


**MARISTELA AZEVEDO**

**A OSMORREGULAÇÃO COMO BIOMARCADOR PARA ANÁLISE DO  
IMPACTO DE CONTAMINANTES E AVALIAÇÃO DE REGIÕES  
COSTEIRAS BRASILEIRAS.**



Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Zoologia. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR)

**CURITIBA**

**2005**

**MARISTELA AZEVEDO**

**A OSMORREGULAÇÃO COMO BIOMARCADOR PARA ANÁLISE DO  
IMPACTO DE CONTAMINANTES E AVALIAÇÃO DE REGIÕES  
COSTEIRAS BRASILEIRAS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Zoologia. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR)

CURITIBA

2005

Termo de aprovação

**A OSMORREGULAÇÃO COMO BIOMARCADOR PARA ANÁLISE DO  
IMPACTO DE CONTAMINANTES E AVALIAÇÃO DE REGIÕES  
COSTEIRAS BRASILEIRAS**

por

***Maristela Azevedo***

Dissertação aprovada em 23 de fevereiro de 2005, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire - UFPR



Dr. Adalberto Bianchini - FURG



Dra. Helena Cristina da Silva de Assis - UFPR

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIÇÕES .....	VI
RESUMO GERAL.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. BIOMARCADORES , BIOMONITORAMENTO E BIOINDICADORES.....	2
1.2. FISIOLOGIA DA OSMORREGULAÇÃO .....	4
1.3. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS .....	8
1.4. A ATIVIDADE DA $Na^+,K^+$ -ATPase E ANIDRASE CARBÔNICA COMO BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	8
1.5. A REGULAÇÃO OSMO-IÔNICA DO LÍQUIDO EXTRA-CELULAR COMO BIOMARCADOR FISIOLÓGICO .....	9
<b>2. PARTICIPAÇÃO NO PROJETO: INSTITUTOS DO MILÊNIO .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
I.1. INTRODUÇÃO .....	15
I.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
I.2.1. <i>Áreas de Estudo</i> .....	17
I.2.2. <i>Coletas dos animais</i> .....	19
I.2.3. <i>Coleta de amostras em laboratório</i> .....	19
I.2.4. <i>Análise das Amostras</i> .....	19
I.2.4.1. Homogeneização .....	19
I.2.4.2. Atividade ATPásica Total e da $Na^+,K^+$ -ATPase.....	20
I.2.4.3. Atividade da Anidrase Carbônica .....	20
I.2.4.4. Quantificação de Proteínas .....	21

I.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
I.4.	RESULTADOS.....	22
I.4.1.	<i>Atividade ATPásica Total</i> .....	23
I.4.2.	<i>Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</i> .....	23
I.4.3.	<i>Atividade da Anidrase Carbônica</i> .....	25
I.5.	DISCUSSÃO .....	27
I.5.1.	<i>Complexo Estuarino Baía de Itamaracá-PE</i> .....	27
I.5.2.	<i>Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim-ES</i> .....	33
I.6.	CONCLUSÃO .....	38
<b>CAPÍTULO II.....</b>		<b>40</b>
	RESUMO.....	40
	ABSTRACT .....	41
II.1.	INTRODUÇÃO .....	42
II.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
II.2.1.	<i>Áreas de Estudo</i> .....	44
II.2.2.	<i>Coleta dos animais</i> .....	44
II.2.3.	<i>Coleta de amostras em laboratório</i> .....	45
II.2.4.	<i>Análise das amostras</i> .....	46
II.2.4.1.	Homogeneização das amostras .....	46
II.2.4.2.	Atividade ATPásica Total e da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	46
II.2.4.3.	Anidrase Carbônica .....	46
II.2.4.4.	Quantificação de Proteínas .....	46
II.2.4.5.	Osmolalidade .....	47
II.2.4.6.	Dosagens iônicas .....	47
II.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
II.4.	RESULTADOS.....	49
II.4.1.	<i>Atividades enzimáticas em brânquias de ostras C. rhizophorae</i> .....	49
II.4.1.1.	Atividade ATPásica Total .....	49
II.4.1.2.	Atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	50
II.4.1.3.	Atividade da Anidrase Carbônica .....	50
II.4.2.	<i>Atividades enzimáticas em brânquias de bagres C. spixii</i> .....	52
II.4.2.1.	Atividade ATPásica Total .....	53

II.4.2.2.	Atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	53
II.4.2.3.	Atividade da Anidrase Carbônica .....	54
II.4.3.	<i>Osmolalidade e concentrações iônicas na hemolinfa de ostras C. rhizophorae</i> .....	55
II.4.3.1.	Osmolalidade .....	55
II.4.3.2.	Íons Cloreto .....	56
II.4.3.3.	Íons Sódio .....	57
II.4.3.4.	Íons Potássio .....	58
II.4.3.5.	Íons Magnésio .....	59
II.4.3.6.	Íons Cálcio .....	60
II.4.4.	<i>Osmolalidade e concentrações iônicas no plasma sangüíneo de bagres C. spixii</i> .....	61
II.4.4.1.	Osmolalidade .....	62
II.4.4.2.	Íons Cloreto .....	63
II.4.4.3.	Íons Sódio .....	64
II.4.4.4.	Íons Potássio .....	65
II.4.4.5.	Íons Magnésio .....	66
II.4.4.6.	Íons Cálcio .....	67
II.5.	DISCUSSÃO .....	68
II.5.1.	<i>Ostras</i> .....	68
II.5.2.	<i>Bagres</i> .....	75
II.6.	CONCLUSÃO .....	83
<b>3.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>84</b>
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>

À Deus  
À minha mãe, por seu exemplo de luta e dedicação  
**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina, minha orientadora, que sempre me orientou de forma compreensiva e amigável. Obrigada por todos estes anos de ensino. Graças a você aprendi o que é ser um pesquisador.

