no organismo mais contaminado, sendo duas vezes maior ao final do experimento ($12,07 \pm 3,42 \mu\text{g/g ps}$), do que inicialmente ($5,03 \pm 1,17$

$\mu\text{g/g ps}$). O aumento nas concentrações de Cd no P2 também foi observado nas glândulas digestivas, com os maiores valores após 30 ($4,95 \pm 1,15 \mu\text{g/g ps}$) e 45 dias ($5,81 \pm 1,68 \mu\text{g/g ps}$) de experimento, sendo maiores do que os valores registrados no grupo referência no mesmo período $2,49 \pm 0,50 \mu\text{g/g ps}$ e $3,59 \pm 0,31 \mu\text{g/g ps}$, respectivamente. Os valores de Cd, encontrados no presente estudo em P1 (5,9 a 8,9 $\mu\text{g/g ps}$ nas brânquias e 2,5 a 4,3 $\mu\text{g/g ps}$ nas glândulas) e P2 (8,5 a 15 $\mu\text{g/g ps}$ nas brânquias e 2,6 a 7,5 $\mu\text{g/g ps}$ nas glândulas) foram superiores aos encontrados em ostras do mangue *C. gasar*, nestes mesmos pontos, $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g/g ps}$ no P1 e $0,9 \pm 0,3$ no P2 $\mu\text{g/g ps}$, em dezembro de 2013 (FERREIRA, 2015). Cabe ressaltar que no trabalho realizado em 2013, as análises foram realizadas em *pools* de organismos inteiros, sem separação dos tecidos das ostras. Ainda, as concentrações de Cd encontradas nas brânquias de ostras expostas no P2 do presente estudo, corroboram com as encontradas por Lopes (2002), em brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae* de $\sim 13 \mu\text{g/g ps}$, neste mesmo estuário.

Liu e Wang (2016), observaram o aumento das concentrações de cádmio em duas espécies de ostras (*Crassostrea hongkongensis* e *Crassostrea angulata*), cujos níveis bioacumulados de cádmio ($\sim 15 \mu\text{g/g ps}$) ao longo de 60 dias de exposição, foram similares aos encontrados no presente estudo, principalmente nas brânquias dos organismos expostos em P2 ($\sim 12 \mu\text{g/g ps}$). Ainda, em um estudo realizado com ostras *C. virginica* mantidas por um ano na *Jamaica Bay*, uma região considerada impactada por metais, Rodney e colaboradores (2017) identificaram níveis de $\sim 20 \mu\text{g/g ps}$ de Cd em brânquias, enquanto que em glândulas digestivas, os níveis foram similares aos encontrados nas ostras *C. gasar* mantidas em P2 ($\sim 5,8 \mu\text{g/g ps}$) do presente estudo.

Diante dos resultados apresentados, os mecanismos de bioacumulação de Cd aparentemente são diferentes nos dois tecidos analisados, visto que brânquias tenderam a bioacumular mais do que as glândulas. Os dois tecidos são conhecidos por bioacumular metais, no entanto, as brânquias estão mais sujeitas a bioacumular metais dissolvidos na água, enquanto as glândulas digestivas absorvem o metal particulado após a solubilização destes (DEB; FUKUSHIMA, 1999). De fato, a concentração de cádmio na forma dissolvida é bem maior em zonas costeiras do que nos oceanos, devido ao aporte terrestre, através de fontes atmosféricas e adjacentes à costa (CULLEN; MALDONADO, 2013).

O cobalto (Co) foi outro metal que diferiu ao longo do tempo nas brânquias e glândulas digestivas dos animais mantidos no P2, com os níveis mais altos sendo registrado nas brânquias após 15 dias ($2,69 \pm 0,35 \mu\text{g/g ps}$). No entanto, ao final do experimento os níveis de Co já estavam próximos ao valor inicial ($1,72 \pm 0,18 \mu\text{g/g ps}$) ou abaixo do valor inicial ($1,57 \pm 0,19 \mu\text{g/g ps}$), como nas glândulas digestivas dos organismos mantidos em P2 ($0,86 \pm 0,46 \mu\text{g/g ps}$). Curiosamente, as ostras de P1 apresentaram sempre os menores níveis de Co. O cobalto é um componente essencial da vitamina B12, importante para a formação do sangue (SINGH; HARBISON, 2015), sendo encontrada em grandes concentrações em ostras (ANACLETO et al., 2016). Apesar de Co ter um enriquecimento em solos próximos ao Complexo Termelétrico Jorge Lacerda (RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al., 2015), aparentemente ele não é um contaminante no Sistema Estuarino.

As concentrações de cromo (Cr) em brânquias foram menores ao final da exposição nos organismos mantidos em P2 ($3,62 \pm 0,29 \mu\text{g/g ps}$) quando comparados ao grupo referência ($4,74 \pm 0,57 \mu\text{g/g ps}$). Em geral, as concentrações de Cr quantificados em brânquias e glândulas de *C. gasar* deste estudo estão acima ($\sim 4,2 \mu\text{g/g ps}$) do observado por outros pesquisadores, tais como em *Crassostrea virginica* de $1,82 \mu\text{g/g ps}$ (AGUILAR et al., 2012), $2,5 \mu\text{g/g ps}$ em *Crassostrea gigas* (GAO et al., 2016). Le e colaboradores (2015) encontram valores de Cr ($4,47 \pm 1,62 \mu\text{g/g ps}$) em ostras *Saccostrea glomerata* e atribuíram tais concentrações ao aporte de contaminantes de origem industrial. De fato, a literatura mostra poucos casos de altos níveis de cromo bioacumulados em ostras, como os observados em um estuário na China altamente impactado por metais, onde os autores quantificaram níveis de Cr de $11 \mu\text{g/g ps}$ (WANG; LU, 2017). Ainda, Solaun e colaboradores (2013) fizeram uma compilação de dados de bioacumulação de Cr em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* e ostras *Crassostrea gigas* entre os anos de 1990 a 2010, antes e depois que ações mitigadoras foram aplicadas para diminuir a contaminação na baía Biscaia, País Basco. De acordo com os autores, as concentrações de cromo variaram de $\sim 5 \mu\text{g/g ps}$ na década de 90 para $< 0,5 \mu\text{g/g ps}$ em 2010, mostrando o efeito positivo das ações em um intervalo de tempo relativamente pequeno.

O cobre (Cu) e zinco (Zn) são considerados metais essenciais para moluscos bivalves, ostras tem a capacidade de bioacumular altos níveis destes metais. As concentrações de Cu em brânquias em P2, foram significativamente menores em 30 dias ($11,67 \pm 5,41 \mu\text{g/g ps}$) quando comparados a 7 dias ($20,54 \pm 5,22 \mu\text{g/g ps}$). Já os

níveis Zn nas brânquias, aumentaram em P1 no decorrer do estudo, estando maiores que os níveis do grupo referência após 15 ($357,8 \pm 60,5 \mu\text{g/g ps}$) e 30 ($448,30 \pm 47,40 \mu\text{g/g ps}$) dias de exposição. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o local de estudo não é impactado por estes metais. De acordo com Wang e Lu (2017), as concentrações de Cu e Zn em ostras de diferentes locais considerados “limpos” variam entre 50 a $100 \mu\text{gCu/g ps}$ e 500 a $2000 \mu\text{gZn/g ps}$.

As concentrações de ferro (Fe) nas brânquias tenderam a diminuir em P1 ($80,95 \pm 15,65 \mu\text{g/g ps}$) e P2 ($63,16 \pm 13,85 \mu\text{g/g ps}$), quando comparados à primeira semana de estudo que foram $104,78 \pm 7,11 \mu\text{g/g ps}$ e $123,14 \pm 13,94 \mu\text{g/g ps}$, respectivamente. Concentrações semelhantes foram identificadas em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* coletados em um local considerado sem contaminação na Itália (CAPOLUPO ET AL., 2017).