Ao Robson, meu namorado querido, que foi paciente quando eu tinha tarefas a realizar, que me ajudou a resolver muitas delas, que foi meu companheiro indo comigo milhares de vezes ao Politécnico, que me encorajou e que soube me acalantar nos momentos de angústia. Obrigada, meu amor! Você tornou muito mais alegre a minha vida!

Aos meus amigos que fizeram valer todos os momentos de dificuldades... Que sempre me encorajaram e me apoiaram e que muitas e muitas vezes me ajudaram. Meu muito obrigada à Val, Deni, Kethy, Helber, Irvo, Mary Clarice e Juju. A vida com vocês é bem mais colorida!

À minha amiga de Pós-graduação, Nicole. Sou muito feliz por tê-la conhecido.

À Viviane pelas contribuições: muito eu aprendi com você nestes anos todos.

Novamente, o meu agradecimento ao Deni e ao Helber, por suas grandes colaborações.

À Carla que me auxiliou diversas vezes no uso do fotômetro de chama.

Ao Juliano Zanette e ao Fabiano Koslowski, que me ajudaram fornecendo informações importantes para este trabalho.

Aos professores Dr<sup>o</sup>. Rosalvo Fogaça, Dr<sup>o</sup>. Silvo Veiga, Dr<sup>o</sup>. Silvio Zanata, Dr<sup>o</sup>. Patricio Peralta e Dr<sup>a</sup>. Rosana Nogueira Moraes por terem disponibilizado seus laboratórios para muitas das análises desta dissertação.

À toda equipe do Milênio pelas coletas e ajuda e à CAPES, pela bolsa.

Ao curso de Pós-graduação em Zoologia pela oportunidade e, em especial, à Vera, por ter sempre me ajudado de forma compreensiva e eficiente.

À minha família, em especial, à minha mãe, Matilde, pela compreensão, apoio e incentivo.

À todas as demais pessoas que amo por existirem e por acreditarem em mim...

e aos animais que foram sacrificados.

**MÃOS DADAS**

Não serei o poeta de um mundo  
caduco.  
Também não cantarei um mundo futuro.  
Estou preso à vida e olho meus  
companheiros.  
Estão tarciturnos mas nutrem grandes  
esperanças.  
Entre eles, considero a enorme  
realidade.  
O presente é tão grande, não nos  
Afastemos.  
Não nos afastemos muito, vamos de  
mãos dadas.  
(Carlos Drummond de Andrade)

## Lista de Figuras

- Fig. 1. A- Região de coleta no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Baía de Itamaracá, PE. B- Região de coleta no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açú e Piraquê-mirim no distrito de Santa Cruz, Aracruz, ES. Os pontos de coleta estão representados por C1 (Contaminado 1), C2 (Contaminado 2) e R (Referência). ..... 18
- Fig. 2. Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04. A- coletadas na Baía de Itamaracá-PE e B- coletadas Baía de Aracruz-ES Itamaracá-PE. Contaminado 1= ponto mais próximo às fontes de contaminação, Contaminado 2= ponto relativamente mais afastado das fontes de contaminação e Referência= ponto considerado isento de contaminação. Valores médios $\pm$ erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; \*\*= diferença significativa em relação ao outro grupo Contaminado; #= diferença significativa em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta..... 26
- Fig. 3- Região de coleta no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá, PR e os pontos amostrados durante duas coletas anuais para cada biomarcador. Os pontos de coleta estão representados por C1 (Contaminado 1), C2 (Contaminado 2) e R (Referência). ..... 43
- Fig. 4. Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias, Contaminado 2= ponto próximo à fontes de contaminação de esgotos urbanos e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios $\pm$ erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; \*\*= diferença significativa em relação ao outro grupo Contaminado..... 52
- Fig. 5. Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Cathorops spixii* coletados em abril/03 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios $\pm$ erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência. .... 54

- Fig. 6. Osmolalidade (mOsmols/kg H<sub>2</sub>O) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias, Contaminado 2= ponto próximo à fontes de contaminação de esgotos urbanos e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios±erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; #=diferença em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta. = osmolalidade estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 56
- Fig. 7. Concentração de Cloreto ([Cl<sup>-</sup>], mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. = concentração de Cl<sup>-</sup> estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 57
- Fig. 8- Concentração de Sódio ([Na<sup>+</sup>], mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. = concentração de Na<sup>+</sup> estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 58
- Fig. 9. Concentração de Potássio ([K<sup>+</sup>], mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. = concentração de K<sup>+</sup> estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 59
- Fig. 10. Concentração de Magnésio ([Mg<sup>2+</sup>], mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. = concentração de Mg<sup>2+</sup> estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 60
- Fig. 11. Concentração de Cálcio ([Ca<sup>2+</sup>], mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. = concentração de Ca<sup>2+</sup> estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 61
- Fig. 12. Osmolalidade (mOsmols/kg H<sub>2</sub>O) no plasma sangüíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em

geral. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência. #=diferença em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta. = osmolalidade estimada para a água do estuário em cada local de coleta. .... 62

Fig. 13. Concentração de Cloreto ( $[Cl^-]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. = concentração de  $Cl^-$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 63

Fig. 14. Concentração de Sódio ( $[Na^+]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. = concentração de  $Na^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 64

Fig. 15. Concentração de Potássio ( $[K^+]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. = concentração de  $K^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 65

Fig. 16. Concentração de Magnésio ( $[Mg^{2+}]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. = concentração de  $Mg^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 66

Fig. 17. Concentração de Cálcio ( $[Ca^{2+}]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. = concentração de  $Ca^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta..... 67

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros abióticos da água em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 nos pontos de coleta no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Baía de Itamaracá, PE* e do Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim, Aracruz, ES**.	22
Tabela 2- Atividade ATPásica total e da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em brânquia da ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> , coletadas em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 no Sistema Estuarino Canal de Santa Cruz, Itamaracá,PE e no Complexo Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim, Aracruz, ES <sup>‡</sup> .	24
Tabela 3 – Parâmetros abióticos da água em abril e agosto (2003) e fevereiro (2004) nos pontos de coleta no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá, PR*.	49
Tabela 4- Atividade ATPásica total e da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em brânquia da ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 e do bagre <i>Cathorops spixii</i> coletados em abril de 2003 e fevereiro de 2004 no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, PR <sup>‡</sup> .	51

## Lista de Abreviações

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFPR: Universidade Federal do Paraná

## Resumo Geral

Os estuários são regiões de grande importância biológica, pois fornecem proteção e alimento para várias espécies. Por outro lado, são freqüentemente contaminados por esgotos urbanos e industriais, pesticidas e resíduos de embarcações. Apesar dessa problemática e da importância dos estuários, ainda não estão padronizados métodos para a avaliação do impacto de contaminantes em estuários brasileiros através de estudos de espécies viventes nos mesmos. Assim, com o objetivo de se identificar se mecanismos osmorregulatórios são responsivos à presença de contaminantes em estuários, foi realizada a avaliação de três regiões da costa brasileira: Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz-PE, Sistema Estuarino rios Piraquê-açú e Piraquê-mirim-ES e Complexo Estuarino Baía de Paranaguá-PR. Em todas as regiões utilizou-se como bioindicador de contaminação a ostra *Cassostrea rhizophorae* e, no PR, utilizou-se também o bagre *Cathorops spixii*. Foram escolhidos três pontos de coleta em cada uma das regiões: um próximo a fontes de contaminação (C1), um relativamente afastado de tais fontes ou contaminado por outros tipos de contaminantes (C2) e um afastado, considerado isento, ou pelo menos, de menor contaminação (Referência). As coletas dos animais foram realizadas em duas épocas do ano, agosto/03 (período de seca/inverno) e fevereiro/04 (período de chuvas/verão). Foram avaliadas as atividades enzimáticas: atividade ATPásica total,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica (AC) em brânquias de ostras em todas as regiões e nas brânquias de bagres no PR. Para as ostras e bagres do PR ainda foram feitas análises da osmolalidade e concentrações iônicas de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados obtidos apontam para dois tipos de respostas das enzimas estudadas: (1) menor atividade enzimática, o que está de acordo com as inibições por contaminantes que a literatura sugere ou, (2) maior atividade enzimática, considerada pela literatura como uma resposta de tolerância a contaminantes. Estes resultados foram encontrados em todas as regiões e, em ambas as espécies estudadas. Através da comparação dos mesmos nas duas épocas de coleta, sugere-se: maior contaminação para as ostras coletadas em fevereiro/04 no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz-PE e no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açú e Piraquê-mirim-ES. Para o Complexo Estuarino Baía de Paranaguá-PR, a época considerada mais contaminada foi a de agosto/03, levando-se em consideração as respostas enzimáticas e as análises de osmolalidade para as ostras e bagres dessa região.

## Abstract

Estuaries are environments of great biological relevance, as they provide shelter and food to several species. On the other hand, they are frequently located next to urban, agricultural, harbour, and industrial sources of pollutants. Despite the relevance of water quality in estuaries, methods for the evaluation of pollution impact in Brazilian estuaries are still not standardized. Thus, with the aim at testing the function of osmoregulation as a potential biomarker, 3 estuarine areas along the coast of Brazil have been investigated: the estuarine complex of the Santa Cruz Channel-PE, the Estuarine System of the rivers Piraquê-açu and Piraquê-mirim-ES, and the Estuarine Complex of Paranaguá Bay-PR. The oyster *Cassostrea rhizophorae* has been used in all 3 estuaries as bioindicator. For the studies in the state of PR the catfish *Cathorops spixii* has also been used. Three collection sites have been chosen in each region: one next to pollution sources (C1), one of expected intermediary level of contamination, or receiving discharge of another pollution source (C2), and the third one considered devoid of significant pollution, considered the "Reference". Animals were collected during 2 seasons: August 2003 (winter/dry season), and February 2004 (summer/rainy season). The function of osmoregulation as biomarker was assessed through the following parameters: oyster and fish branchial activities of total ATPases, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Carbonic Anhydrase (CA). Oyster hemolymph and catfish blood samples were obtained from animals collected in the State of PR. Osmolality and Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations were determined in those fluids. The results obtained point to two types of responses to pollution. The first response was in the direction of lower enzyme activities in the animals collected at the polluted sites, compatible with enzyme inhibition, as suggested in the literature. The second response was in the direction of higher activities, which could be due to the mechanisms of resistance/tolerance developed after long-term exposure to pollution. These 2 types of response were found in all 3 estuaries and species studied. The season of higher pollution impact was of February 2004 for oysters from PE and ES, and the winter season (August 2003) for the Estuarine Complex of PR.