Em relação as concentrações de manganês (Mn), ostras *C. gasar* apresentaram maiores níveis em brânquias de animais expostos em P2 no início da exposição de $6,93 \pm 0,74 \mu\text{g/g ps}$, no entanto, ao final já estava próximo aos valores iniciais de $4,73 \pm 0,61 \mu\text{g/g ps}$. Já nas glândulas, as concentrações de Mn aumentaram nos organismos mantidos em P1 ao longo do tempo, variaram de $5,68 \pm 0,61 \mu\text{g/g ps}$ para $8,91 \pm 1,42 \mu\text{g/g ps}$ em 30 dias, estando maiores do que as concentrações nos organismos do grupo referência neste mesmo tempo, $5,40 \pm 0,88 \mu\text{g/g ps}$.

Lopes (2002), ao avaliar Cu, Mn, e Zn em ostras *C. rhizophorae*, encontraram concentrações de Cu que variaram de 50 a $100 \mu\text{g/g ps}$, de Mn variaram de ~50 a $100 \mu\text{g/g ps}$ e as concentrações de Zn variaram de 900 a $1500 \mu\text{g/g ps}$, muito acima das observadas no presente estudo, entretanto, o corpo inteiro da ostra foi utilizado para análises. Billah e colaboradores (2014), avaliaram as concentrações de Cu, Zn, Fe e Mn em ostras *Saccostrea cucullata*, no estuário Sarawak, na Malaysia, as concentrações reportadas por estes pesquisadores foram de $63,0 \pm 0,14 \mu\text{gCu/g ps}$, $108,7 \pm 0,20 \mu\text{gZn/g ps}$, $941,0 \pm 0,8 \mu\text{gFe/g ps}$ e $129,6 \pm 0,13 \mu\text{gMn/g ps}$, valores bem acima do que o obtido no presente estudo, exceto para o zinco. Ainda, as concentrações observadas pelos autores para estes metais no sedimento estavam muito além dos valores preconizados pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e pela *World Health Organization* (WHO).

As concentrações de fósforo (P) nas brânquias foram maiores em ostras mantidas por 15 dias em P1 ($4513,4 \pm 227,5 \mu\text{g/g ps}$) e P2 ($4573,9 \pm 487,4 \mu\text{g/g ps}$) quando comparadas ao grupo referência neste mesmo tempo de ($3587,9 \pm 202,1 \mu\text{g/g}$

ps). Ainda, a concentração de P nas brânquias dos organismos do grupo referência estava maior no final do período de estudo ($4544,3 \pm 427,1 \mu\text{g/g ps}$) quando comparado a 15 dias, $3587,9 \pm 202,1 \mu\text{g/g ps}$. Já nas glândulas, houve um aumento nas concentrações de P ao longo do tempo nos pontos de exposição. Em P1 as concentrações foram de $3842,14 \pm 426,22 \mu\text{g/g ps}$ e no P2 de $3979,2 \pm 348,2 \mu\text{g/g ps}$, quando comparados as concentrações iniciais de $3072,9 \pm 151,4 \mu\text{g/g ps}$. O fósforo é macroelemento essencial para os organismos, mas também é um indicativo de eutrofização do ambiente estuarino, favorecendo a presença de fitoplâncton (microalgas e cianobactérias), que por sua vez fazem parte da dieta de moluscos bivalves (YU; WANG, 2004). De fato, um “*bloom algal*”, também conhecido como maré vermelha, ocorreu no início do experimento, no período de 23 a 26 de outubro de 2017 em Florianópolis e no litoral norte catarinense. Neste evento de floração, foi detectada PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), uma biotoxina produzida por certos tipos de microalgas (BRAGA et al., 2018). No entanto, esta floração não foi detectada na região sul do estado. Na Caeira da Barra do Sul, localizada ao sul de Florianópolis, onde as ostras foram mantidas como grupo referência, as análises evidenciaram que os níveis da biotoxina encontravam-se abaixo do limite de detecção (FIOCRUZ, 2018). Os valores de fósforo encontrados neste trabalho estão bem abaixo dos valores encontrados em diferentes espécies de ostras *Crassostrea spp.*, que variaram de $4860 \mu\text{g/g ps}$, em locais não impactados a $29102 \mu\text{g/g ps}$, em locais impactados por metais na China (LU et al., 2017).

Inicialmente a concentração de antimônio (Sb) nas brânquias de ostras *C. gasar* estava abaixo dos níveis de detecção. No entanto, os organismos mantidos em P1 acumularam este metal ao longo do tempo, variando de $0,73 \pm 0,09 \mu\text{g/g ps}$ a $0,83 \pm 0,06 \mu\text{g/g ps}$. Após 30 dias de experimento o grupo referência também apresentou níveis de antimônio $0,75 \pm 0,12 \mu\text{g/g ps}$, sendo significativamente maior ao final do estudo $1,02 \pm 0,07 \mu\text{g/g ps}$. Nas glândulas, as concentrações deste metal aumentaram no início da exposição em P2 ($0,70 \pm 0,09 \mu\text{g/g ps}$) sendo maiores que as concentrações das ostras do grupo referência, $0,56 \pm 0,12 \mu\text{g/g ps}$, porém após 30 dias estavam abaixo do limite de detecção. O antimônio não tem nenhuma função essencial para os organismos vivos, porém alguns fármacos possuem o antimônio em sua composição (BOURGEOIS, 2015b), o que sugere seu uso como um indicador de efluentes sanitários na região de estudo. Entretanto, um estudo realizado em solos adjacentes à Bacia do Rio Tubarão mostrou que um dos locais com maior concentração de Sb situa-se

próximo à região de cultivo de arroz, cereal que por sua vez, vem sendo caracterizado, pelos autores, como uma das principais rotas de exposição a tal metal, especialmente em zonas de mineração de carvão (REN et al., 2014; RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al., 2015). Ademais, o fitoplâncton é capaz de remover Sb da água (MANDAL et al., 2011), fazendo parte da dieta de moluscos bivalves. Tal fato pode evidenciar que P1 é possivelmente impactado por Sb, visto que estava tanto presente nas brânquias dos organismos, como também tendeu a ser maior nas glândulas de ostras expostas. Já a presença deste metal nas brânquias de ostras do grupo referência pode estar relacionado à alguma floração de microalgas, contribuindo na remoção do metal da coluna d' água (MANDAL et al., 2011).

As concentrações de escândio (Sc) nas brânquias aumentaram no início do experimento nas ostras mantidas em P2 de para $0,69 \pm 0,13 \mu\text{g/g ps}$, porém diminuíram ao longo do tempo, e ao final do estudo estavam significativamente menores ($0,31 \pm 0,14 \mu\text{g/g ps}$) do que os valores iniciais de $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g/g ps}$. Os níveis em P1 foram sempre menores do que os organismos mantidos nos demais pontos, exceto em 30 dias quando os níveis estavam iguais aos de P2.