## 1. Introdução

Um estuário (de *aestus*, maré) é um corpo de água costeira semi-fechada que possui uma ligação com o mar aberto. Sendo assim, é fortemente afetado pela ação das marés, e dentro dele ocorre mistura da água marinha com a água doce oriunda do continente (Odum, 1988). As regiões estuarinas abrangem desembocaduras de rios, manguezais e baías. Tais regiões são biologicamente importantes, pois fornecem proteção e alimento para várias espécies, desempenhando assim, funções vitais, como abrigar todos os ciclos de vida de muitas espécies de ostras e caranguejos, fazer parte da rota de migração de espécies anádromas e catádromas e ser local de desova e “berçário” para muitas espécies de peixes e camarões (Ketchum, 1983; Odum, 1988).

Os estuários são freqüentemente expostos à intensa atividade humana, servindo como depósitos de efluentes provenientes de áreas continentais, tais como esgotos urbanos e pesticidas, efluxos industriais e produtos do fluxo de embarcações (Kennish, 1991). Regiões portuárias geralmente são bastante impactadas por compostos biocidas presentes nas tintas dos cascos de navios (TBT, tributilestanho), falhas nas operações de carga e descarga nos terminais e derramamento de produtos químicos (Nipper, 1990).

Vários contaminantes lançados nos estuários e no mar compreendem compostos de várias categorias químicas, como: hidrocarbonetos aromáticos, compostos organoclorados e organometálicos e metais pesados. Enquanto permanecerem presentes na coluna d'água estes contaminantes podem ser bioacumulados por organismos da região do infra-litoral de costões rochosos, podendo ser prejudiciais também para seus gametas e fases larvárias (presentes no plâncton). Contudo, a maioria destes contaminantes geralmente se liga a partículas em suspensão e se acumula no sedimento, de onde podem ser liberados lentamente para

camada intersticial de água, tornando-se disponíveis para os organismos bentônicos (Nipper, 1990).

Os efeitos de contaminantes nos organismos estuarinos e marinhos são grandemente manifestados em deficiências alimentares, no crescimento, no balanço energético e recrutamento de populações, podendo inclusive comprometer o sucesso reprodutivo e causar mudanças na estrutura e dinâmica de comunidades (Kennish, 1991).

Devido ao impacto humano sobre as regiões costeiras, principalmente as estuarinas, e pelos efeitos já relatados de alguns tipos de contaminantes sobre a saúde dos organismos, é imprescindível a padronização de métodos e escolha de biomarcadores que possam avaliar os impactos a que estão sujeitas as regiões costeiras do Brasil, regiões estas ainda carentes de monitoramento.

### **1.1. Biomarcadores , Biomonitoramento e Bioindicadores**

Os biomarcadores são as alterações fisiológicas, bioquímicas, celulares ou teciduais sofridas pelos organismos que indiquem exposição ou efeito de contaminantes sobre os mesmos. No contexto ambiental, os biomarcadores podem fornecer informações sobre a entrada de contaminantes no organismo, sua distribuição nos tecidos e suas interações toxicológicas com o mesmo. Assim, os biomarcadores podem fornecer respostas mais completas sobre a saúde do ambiente em programas de monitoramento ambiental, pois vão além de levantamentos abióticos e de concentração de contaminantes em organismos e na área monitorada. Dessa forma, o biomonitoramento, que consiste em estudos rotineiros de biomarcadores de uma ou mais espécies de organismos (bioindicadores) presentes na área contaminada, é de grande importância. Vale salientar que em estudos de biomonitoramento é necessário

que as mesmas análises feitas na área contaminada sejam feitas também em uma área referência ecologicamente comparável, para que as diferenças obtidas entre as duas áreas possam ser consideradas como decorrentes da exposição aos contaminantes (McCarthy e Shugart, 1990).

Os bioindicadores sésseis ou pertencentes a populações com área de vida restrita, se representativos nas áreas de estudo, são recomendáveis para o biomonitoramento de regiões impactadas, pois formam populações permanentemente expostas aos contaminantes (McCarthy e Shugart, 1990). Moluscos filtradores e peixes têm sido bastante empregados em estudos de ecotoxicologia e monitoramento ambiental (Fent, 1996; Jagoe *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2002; Fent, 2003). O uso associado de animais destes dois grupos certamente poderá fornecer uma melhor avaliação do impacto de contaminantes sobre populações na área estudada, haja vista as diferenças de respostas fisiológicas e a forma diferenciada de entrada de contaminantes nesses organismos (McCarthy e Shugart, 1990).

Os danos de um contaminante no organismo são influenciados pela biodisponibilidade do mesmo, a forma de exposição, a via de entrada no organismo, o nível de contaminação e tempo de exposição (Fent, 1996). Os efeitos de contaminantes podem ser diretos ou indiretos: efeitos diretos ocorrem via hídrica, quando o contaminante está presente na coluna d'água, podendo ser absorvido, adsorvido pelas superfícies corpóreas ou trato respiratório. Efeitos indiretos compreendem influências do contaminante sobre a cadeia trófica, podendo este se bioacumular (acumular-se nos organismos), biomagnificar (passar pela cadeia alimentar, indo se acumular principalmente nos organismos de níveis tróficos superiores) ou até eliminar certas espécies importantes como alimento para outras, agravando o dano ao ecossistema por interações populacionais (Nipper, 1990).

Dentre os inúmeros biomarcadores comumente usados, biomarcadores bioquímicos e fisiológicos que investiguem a relação dos animais com o seu meio podem ser bons sinalizadores de algum prejuízo ao seu “bem estar”. Os processos osmorregulatórios e atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica podem ser considerados biomarcadores fisiológicos e bioquímicos gerais para avaliação de regiões impactadas, pois podem indicar variações na fisiologia de organismos tanto contaminados via hídrica (pela exposição das brânquias a contaminantes), como trófica (pela exposição dos rins e trato digestivo ao contaminante). É claro que outros tecidos podem ser expostos aos contaminantes, tanto por via hídrica como trófica, mas os tecidos primariamente envolvidos nos processos osmorregulatórios são os mencionados acima. Contudo, para servirem como biomarcadores é imprescindível distinguir suas respostas de variações fisiológicas normais do organismo. Por isso, quando possível, é importante agrupar suas respostas com outros biomarcadores, como o cortisol plasmático, que influencia diretamente os processos osmorregulatórios, o fluxo e a permeabilidade iônica, os mecanismos de excreção e as análises histológicas, que podem demonstrar diretamente os danos de contaminantes sobre os tecidos osmorregulatórios. Em conjunto com estes outros biomarcadores é possível um diagnóstico mais preciso dos efeitos de contaminantes sobre a saúde de organismos de áreas contaminadas.

## **1.2. Fisiologia da osmorregulação**

Através do processo evolutivo, os organismos multicelulares foram adquirindo capacidade para manter seu meio interno estável, protegendo, desta forma, seus tecidos contra as oscilações do meio externo, o que permitiu a sobrevivência destes em meios de concentrações variadas. A manutenção da estabilidade do meio interno

(homeostase) envolve retenção de quantidades adequadas de água e concentrações apropriadas de vários solutos nos meios intra e extracelulares (Randall *et al.*, 2002). Os animais marinhos que conseguem sobreviver em águas salobras podem ser osmoconformadores ou osmorreguladores. A literatura cita a hipótese de as ostras serem osmoconformadoras, tal como a maioria dos moluscos marinhos (Schmidt-Nielsen, 1996). Isto indicaria que sua concentração interna de sais muda de acordo com as variações de salinidade ambientais, embora as concentrações isoladas de cada íon possam diferir daquelas da água do mar, por regulação iônica. Além das ostras conseguirem suportar uma diluição considerável, ainda podem fechar suas conchas para tolerar os efeitos da diluição periódica da água do estuário (Schmidt-Nielsen, 1996). Mesmo que o animal seja osmoconformador, mecanismos regulatórios estarão envolvidos para a manutenção do volume celular dentro de limites rigorosos (Jobling, 1995).

Teleósteos eurialinos, como os bagres residentes em estuários, são osmorreguladores. Estes animais podem tolerar e se adequar a uma grande variação de salinidade. Diante de uma variação de salinidade, em geral, supõe-se que ocorra inicialmente um breve período de adequação no qual as concentrações iônicas e osmóticas plasmáticas variam. Este período é sucedido por uma fase regulatória, na qual os níveis iônicos e a osmolalidade são precisamente regulados, atingindo a homeostase osmótica e iônica (Jobling, 1995). Para essa regulação, há uma relação diretamente proporcional entre a salinidade do ambiente ao redor do peixe e sua taxa de ingestão de água e uma relação inversamente proporcional entre a salinidade e o volume urinário deste animal. Vários mecanismos para a manutenção das concentrações internas osmóticas e de íons podem estar presentes, envolvendo sistemas de transporte de íons através das brânquias, rins e intestinos (Jobling, 1995), os quais dependem de forma direta ou indireta da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

(Venturini *et al.*, 1992; Avella *et al.*, 1993). Um aumento na salinidade em longo prazo induz mecanismos para garantir a hipo-regulação na fase regulatória: aumento no número de células de cloreto branquiais (CC) com aumento da atividade de sua  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (para excreção de íons) (Venturini *et al.*, 1992; Jobling, 1995; McCormick, 1995), diminuição no fluxo urinário (Jobling, 1995) e obtenção de água através do esôfago (Venturini *et al.*, 1992). Ocorrendo redução da salinidade, ou mesmo em água doce, o peixe eurialino irá hiper-regular, respondendo, na maioria das vezes, com uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial com diminuição das CC, aumento da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase renal (para reabsorção renal de sal) e aumento da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase esofagiana (Venturini *et al.*, 1992) provavelmente para obtenção de íons, como cita Jobling, (1995) para os teleósteos marinhos. Estes sistemas são importantes para a homeostase do líquido extra-celular (LEC) e manutenção das funções orgânicas, e precisam funcionar eficientemente para compensar a perda difusional de íons que ocorre através do epitélio branquial, urina e parede do corpo (Evans, 1993; Jobling, 1995; McCormick, 1995).