Em relação ao vanádio, no final do experimento, as concentrações deste metal quantificado em brânquias de ostras do grupo mantido em P2 estavam significativamente menores ($0,19 \pm 0,09 \mu\text{g/g ps}$) do que os valores iniciais ($0,36 \pm 0,07 \mu\text{g/g ps}$) e do que os organismos do grupo referência neste mesmo tempo de $0,37 \pm 0,06 \mu\text{g/g ps}$. O mesmo foi observado para as glândulas digestivas, onde as concentrações de vanádio diminuíram em *C. gasar* expostas, sendo significativamente menores do que as ostras do grupo referência, $0,89 \pm 0,04 \mu\text{g/g ps}$. Um dado curioso do presente estudo é que ao longo do período de exposição, foi observado um aumento na quantidade de ascídias incrustadas na estrutura onde as ostras eram mantidas e em suas valvas (Figura 9, a direita), embora a limpeza das mini balsas fosse realizada após as coletas. Curiosamente, estudos recentes mostraram que ascídias e alguns poliquetas estocam vanádio em seus tecidos, apesar de nenhum motivo benéfico aparente (REHDER, 2015; THOMPSON; HOGSTRAND; GLOVER, 2018). Além disso, é notável o aumento de ascídias em locais impactados por atividades antropogênicas, principalmente onde os contaminantes, como metais e HPAs ficam mais concentrados (EVANS et al., 2017), reforçando os dados apresentados no presente estudo.

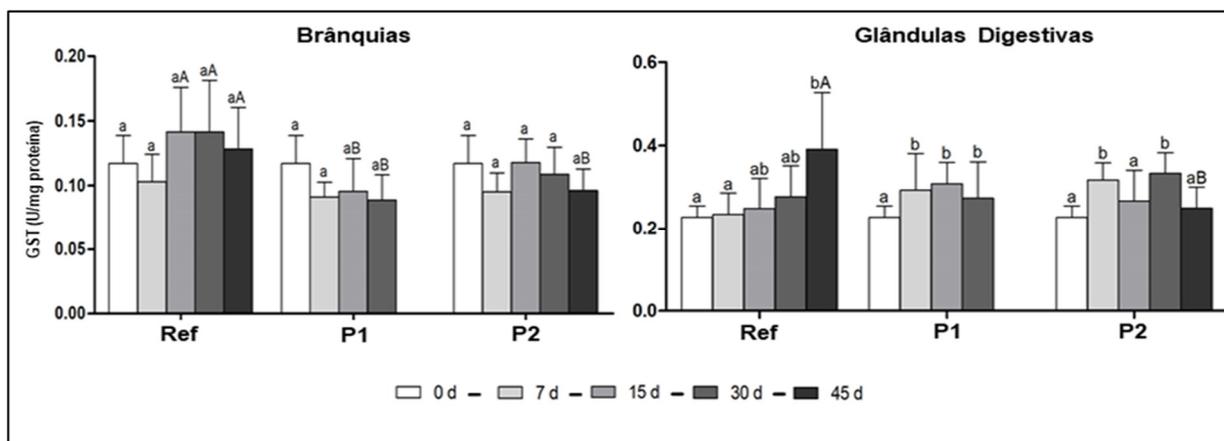
Aparentemente, os diferentes tecidos analisados possuem mecanismos diferentes de acumulação de metais. A glândula digestiva é o principal órgão de acumulação de metais em bivalves, entretanto as brânquias também se tornam alvos pois são a principal interface entre o organismo e o ambiente (PIPE et al., 1999; RAJALAKSHMI; MOHANDAS, 2005). De fato, Jing e colaboradores (2006) observaram que existe uma maior acumulação de cobre nas glândulas digestivas de ostras *Pinctada fucata* quando os níveis deste metal encontravam-se em menores concentração na água, enquanto, as brânquias se tornavam o principal alvo quando em maiores concentrações. De fato, tal resultado foi o observado no presente estudo, entretanto, para outro metal, o Cd, que apresentou as maiores concentrações em brânquias dos organismos expostos, possivelmente influenciando no mecanismo de defesa dos organismos em questão.

5.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM OSTRAS DO MANGUE *Crassostrea gasar*

5.3.1 Sistema de biotransformação de xenobióticos

Os gráficos da Figura 10 mostram as atividades da enzima de fase II de biotransformação de xenobióticos determinadas em brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue *Crassostrea gasar*. A atividade glutathione S-transferase (GST) foi significativamente menor em brânquias de ostras mantidas em P1 após 15 e 30 dias, e em P2 após 45 dias de exposição, quando comparadas ao grupo referência nestes mesmos tempos. Em glândulas digestivas, a atividade GST aumentou após 7 dias de exposição no P1 e se manteve até o final do experimento, enquanto no P2 ela teve uma oscilação, com um aumento após 7 dias, seguido por uma diminuição da atividade em 15 dias. No entanto, após 30 dias a atividade GST aumentou novamente e ao final do estudo estava próxima aos valores iniciais (Fig. 10), estando menor que grupo referência neste mesmo tempo. No grupo referência a atividade aumentou significativamente ao final do estudo. Ainda, a atividade GST foi maior nas glândulas digestivas do que em brânquias das ostras analisadas.

Figura 10 – Atividade da enzima de fase II de biotransformação, glutathiona S-transferase, em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. gasar*, no grupo referência e expostas em diferentes pontos por 7, 15, 30 e 45 dias. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

De acordo com Blasco e colaboradores (2016), a GST está principalmente localizada na fração citosólica da glândula digestiva, o que explica os maiores valores identificados neste tecido. Entretanto, tal resultado pode estar relacionado a natureza dos contaminantes cujo as ostras foram expostas. Diversos estudos utilizam *C. gasar* como um organismo modelo em estudos de biomonitoramento ambiental e de metabolismo de HPA (DOS REIS et al., 2015; LIMA et al., 2018; LÜCHMANN et al., 2011, 2014a, 2015; ZACCHI et al., 2017). Em um estudo com ostras *C. gasar* expostas a fração de óleo diesel acomodada em água, apesar de não ter sido estatisticamente comparado, a atividade desta enzima era superior em brânquias do que em glândulas digestivas, ainda, foram correlacionadas com o decréscimo da peroxidação de lipídeos, mostrando seu papel na proteção de biomoléculas (LÜCHMANN et al., 2011). De fato, em estudos realizados por Lüchmann e colaboradores (2014) houve um aumento em transcritos de GST em brânquias de *C. gasar* expostas a fenantreno, um HPA modelo em estudos toxicológicos, mostrando que as brânquias tem um papel fundamental na detoxificação deste contaminante.

Em estudos prévios realizados no Sistema Estuarino de Laguna no verão de 2013, a bioacumulação de diferentes contaminantes foi avaliada em *C. gasar*, havendo um aumento da atividade desta enzima em brânquias e glândulas digestivas, tal aumento relacionado a detoxificação de compostos orgânicos (FERREIRA, 2015). Já Souza

(2015), observou o aumento da atividade desta enzima na glândula digestiva de *C. gasar*, após 36 horas de exposição quando comparadas ao tempo 0 e ao final de 7 dias de exposição, possivelmente relacionada aos altos níveis de HPAs encontrados nos organismos expostos. Recentes estudos com esta espécie, focam apenas nas brânquias de *C. gasar* (LIMA et al., 2018; PESSATTI et al., 2016; ZACCHI et al., 2017). Neste mesmo estuário, Lopes (2002), observou o decréscimo da atividade desta enzima em brânquias de *Crassostrea rhizophorae*, atribuindo tal resposta as concentrações de Cd, Cu, Mn e Zn nas partes moles destes organismos.