Além da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, outra enzima considerada importante nos processos gerais de osmorregulação por estar envolvida no transporte de íons é a anidrase carbônica (Henry e Cameron, 1983; Vitale *et al.*, 1999; Skaggs e Henry, 2002; Henry *et al.*, 2003; Swenson, 2003). Esta enzima participa nos processos de regulação ácido-básica, ou seja, na manutenção do pH dentro de certos limites através da catálise da reação de hidratação do  $\text{CO}_2$ :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ , ocorrendo tanto em vertebrados quanto invertebrados (Lionetto *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1999; Skaggs e Henry, 2002; Swenson, 2003). Para organismos osmorreguladores marinhos e estuarinos sobreviverem em habitats com águas mais diluídas, ocorre absorção de sais do ambiente através das brânquias, principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , mas também  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Skaggs e Henry, 2002). O mecanismo de transporte de cátion e/ou ânion que utiliza

produtos iônicos da reação de hidratação do  $\text{CO}_2$  no contra-transporte (por exemplo,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) depende, dessa forma, da anidrase carbônica para a geração destes produtos iônicos (Henry e Cameron, 1983; Henry, 1988 *apud* Skaggs e Henry, 2002; Swenson, 2003). Devido à sua função e sua ampla presença em tecidos branquiais, a anidrase carbônica é considerada vital para as funções osmorregulatórias de todos os invertebrados aquáticos (Henry, 1984, 1988 *apud* Skaggs e Henry, 2002). Nos peixes, sua atividade é maior nas brânquias do que nos rins e, como as brânquias estão em contato com o meio externo, o mecanismo de transferência de íons é diretamente afetado por mudanças neste meio. Evans (1993) e Heisler (1993) mencionam que trocadores de íons como o  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  são fundamentais para a regulação ácido-básica nas brânquias de peixes, ou seja, também relacionam os mecanismos reguladores de íons diretamente com a atividade da anidrase carbônica. Um exemplo disso foi demonstrado com *Cyprinus carpio* em acidose, no qual houve fluxo unidirecional de cloreto, possivelmente por um trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Heisler, 1993). Com relação à salinidade, Wilson *et al.* (2002) citam que há uma relação linear diretamente proporcional entre a secreção de  $\text{HCO}_3^-$  e a salinidade do ambiente.

Interferências na capacidade de regulação osmo-iônica do LEC afetam o funcionamento das células do organismo, sendo que a presença de um contaminante na água ou no sangue de um peixe poderá comprometer a função da osmorregulação e os processos de regulação ácido-básica no mesmo. No caso dos osmoconformadores, a regulação iônica envolvida na manutenção do volume celular dentro de limites rigorosos também pode ser prejudicada pela exposição ao contaminante. Os efeitos de contaminantes sobre os processos de osmorregulação, bem como, sobre a funcionalidade das enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, e anidrase carbônica serão descritas na seção seguinte como biomarcadores.

### 1.3. Biomarcadores Bioquímicos e Fisiológicos

Em 1992, Buckler e Tillitt citaram que os biomarcadores fisiológicos e bioquímicos têm se tornado importantes devido às suas rápidas respostas, sensibilidade e potencial para indicar diferenças nos processos de avaliação de risco ambiental. Atualmente, estes biomarcadores continuam sendo amplamente utilizados de forma complementar aos biomarcadores morfológicos, mais tradicionais, e há muitos relatos de trabalhos utilizando-os, como por exemplo, Wood *et al.*, (1999), Galindo-Reyes *et al.*, (2000), Webb *et al.*, (2001), Mazon *et al.* (2002), Singh *et al.*, (2002), Brooks e Mills, (2003), Bianchini *et al.* (2004), dentre outros.

### 1.4. A atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e Anidrase Carbônica como Biomarcadores Bioquímicos

Biomarcadores bioquímicos têm sido bastante empregados em estudos de biomonitoramento e de exposição a contaminantes em laboratório (Neufeld e Pritchard, 1979; Grosell *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2002). Um composto químico primeiro atinge e interage com seu sítio de ação de alguma molécula animal. Assim, é evidente que as mudanças bioquímicas são as primeiras a ocorrer, sendo as mais sensíveis respostas biológicas dos organismos à exposição a um contaminante. O contaminante, ao interagir com o organismo pode, por uma variedade de formas, comprometer a manutenção da homeostase (Buckler e Tillitt, 1992).

A atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em peixes e crustáceos é citada na literatura como sendo inibida quando o animal é exposto a vários contaminantes (Buckler e Tillitt, 1992). Tal efeito foi evidente na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de *Fundulus heteroclitus* exposto a compostos orgânicos de estanho (Pinkney *et al.*, 1989) e na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e enguia européia (*Anguilla anguilla*) expostas a nitrato de prata por 96h (Grosell *et al.*, 2000) ou

ainda quando os tecidos isolados (intestino e brânquias) desta última foram expostos “in vitro” ao cádmio por 1h (Lionetto *et al.*, 1998). Quando exposto ao mercúrio, *Micropterus salmoides* revelou inibição de 50% da atividade da sua Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase branquial em ensaios “in vitro” (Jagoe *et al.*, 1996). Caranguejos expostos ao DDT demonstraram inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em testes “in vivo” e “in vitro” (Neufeld e Pritchard, 1979). Apesar disso, outros trabalhos citam aumento de atividade dessa enzima, quando expostas a vários contaminantes, sugerindo que mecanismos de compensação fisiológica possam estar ocorrendo (Webb *et al.*, 2001; Bianchini *et al.*, 2005).

Com relação à anidrase carbônica, foi observada inibição desta enzima em brânquia e intestino da enguia européia (*Anguilla anguilla*) após 1h de exposição “in vitro” ao cádmio (Lionetto *et al.*, 1998). Dentre os crustáceos, foi observada inibição da anidrase carbônica branquial de *Chasmagnathus granulata* quando na presença de cádmio (Vitale *et al.*, 1999), e em *Callinectes sapidus* e *Carcinus maenas* nas presenças de cádmio, prata, cobre ou zinco (Skaggs e Henry, 2002).