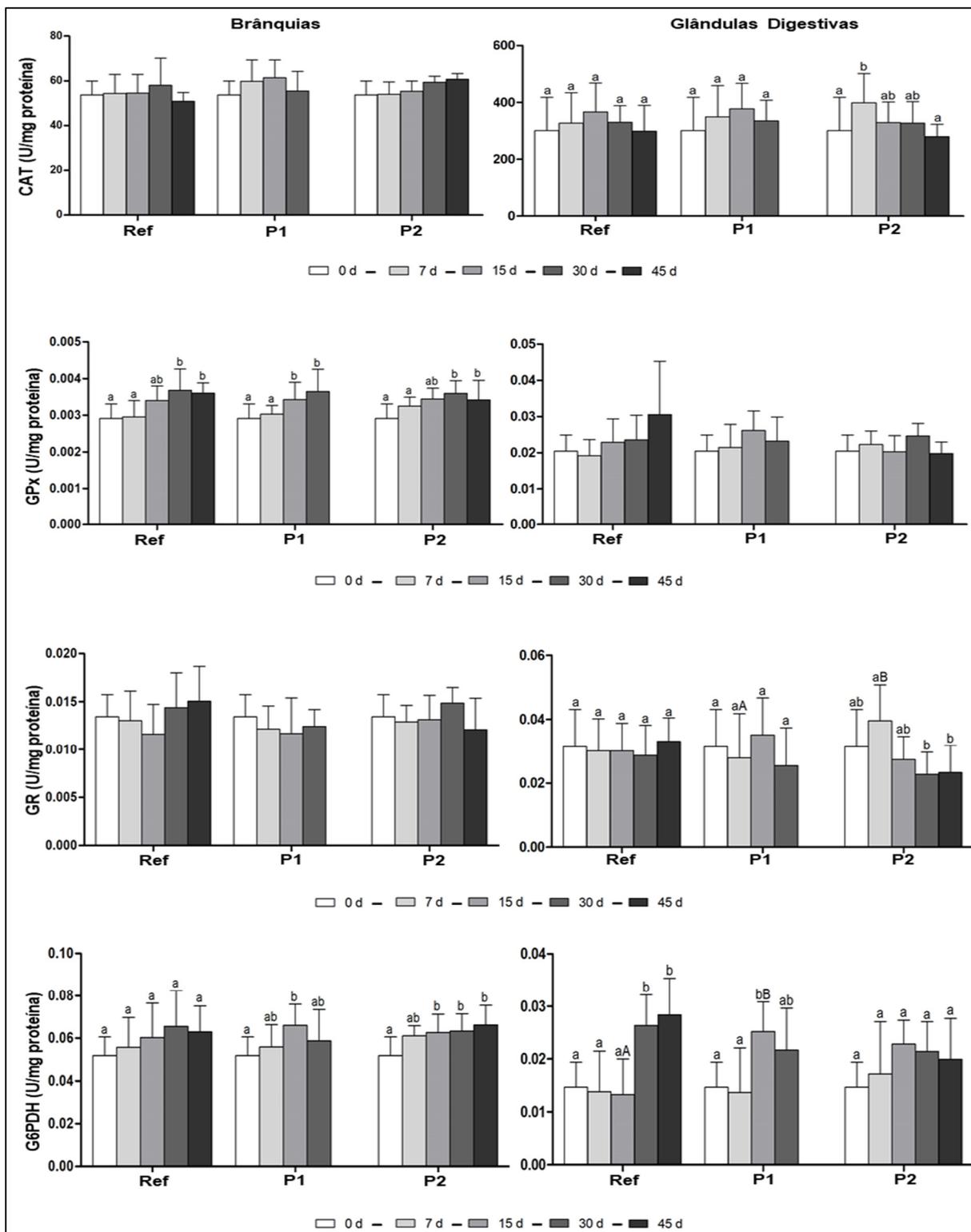
Embora não seja substrato natural para GST, alguns estudos observaram o efeito de metais em invertebrados (BLASCO et al., 2016). Alguns metais, participam de reações de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) promovendo um aumento na peroxidação lipídica, no entanto alguns produtos da peroxidação podem ser conjugados com a glutatona, através da GST (ZANETTE et al., 2011). De fato, Verlecar e colaboradores (2007) observaram que a exposição a mercúrio (Hg) aumentou a atividade GST em glândulas de mexilhões *Perna viridis*. Já Martín-Díaz e colaboradores (2007) observaram significativa indução desta enzima na presença de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn e Pb em caranguejos *Carcinus maenas*, e de Cd, Cu, Mn e Ni no bivalve *Ruditapes philippinarum*, ao avaliar a toxicidade de sedimentos em quatro regiões portuárias na Espanha. Por outro lado, o decréscimo da atividade da GST no gastrópode marinho *Nerita chamaeleon*, foi relacionado a níveis de HPA, na Índia (BHAGAT et al., 2017).

Além disto, o decréscimo na atividade GST observada em *C. gasar* mantidas no Sistema Estuarino de Laguna por um período tão longo de exposição, pode estar relacionado a outros parâmetros endógenos, como a depleção nos níveis de GSH. A GST atua conjugando a GSH a compostos endógenos ou xenobióticos, tornando-os mais facilmente excretados da célula (NEBERT; VASILIOU, 2004). Desta forma, se a biossíntese da glutatona e reciclagem desta molécula endógena ora mencionadas, não forem capazes de suprir o consumo de GSH, pode provocar um decréscimo significativo desta, inibindo suas funções (WANG et al., 2008).

5.3.2 Sistema de defesa antioxidante

Os gráficos da Figura 11 mostram as atividades das enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante.

Figura 11 – Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. gasar*, no grupo referência e expostas em diferentes pontos por 7, 15, 30 e 45 dias. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os resultados mostram, que a atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR), analisadas nas brânquias de *C. gasar*, não diferiram entre os locais de estudo nem ao longo dos tempos de exposição. Já nas glândulas, a atividade da enzima GPx não diferiu estatisticamente nos pontos e tempos de estudo.

No presente estudo houve um aumento na atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) nas brânquias dos animais amostrados após 15 dias de estudo. O aumento da atividade GPx em P1 e P2 é um indicativo de formação de hidroperóxido e outros peróxidos orgânicos, possivelmente influenciado pelo acúmulo de cádmio nestes organismos. O aumento de atividade GPx foi similarmente reportado por diversos autores que avaliaram o efeito do cádmio em organismos aquáticos, tais como as ostras *C. angulata* (MACÍAS-MAYORGA et al., 2015) e *C. gigas* (CONG et al., 2013), os mexilhões *Perna viridis* (GOSWAMI et al., 2014) e *Mytilus galloprovincialis* (ROCHA et al., 2015). Ainda, Meng e colaboradores (2017) observaram um aumento significativo nos níveis de proteínas e transcritos de GPx em ostras *C. gigas*, expostas a cádmio.

Além disso, a bioacumulação de cádmio é capaz de diminuir os níveis intracelulares de GSH (MACÍAS-MAYORGA et al., 2015; MENG et al., 2017). Molécula considerada uma das primeiras linhas de defesa contra o estresse oxidativo, podendo ser oxidada a sua forma dissulfídica (GSSG), pela GPx ou sendo conjugada a diferentes compostos pela GST (MELLO et al., 2015). Desta forma, ela pode atuar no mecanismo de detoxificação do cádmio, sendo este rapidamente reduzido e formando um complexo estável (GS-Cd), mais facilmente eliminado pela célula (WANG et al., 2008).

Considerando que a GR tem papel essencial na reciclagem da GSH, a atividade desta enzima não ter sido significativamente diferente, sugerem uma possível depleção nos níveis de GSH, no presente estudo. O grande período de exposição, junto presença de contaminantes, possivelmente aumentou a formação de EROs e danos oxidativos, os organismos tendo que contornar tal situação aumentaram a atividade da GPx, porém sem variações na atividade da GR, não supriram as demandas de GSH. Este fato vai de encontro com a bioacumulação de cádmio nos organismos expostos, o decréscimo na atividade da GST observada nas brânquias das ostras expostas, associado ao aumento na atividade da GPx, sem alteração da atividade da GR. Entretanto, para confirmar tal hipótese, os níveis de GSH e GSSG deveriam ter sido medidos nos tecidos.