Apesar desses estudos indicando efeitos de contaminantes sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e da anidrase carbônica, não há ainda relatos do uso desses biomarcadores em moluscos e em peixes endêmicos da costa brasileira.

### **1.5. A regulação Osmo-lônica do Líquido Extra-celular como Biomarcador Fisiológico**

Os efeitos tóxicos de contaminantes são decorrentes de perturbações das funções fisiológicas normais do organismo afetado. Dessa forma, estudos fisiológicos são necessários não apenas para a compreensão dos efeitos de contaminantes tóxicos, mas também por serem úteis em monitoramentos ambientais para a detecção da presença de contaminantes no ambiente antes mesmo destes se manifestarem em

efeitos ecológicos evidentes (Zachariassen *et al.*, 1991). Como os processos osmorregulatórios e as concentrações iônicas plasmáticas são responsivos a vários contaminantes, a osmorregulação é usada como um indicador da saúde geral do animal exposto ao contaminante (mostrando se há ou não contaminação), do que uma ferramenta para a identificação específica do mesmo (Buckler e Tillitt, 1992).

Em peixes de água doce, a exposição ao TBT (tributilestanho) aparentemente prejudica os sistemas de absorção de sal, a julgar pela diminuição nas concentrações plasmáticas de cloreto e magnésio na traíra (*Hoplias malabaricus*) após 8 doses por via trófica de 0,03  $\mu\text{gTBT/g}$ . Contudo, o efeito de contaminantes não é sempre tão óbvio e interações complexas e compensações parecem ocorrer, uma vez que para esta mesma espécie também foi observado aumento da concentração de cloreto após 14 doses de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $21\mu\text{gPb}^{2+}/\text{g}$ ) administradas troficamente (Azevedo *et al.*, dados não publicados). Para o piavussu (*Leporinus macrocephalus*) houve redução na concentração de magnésio quando administrado  $\text{Al}^{3+}$  na água em pH 7,0 em experimento agudo de 24 horas (Azevedo *et al.*, dados não publicados). Em exposição a nitrato de prata por 96h, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), peixe anádromo, e a enguia européia (*Anguilla anguilla*), peixe catádromo, apresentaram redução no influxo de  $\text{Na}^+$ , sendo que a truta revelou ainda redução no influxo de cloreto (Grosell *et al.*, 2000). Assim, vê-se que há comprometimento de mecanismos osmorregulatórios de diversas espécies de peixes quando expostas a contaminantes.

## **2. Participação no Projeto: Institutos do Milênio**

Este trabalho se inclui no Grupo Temático Qualidade Ambiental e Biodiversidade do Projeto Institutos do Milênio – RECOS (Uso e Apropriação dos Recursos da Zona Costeira). Tal Projeto foi aprovado em 2001 pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e possui apoio financeiro do Banco Mundial. O Projeto Institutos do Milênio – RECOS é

um grande empreendimento, composto por diversas equipes de profissionais de várias áreas vinculados a universidades brasileiras. Segundo informações do site do próprio Projeto do Milênio-RECOs (Milênio do Mar on-line), o Projeto tem como estratégia “realizar estudos padronizados de diversos sistemas costeiros, ligados por uma rede de observações, com o objetivo de monitorar, compreender e prever problemas relativos à pesca, maricultura, biodiversidade, qualidade ambiental, erosão e uso e ocupação da costa brasileira”.

Para tais estudos, foram escolhidas cinco regiões costeiras de Norte a Sul do Brasil, nos estados do Pará, Pernambuco, Espírito Santo, Paraná e Rio Grande do Sul. No âmbito do Grupo Qualidade Ambiental e Biodiversidade, destaca-se entre outros, a avaliação do impacto de ações humanas sobre as cinco regiões supra-citadas para padronização de metodologia de biomonitoramento da mesma. Para tanto, foram e estão ainda sendo realizadas análises abióticas por vários grupos de estudo envolvidos no Projeto como medidas de pH, temperatura, salinidade, transparência da água, determinação de nutrientes, oxigênio dissolvido – pelos grupos de hidroquímica; pesticidas (hidrocarbonetos e metais pesados) – pelo grupo de contaminantes; bióticas (riqueza e diversidade de espécies e análises de biomarcadores) – pelos grupos de biodiversidade e biomarcadores, respectivamente. Todas as coletas para estas análises ocorreram em todas as regiões de estudo em um intervalo máximo de 2 semanas, a fim de agrupar e validar os resultados de cada região e possivelmente poder compará-las, considerando-se ainda, as épocas sazonais (verão/inverno ou estação seca/chuvosa).

O grupo de biomarcadores, coordenado pelo Prof. Dr. Adalberto Bianchini ficou subdividido em dois: UFPR-Grupo Aquatox e FURG-Grupo de Pesquisa em Zoofisiologia. O Grupo Aquatox ficou responsável pela análise de biomarcadores histológicos de todos os animais coletados, e de biomarcadores genéticos, fisiológicos

e bioquímicos (atividade das enzimas colinesterase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica) dos animais provenientes das regiões de PE, ES e PR, enquanto que o Grupo de Pesquisa em Zoofisiologia responsabilizou-se por outras análises bioquímicas dos animais coletados no PA e RS.