A atividade da G6PDH nas brânquias de *C. gasar* aumentou após 15 dias nos pontos de exposição (P1 e P2) sendo significativamente maior do que no grupo referência neste mesmo tempo, este por sua vez aumentou a atividade após 30 dias de estudo em relação ao tempo inicial. Visto que, a enzima mantém os níveis de NADPH nas células, cofator utilizado na redução de GSSG à GSH, mediada pela GR (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), esperava-se o aumento significativo da atividade da GR, o que não foi observado. Entretanto, Wang e colaboradores (2008) observaram um aumento da atividade G6PDH sem nenhuma alteração na atividade GR, bem como nos níveis de GSH, no caranguejo *Sinopotamon yangtsekiense* exposto ao cádmio, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Ademais, a variação na atividade da G6PDH, tanto em brânquias como em glândulas de *C. gasar* pode estar relacionada a outros sistemas celulares, tais como óxido nítrico sintase, NADPH oxidase, citocromo P450, além de reações anabolizantes (BARCIA-VIEITEZ; RAMOS-MARTÍNEZ, 2014; STANTON, 2012).

Houve um aumento da atividade da enzima CAT nas glândulas digestivas das ostras mantidas no P2, após 7 dias de exposição, porém a atividade retornou aos níveis iniciais após 15 dias e assim permaneceu. A atividade da GR também foi mais alta nos organismos em P2 após 7 dias, sendo maiores que a atividade P1 neste mesmo tempo, no entanto a atividade diminui no decorrer do estudo. Mudanças em parâmetros físico-químicos, junto com a presença de contaminantes na água, pode estressar e até mesmo matar os organismos aquáticos (LUSHCHAK, 2011; VALAVANIDIS et al., 2006). O aumento da atividade destes biomarcadores neste período pode estar relacionado a adaptação dos organismos a salinidade 24, bem como a bioacumulação de contaminantes como cádmio. Tais condições podem ter aumentado a produção de EROs na primeira semana de estudo, fazendo com que os organismos ativassem as defesas antioxidantes e contornassem um possível efeito do estresse neste tecido analisado. Neste contexto, Zacchi e colaboradores (2017), avaliaram os níveis de transcrição de genes relacionados a defesa antioxidante em ostras *C. gasar* expostas à fenantreno em diferentes salinidades. Estes pesquisadores indicaram que baixas salinidades estimulam a produção de EROs aumentando os níveis de transcrição de genes das enzimas antioxidantes.

Em estudos prévios realizados no Sistema Estuarino de Laguna em dezembro de 2013, mostraram aumento significativo da atividade GPx e uma inibição da enzima CAT em brânquias de *C. gasar*, após 7 dias de exposição. Em contrapartida houve

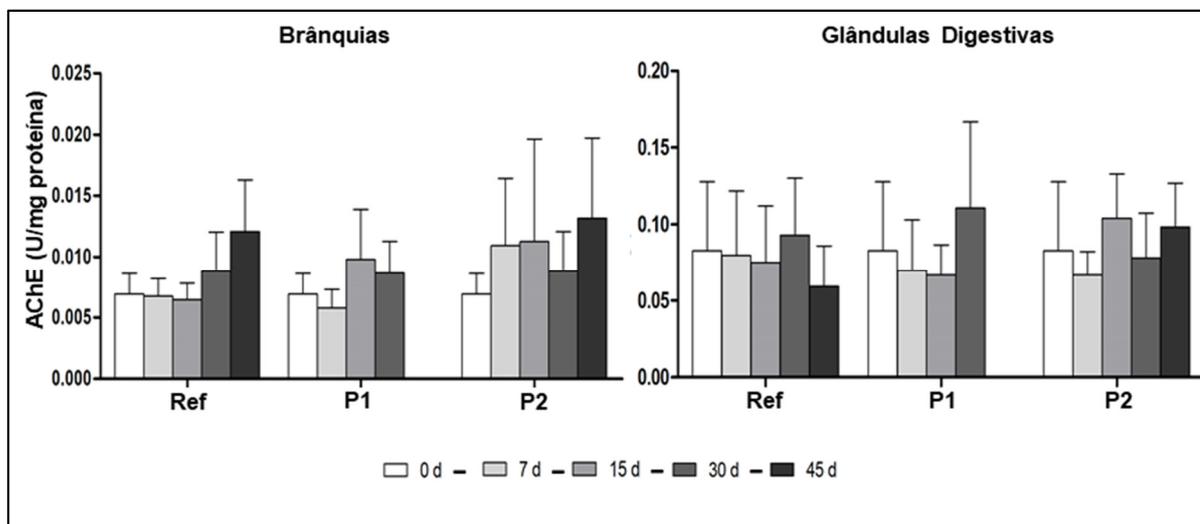
um aumento dos representantes do sistema de defesa antioxidante na glândula digestiva das ostras amostradas (FERREIRA, 2015). Os resultados sugeriram que as enzimas do sistema de defesa antioxidante atuaram em conjunto para eliminar as possíveis EROs formadas após a exposição, prevenindo assim, danos a biomoléculas. Entretanto houve maiores níveis de precipitação no período de estudo, influenciando na salinidade do ambiente, chegando a ser menor que 15 (PIAZZA, 2016), o que pode ter sido um fator estressante para os organismos expostos (ZACCHI et al., 2017).

Os resultados sugerem indução do sistema de defesa antioxidante, em uma possível tentativa de conter a formação de EROs, e principalmente possíveis danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A hipótese de que o cádmio seja um dos principais fatores influenciando nas respostas dos organismos expostos surgiu devido ao fato da elevada bioacumulação deste contaminante nas ostras expostas, o que não foi observado em experimentos prévios no sistema estuarino com ostras *C. gasar* (FERREIRA, 2015; SOUZA, 2015), refletindo em respostas de biomarcadores completamente diferentes.

5.3.3 Processos neurotóxicos

A atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) determinada nas brânquias e glândulas digestivas de ostras do mangue, *Crassostrea gasar*, estão representadas nos gráficos da Figura 12. A enzima não apresentou diferenças significativas entre os pontos e tempos de estudo.

Figura 12 – Atividade da enzima acetilcolinesterase em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. gasar*, no grupo referência e expostas em diferentes pontos por 7, 15, 30 e 45 dias. Valores marcados com ^{abc} significam diferença entre tempos em um mesmo ponto; valores marcados com ^{ABC} indicam diferença entre pontos em um mesmo tempo, $p < 0.05$



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os resultados obtidos neste estudo pelo ensaio da acetilcolinesterase (AChE) não eram esperados, visto que a área de estudo é impactada pela cultura de arroz realizada na região. Esperava-se uma inibição da enzima, o que normalmente é observada em organismos expostos a pesticidas organofosforados e carbamatos. Diversos estudos observaram a inibição de colinesterases em diferentes organismos aquáticos, tais como os bivalves *Dreissena polymorpha* (BINELLI et al., 2006; RICCIARDI; BINELLI; PROVINI, 2006), *Perna perna* (ALVES et al., 2002), *M. galloprovincialis* (LIONETTO et al., 2003), *Ruditapes phillipinarum* (CHOI et al., 2011), *Adamussium colbecki* (BONACCI et al., 2006) e *C. rhizophorae* (ALVES et al., 2002; LEE et al., 2002; VALDEZ DOMINGOS et al., 2007). Dentre os trabalhos citados, Choi e colaboradores (2011) observaram a inibição da hidrólise de acetilcolina no músculo adutor de *R. phillipinarum*, mediada por organofosforados, diminuindo assim a atividade da enzima em comparação ao grupo controle. Matozzo e colaboradores (2012) observaram um decréscimo na atividade da acetilcolinesterase em brânquias de *R. phillipinarum* expostos a efluentes de agricultura contendo resíduos de organofosforados. Bernal-Hernández e colaboradore (2010) relataram a diminuição da atividade da AChE nas brânquias da ostra *C. corteziensis* expostas em um estuário no México possivelmente contaminado por pesticidas organofosforados,

quando comparadas ao grupo referência. Já De Souza e colaboradores (2018) avaliaram o efeito de diferentes pesticidas em *C. rhizophorae* e concluíram que as brânquias seriam um ótimo tecido indicador para contaminação pelo pesticida carbamato Carbaril, enquanto as acetilcolinesterase seriam potencial biomarcadores de Carbofuran.

É importante salientar que em estudos anteriores realizados no Sistema Estuarino de Laguna (FERREIRA, 2015; SOUZA, 2015), foi detectada a presença de DDT e seus metabólitos, assim como Endosulfan II, em ostras *C. gasar* mantidas na região por sete dias. Porém, organoclorados possuem mecanismos distintos de ação do que os organofosforados e carbamatos. Por exemplo, o DDT (diclorodifeniltricloroetano) afeta nervos periféricos diminuindo o influxo de sódio (Na^+) e inibindo o efluxo do potássio (K^+), resultando em um excesso de (K^+) intracelular nos neurônios, parcialmente despolarizando as células. No entanto, eles não são inibidores de acetilcolinesterase, demonstrando que, talvez, a contaminação no Sistema Estuarino de Laguna, ainda esteja relacionada a pesticidas já banidos no Brasil, como o DDT e Endosulfan (FERREIRA, 2015; SOUZA, 2015). Diante do exposto, a atividade da AChE não foi uma ferramenta biomarcadora ideal para avaliar a contaminação do Sistema Estuarino. Entretanto, a época de cultivo de arroz começa a partir de outubro, o efluente das lavouras de arroz são liberadas para o estuário por volta de março (SOSBAI, 2016), podendo então, esta época do ano ser a melhor escolha para avaliar tal biomarcador.

6 CONCLUSÃO

As ostras do mangue *Crassostrea gasar*, expostas *in situ* por 45 dias no Sistema Estuarino de Laguna, bioacumularam metais em brânquias e glândulas digestivas ao longo do período de estudo, os maiores níveis sendo observados nas brânquias dos organismos mantidos no P2.

Dos 17 metais analisados (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Sc, Se, Sn, V e Zn), o cádmio foi o mais preocupante, pois encontrava-se em concentrações próximas as de locais considerados contaminados por metais.

A inibição da enzima de fase II de biotransformação (GST), junto com o aumento da atividade da GPx e, a não alteração significativa da atividade da GR, nas brânquias dos organismos expostos durante 45 dias, sugerem a formação de EROs devido a bioacumulação de metais, consequentemente uma depleção de GSH, substrato utilizado pelas duas enzimas (GPx e GST) e regenerado pela GR.

Os resultados de bioacumulação de metais, em conjunto com as respostas de biomarcadores bioquímicos encontrados nas ostras *C. gasar* durante este estudo, confirmam o potencial uso destes organismos como bioindicadores de contaminação aquática.

Através dos resultados aqui obtidos, recomenda-se a implantação de um programa de biomonitoramento no Sistema Estuarino de Laguna, visto que este é fonte de renda e consumo próprio dos usuários, que estão, por sua vez colocando sua saúde e de outros em risco, ao consumir os recursos de tal ambiente, bastante afetado por metais.

7 PERPECTIVAS FUTURAS

As etapas apresentadas nesta dissertação deram apenas os seus primeiros passos. Existem muitas outras etapas a serem desenvolvidas, sobretudo na perspectiva de torná-lo um estudo mais robusto. Destaca-se abaixo tais etapas:

- a) Testes referentes ao inibidor de proteases (PMSF) e sua possível inibição da enzima acetilcolinesterase;
- b) Análise de danos oxidativos nos organismos expostos, por meio da análise de peroxidação de lipídeos, através da técnica de MDA;
- c) Avaliação de possíveis alterações histopatológicas;
- d) Avaliar a transcrição de alguns genes chaves, relacionados à contaminação por metais (metalotioneínas); à biotransformação de xenobióticos (como CYPs, sulfotransferases, GSTs), e defesas antioxidante (*e.g.* SOD, CAT).

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121-126, 1 jan. 1984.

AGUILAR, C. A. et al. American oyster (*Crassostrea virginica*) and sediments as a coastal zone pollution monitor by heavy metals. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 579–586, 1 out. 2012.

ALVES, S. R. C. et al. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*. **Anais...**2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408569>>. Acesso em: 2 jul. 2018

ANACLETO, P. et al. Shellfish: Characteristics of Crustaceans and Mollusks. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 764-771, 1 jan. 2016.

AZEVEDO, J. S. et al. Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying influences of anthropogenic activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 220-230, 1 out. 2013.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. [S.i.] Bookman, 2014.

BARCIA-VIEITEZ, R.; RAMOS-MARTÍNEZ, J. I. The regulation of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway: New answers to old problems. **IUBMB Life**, v. 66, n. 11, p. 775–779, 2014.

BARROS, D.; BARBIERI, E. Analysis of occurrence of metals: Ni, Zn, Cu, Pb and Cd in oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and sediment collected in the Cananeia Estuary-SP (Brazil). **Mundo da Saude**, v. 36, n. 4, p. 635-642, 2012.

BATOOL, S. et al. Geographical distribution of persistent organic pollutants in the environment: a review. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, n. 5, p. 1125-1134, 2016.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285-298, 2001.

BERENGER, J. N. **Utilização de biomarcadores bioquímicos em genidens genidens para avaliação do grau de contaminação por derivados de petróleo no Estuário do Rio Macaé.** [s.l.: s.n.].

BERNAL-HERNÁNDEZ, Y. Y. et al. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 819-825, 2010.

BILLAH, M. M. et al. Cu, Zn, Fe, and Mn in mangrove ecosystems (sediment, water, oyster, and macroalgae) of Sarawak, Malaysia. **Zoology and Ecology**, v. 24, n. 4, p. 380-388, 2014.

BINELLI, A. et al. New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 510-519, 1 jan. 2006.

BLANCHETTE, B.; FENG, X.; SINGH, B. R. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 513-542, 2007.

BLASCO, J. et al. **Marine Ecotoxicology: current knowledge and future issues.** Academic Press: 2016.

BONACCI, S.; CORSI, I.; FOCARDI, S. Cholinesterases in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: characterization and sensitivity to pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1481-1488, 2009.

BOURGEOIS, M. M. Copper. In: **Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology.** Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015a. p. 109-114.

BOURGEOIS, M. M. Antimony. In: **Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology.** Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015b. p. 39-44.

BOWMAN, A. B. et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 25, n. 4, p. 191-203, dez. 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. C. et al. Combined effects of warming and acidification on accumulation and elimination dynamics of paralytic shellfish toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Research**, v. 164, p. 647-654, 1 jul. 2018.

BREITWIESER, M. et al. What is the relationship between the bioaccumulation of chemical contaminants in the variegated scallop *Mima chlamys varia* and its health status? A study carried out on the French Atlantic coast using the Path ComDim model. **Science of The Total Environment**, v. 640-641, p. 662–670, 1 nov. 2018.

CAPOLUPO, M. et al. A comprehensive evaluation of the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy): integrating chemical and physiological analyses in mussels as a biomonitoring strategy. **Science of The Total Environment**, v. 598, p. 146-159, 15 nov. 2017.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, n. C, p. 484-490, 1985.

CARLETON RAY, G.; MCCORMICK-RAY, J. Estuarine ecosystems. **Encyclopedia of biodiversity**: second edition, v. 2, p. 297-308, 2013.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and energy security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CHAINY, G. B. N.; PAITAL, B.; DANDAPAT, J. An Overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-8, 4 abr. 2016.

CHANDURVELAN, R. et al. Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: Relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 663-675, 2015.

CHOI, J. Y. et al. Acetylthiocholine (ATC) – Cleaving cholinesterase (ChE) activity as a potential biomarker of pesticide exposure in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, of Korea. **Marine Environmental Research**, v. 71, n. 3, p. 162-168, 1 abr. 2011.

COLLINS, L.; ALVAREZ, D.; CHAUHAN, A. **Phycoremediation coupled with generation of value-added products**. [s.l.]. Elsevier Inc., 2014.

COLOTTI, G. et al. Metals and metal derivatives in medicine. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 211-21, fev. 2013.

CONG, M. et al. Effect of cadmium on the defense response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to *Listonella anguillarum* challenge. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 31, n. 5, p. 1002-1009, 7 set. 2013.

CROSSLAND, C. J. et al. The Coastal Zone - a domain of global Interactions. In: **Costal fluxes in the anthropocene: the land-ocean interactions in the coastal zone** project of the International Geosphere-Biosphere Programme. New York, NY: Springer, 2005. p. 1-37.

CULLEN, J. T.; MALDONADO, M. T. Biogeochemistry of Cadmium and Its Release to the environment. In: **Metal ions in life sciences**. [s.l: s.n.]. v. 11p. 31-62.

DALZOCHIO, T. et al. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283-298, 2016.

DAMIANI, R. S. et al. **Bacia Hidrografica do Rio Tubarão e Complexo Lagunar: pela sustentabilidade hídrica**. Tubarão: Copiart, 2008.

DAURA-JORGE, F. G. et al. The structure of a bottlenose dolphin society is coupled to a unique foraging cooperation with artisanal fishermen. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 702-705, 2012.

DE SOUZA, P. R. et al. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: a highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 109-121, 1 abr. 2018.

DEB, S. C.; FUKUSHIMA, T. Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-ecotoxicological perspectives. **International Journal of Environmental Studies**, v. 56, n. 3, p. 385-417, 1999.

DÖRING, B.; PETZINGER, E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, n. 3, p. 261-282, 2014.

DRAGOVIĆ, S. et al. Trace element distribution in surface soils from a coal burning power production area: a case study from the largest power plant site in Serbia. **Catena**, v. 104, p. 288-296, 2013.

DUFFUS, J. H.; IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). Heavy metals - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

EDGE, K. J. et al. A biomarker of contaminant exposure is effective in large scale assessment of ten estuaries. **Chemosphere**, v. 100, p. 16-26, 2014.

EICHLER, P. et al. Foraminifera and thecamoebians as indicator of hydrodynamic process in a choked coastal lagoon, Laguna estuarine system, SC, Brazil. **Journal of Coastal Research**, SI 39 (proceedings of the 8th International Coastal Symposium), 1144-1148. Itajaí, SC, Brazil, 2006.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1 jul. 1961.

EVANS, J. S. et al. Introduced ascidians harbor highly diverse and host-specific symbiotic microbial assemblages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11033, 8 dez. 2017.

FARAJNEJAD, H.; KARBASSI, A.; HEIDARI, M. Fate of toxic metals during estuarine mixing of fresh water with saline water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27430-27435, 2017.

FERNANDES, F. A. et al. Redox and metabolic strategies developed by anterior and posterior gills of the crab *Neohelice granulata* after short periods of hypo- or hyper-osmotic stress. **Science of The Total Environment**, v. 639, p. 457-464, 15 out. 2018.

FERREIRA, C. P. **VARIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE RESPOSTAS**. 2015. 70p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Pesca)-Universidade do Estado de Santa Catarina, Laguna, 2015.

FIOCRUZ. Nota técnica - 003/2017 Assunto: Proibição parcial da retirada, comercialização e consumo de moluscos bivalves (ostras, vieiras, mexilhões e berbigões) devido à detecção de toxina paralisante - PSP. p. 25, 2018.

FUZINATTO, C. F. et al. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the south River Cubatão, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103-109, 1 dez. 2013.

GAO, M. et al. Metal concentrations in sediment and biota of the Huludao Coast in Liaodong Bay and associated human and ecological health risks. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 1, p. 87-96, 2016.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **The Biochemical journal**, v. 55, n. 3, p. 400-8, out. 1953.

GOSWAMI, P. et al. An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*). **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 49, n. 13, p. 1564-1577, 2014.

HAIMOVICI, M.; HAIMOVICI, M., ANDRIGUETTO FILHO, J. M., SUNYE, P. S. **A pesca marinha e estuarina no Brasil estudos de caso multidisciplinares**. Rio Grande: 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in biology and medicine**, New York, Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HERSHEY, A. E. et al. Aquatic Insect Ecology. In: THORP, J.; COVICH, A. (Eds.). **Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates**. Third Edit ed. [s.l.] Academic Press, 2010. p. 659-694.

HOODA, P. S. **Trace elements in soils**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

HOOK, S. E. et al. The impacts of modern-use pesticides on shrimp aquaculture: an assessment for north eastern Australia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November 2017, p. 770-780, 2018.

JAKIMSKA, A. et al. Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part I: the role and impact of heavy metals on organism. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1127-1146, 2011.

JEBALI, J. et al. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 93-98, 2006.

JING, G. et al. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2006.

JOHNSON, G. T. Zinc. In: **Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 277-282.

KAUSHIK, D.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. December, p. 1-13, 2014.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of biological chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-8, 25 out. 1976.

KURANCHIE-MENSAH, H. et al. Bioconcentration of Ag, Cd, Co, Mn and Zn in the Mangrove Oyster (*Crassostrea gasar*) and Preliminary Human Health Risk Assessment: a Radiotracer Study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 3, p. 413-417, 2016.

LEE, H.-S. et al. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. **Chemosphere**, v. 46, n. 4, p. 571-576, 1 jan. 2002.

LEÓN-MEJÍA, G. et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced by coal and coal fly ash particles samples in V79 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 23, p. 24019-24031, 2016.

LIBES, S. M. **Introduction to marine biogeochemistry**. [s.l.] Elsevier/Academic Press, 2009.

LIMA, D.; ROQUE, G. M.; ALMEIDA, E. A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45-51, 2013.

LIMA, D. et al. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p. 307–318, out. 2018.

LINHART, K.; BARTSCH, H.; SEITZ, H. K. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. **Redox biology**, v. 3, p. 56-62, 2014.

LIONETTO, M. G. et al. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 324-330, 2003.

LIONETTO, M. G. et al. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed research international**, v. 2013, p. 321213, 2013.

LIU, F.; WANG, W. X. Facilitated bioaccumulation of cadmium and copper in the oyster *Crassostrea hongkongensis* solely exposed to zinc. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 1670-1677, 14 jan. 2013.

LIU, M. et al. The environment quality of heavy metals in sediments from the central Bohai Sea. **MPB**, v. 100, p. 534-543, 2015.

LIU, X.; WANG, W. X. Time changes in biomarker responses in two species of oyster transplanted into a metal contaminated estuary. **Science of the Total Environment**, v. 544, p. 281-290, 2016.

LOPES, F. R. A. S. **Análise temporal da resposta de biomarcadores bioquímicos e do nível de metais traços na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, (GUILDING, 1828) cultivadas no Complexo Estuarino de Laguna, SC.** 2002.59p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Aquicultura)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

LU, G. Y. et al. Oyster-based national mapping of trace metals pollution in the Chinese coastal waters. **Environmental Pollution**, v. 224, p. 658-669, maio 2017.

LÜCHMANN, K. H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais.** 2012. 166p. Tese de Doutorado (Doutora em Bioquímica)-Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334, 2014.

_____. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana*. **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 10-20, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MACEDA, E. B. et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 117-129, 1 jan. 2015.

MACHADO, M. A. **Mapa geomorfológico preliminar do Complexo Lagunar Sul Catarinense e análise paleoambiental da Lagoa do Imaruí apoiada em furos de sondagem**. p. 55, 2008.

MACÍAS-MAYORGA, D. et al. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*? **Aquatic Toxicology**, v. 161, p. 231-241, 1 abr. 2015.

MANDAL, S. K. et al. Distribution of antimony in a tropical estuary dominated by mangroves. **Journal of Environmental Protection**, v. 02, n. 06, p. 840-847, 2011.

MARTÍN-DÍAZ, M. L. et al. Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 66-76, 2007.

MASON, L. H. et al. Pb neurotoxicity: neuropsychological effects of lead toxicity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MATOZZO, V. et al. Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the Lagoon of Venice. **Ecological Indicators**, v. 19, p. 191-205, 2012.

MELO, C. M. R. et al. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biological Invasions**, v. 12, n. 3, p. 441-449, 2010.

MENG, J. et al. Cadmium effects on DNA and protein metabolism in oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by proteomic analyses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11716, 15 dez. 2017.

MOREIRA, A. et al. Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, p. 183-193, 1 jan. 2017.

MOREIRA, S. M. et al. An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 2, p. 318-329, 2006.

MORRIS, S.; COYLE, J. P. Iron. In: **Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 127-130.

MÜLLER, G. DO A. E. S. et al. Analysis of transcriptional responses of normalizing genes on *Crassostrea brasiliana* under different experimental conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2190-2198, 2017.

_____. Proteomic response of gill microsomes of *Crassostrea brasiliana* exposed to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 201, n. June, p. 109-118, 2018.

ORBEA, A.; FAHIMI, H. D.; CAJARAVILLE, M. P. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. **Histochemistry and cell biology**, v. 114, n. 5, p. 393-404, nov. 2000.

Organophosphate pesticides and child health: a primer for health care providers - acute poisoning. Disponível em: <<http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

PÉREZ, E.; BLASCO, J.; SOLÉ, M. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 275-279, 2004.

PESSATTI, T. B. et al. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172-180, 2016.

PIAZZA, T. B. **Bioconcentração de metais traço em ostras do mangue *Crassostrea gasar* (ADANSON , 1757) expostas durante o inverno e verão no Complexo Lagunar Sul Catarinense , Sul do Brasil.** 2016. 65p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Pesca)-Universidade do Estado de Santa Catarina, Laguna, 2016.

PIPE, R. . et al. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 43-54, 1 jun. 1999.

PRAKASH, N. T.; RAO, K. S. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 146, n. 2, p. 107-113, 1995.

PRITCHARD, D. W. **What is an estuary**: physical viewpoint. 1967.

PYLE, G.; COUTURE, P. Nickel. **Fish Physiology**, v. 31, p. 253-289, 1 jan. 2011.

RAJALAKSHMI, S.; MOHANDAS, A. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 1, p. 140-143, set. 2005.

REGOLI, F. et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4 SUPPL., p. 56-66, 2011.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106-117, 2014.

REHDER, D. **The role of vanadium in biology metallomics**, 2015. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/C4MT00304G>>. Acesso em: 1 jul. 2018

REID, T. J. et al. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 8, p. 4767-71, ago. 1981.

REN, J. H. et al. Antimony uptake, translocation and speciation in rice plants exposed to antimonite and antimonate. **Science of the Total Environment**, v. 475, p. 83-89, 2014.

RICCIARDI, F.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 406-412, mar. 2006.

RICHETTI, S. K. et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 116-122, 2010.

RIGHETTI, B. P. H. **Respostas bioquímicas e moleculares e sua relação com contaminantes orgânicos em botos-da-tainha (*Tursiops truncatus*) residentes no sul do Brasil**. 2017. 104p. Trabalho de Pós-Graduação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

ROCHA, T. L. et al. Tissue specific responses to cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 10-18, 1 dez. 2015.

RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA, A. et al. Fate of hazardous elements in agricultural soils surrounding a coal power plant complex from Santa Catarina (Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 374-382, 2015.

_____. The mobilization of hazardous elements after a tropical storm event in a polluted estuary. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 721-729, 2016.

ROHR, P. et al. Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 758, n. 1-2, p. 23-28, 2013.

SAAD, L. D. O.; CUNHA, C. M.; COLPO, K. D. How mollusk assemblages respond to different urbanization levels : characterization of the malacofauna in subtropical Brazilian mangroves. **Marine Biodiversity**, 2018.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed. Livraria Editora, Santos, São Paulo: Livraria Editora, 2002.

SHENAI-TIRODKAR, P. et al. Seasonal variations and relationships between environmental parameters and heavy metal concentrations in tissues of *Crassostrea* species and in its ambience from the tropical estuaries. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2018.

SHENAI-TIRODKAR, P. S. et al. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, n. March, p. 87-94, 2017.

SIMÕES-LOPES, P. C.; FABIÁN, M. E.; MENEGHETTI, J. O. Dolphin interactions with the mullet artisanal fishing on southern Brazil: a qualitative and quantitative approach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 709-726, 1998.

SINGH, D.; HARBISON, R. D. Cobalt. In: **Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 101-108.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO; (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Pelotas, RS: 2016. Disponível em: <www.sosbai.com.br>. Acesso: 16 maio 2018.

SOLAUN, O. et al. Biomonitoring of metals under the water framework directive: detecting temporal trends and abrupt changes, in relation to the removal of pollution sources. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 26-35, 15 fev. 2013.

SOUZA, P. P. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos em ostras crassostrea brasiliana mantidas em diferentes locais do Sistema Estuarino De Laguna , SC, durante o inverno**. 2015. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Pesca)-Universidade do Estado de Santa Catarina, 2015. Laguna, SC, 2015.

STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB life**, v. 64, n. 5, p. 362–9, maio 2012.

SUEDEL, B. C. et al. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 136, p. 21-89, 1994.

THOMPSON, E. D.; HOGSTRAND, C.; GLOVER, C. N. From sea squirts to squirrefish: facultative trace element hyperaccumulation in animals. **Metallomics**, v. 10, n. 6, p. 777-793, 20 jun. 2018.

TREVISAN, R. et al. Thiol oxidation of hemolymph proteins in oysters *Crassostrea brasiliana* as markers of oxidative damage induced by urban sewage exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1833-1845, 2017.

TURJA, R. et al. A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 398-409, 2014.

VALDEZ DOMINGOS, F. X. et al. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental Research**, v. 105, n. 3, p. 350-363, 1 nov. 2007.

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

VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, n. 3, p. 219-226, 2007.

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

WANG, L. et al. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 51-56, dez. 2008.

WANG, W. X.; LU, G. Heavy Metals in Bivalve Mollusks. In: **Chemical contaminants and residues in food**: second edition. Elsevier, 2017. p. 553-594.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. C, p. 325-333, 1981.

YANG, C.-Y. et al. Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 201, p. 22-29, 1 nov. 2016.

YIN, Q.; WANG, W.-X. Uniquely high turnover of nickel in contaminated oysters *Crassostrea hongkongensis*: biokinetics and subcellular distribution. **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 159-166, 1 jan. 2018.

YOLOĞLU, E.; UÇKUN, M.; UÇKUN, A. A. Metal accumulation and biochemical variations in the freshwater mussels (*Unio mancus*) collected from Atatürk Dam Lake, Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, p. 60-68, 1 ago. 2018.

YU, R. Q.; WANG, W. X. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 129, n. 3, p. 443-456, 2004.

ZACCHI, F. L. et al. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 94-103, 1 fev. 2017.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes**. 2009. 172p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.