Os estudos dos biomarcadores bioquímicos (análise das atividades da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica branquiais) tratados nesta dissertação estão organizados em capítulos: o primeiro capítulo trata dos resultados obtidos com ostras na Baía de Itamaracá-PE e Aracruz-ES e o segundo, dos resultados obtidos com ostras e bagres em Paranaguá-PR, sendo que nesta região ainda foram analisados biomarcadores fisiológicos (osmolalidade e concentrações iônicas de fluidos corporais de ambas as espécies coletadas). Além da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica, em cada capítulo também estão descritas a atividade ATPásica tTotal branquial para os animais em questão, sendo sua determinação um subproduto no processo de quantificação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. O objetivo comum dos dois capítulos foi o de avaliar as respostas bioquímicas e fisiológicas dos animais coletados, a fim de qualificar a ação de contaminantes e principalmente, verificar se estes biomarcadores foram úteis para a avaliação das regiões estudadas. Em cada capítulo, os pontos de coleta são descritos como: Contaminado 1, para a área próxima a fontes de contaminação, Contaminado 2, para a área relativamente mais distante de fontes contaminação e Referência, para a área considerada isenta de influência humana. Os dados estão apresentados por biomarcador avaliado, sendo inicialmente apresentados os provenientes das ostras para ambas as épocas sazonais e, em seguida, os dos bagres, quando necessário.

## Capítulo I.

### **Avaliação de contaminação nas regiões estuarinas de Itamaracá – PE e Aracruz-ES através do uso de biomarcadores bioquímicos associados à osmorregulação em *Crassostrea rhizophorae*: um estudo de campo<sup>1</sup>.**

#### **Resumo**

O Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz é uma região estuarina da Baía de Itamaracá, Pernambuco. Trata-se de uma região com histórico de contaminação por resíduos de fábricas de soda cáustica, cloro e papel e de defensivos agrícolas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. O Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim pertencente ao município de Aracruz, Espírito Santo, por sua vez, pode receber resíduos de fábricas de papel, defensivos agrícolas e de dejetos de esgotos. Com o objetivo de se verificar as respostas de enzimas relacionadas à osmorregulação frente à contaminação nestas regiões estuarinas, a ostra *Crassostrea rhizophorae* foi utilizada como bioindicador. Foram escolhidos três pontos de coleta em cada uma das regiões: um próximo a fontes de contaminação (C1), um mais afastado de tais fontes (C2) e um considerado isento de contaminação (Referência). As ostras foram coletadas nestes três pontos em duas épocas do ano: agosto/03 e fevereiro/04. Foram avaliadas a atividade ATPásica total, da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica (AC) branquial destes organismos. Os resultados obtidos sugerem dois tipos de respostas das enzimas estudadas em ambas as regiões: 1) menor atividade para as ostras dos pontos contaminados, demonstrando efeito de contaminantes sobre as enzimas ou, 2) maior atividade enzimática para estes organismos dos pontos contaminados, o que é considerada uma resposta de tolerância a contaminantes. Para PE, foram observados efeitos apenas sobre a AC, sendo que em agosto houve o tipo 2 de resposta e, em fevereiro, o tipo 1. Para ES, resposta do tipo 1 foi observada para a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de ostras de agosto e para a AC das ostras de fevereiro; resposta do tipo 2 foi observada apenas para a atividade ATPásica total em fevereiro. Sugere-se pelas respostas obtidas, que a AC foi o biomarcador mais responsivo e que ambas as regiões analisadas de PE e ES foram mais impactadas em fevereiro, principalmente nos pontos C1 (para PE) e C2 (para ES). Possivelmente em fevereiro (período com maior precipitação de chuvas), há maior biodisponibilidade de contaminantes em ambas as regiões, uma vez que as chuvas podem carrear contaminantes de áreas continentais para os estuários e aumentar a turbulência deste meio, ressuspensando contaminantes já sedimentados.

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi formatado segundo as regras para publicação da Revista Aquatic Toxicology. As figuras e tabelas, porém, estão inseridas no texto para facilitar suas análises.

## Abstract

The estuarine complex of the Santa Cruz Channel belongs to Itamaracá Bay, State of Pernambuco (PE). It is a region with known records of contamination by industrial and agricultural sources. The estuarine system of the rivers Piraquê-açu and Piraquê-mirim belongs to the city of Aracruz, State of Espírito Santo (ES). It also receives runoffs from industrial, agricultural, and domestic origins. Enzymes linked to the function of osmoregulation were studied in the resident oyster *Crassostrea rhizophorae*. Three collection sites were chosen: one next to pollution sources (C1), one further apart from those sources of contamination (C2), and the third one considered devoid of significant pollution, considered the "Reference". Oysters were captured from those sites in August 2003 and February 2004. The function of osmoregulation as biomarker was assessed through the following branchial enzymatic assays: total ATPase, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Carbonic Anhydrase (CA) activities. The results obtained suggest 2 types of responses. The first type was of lower activities in oysters from the polluted sites, indicating enzyme inhibition. The second type of response was of higher activities in the contaminated sites, indicating a tolerance response. In PE, effects have been observed only on CA, in August with increase in activity, and in February with inhibition. For ES, inhibition was detected for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in August and CA in February; activity enhancement for total ATPase activity in February. CA was apparently the most sensitive biomarker, and both studied areas were more impacted in February, mainly in C1 (PE) and C2 (ES). Probably, in February the more intense rain precipitation leads to higher bioavailability of contaminants. This higher bioavailability may be a result of increased continental drainage and/or increased water turbulence resuspending deposited sediments.

## I.1. Introdução

O Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz é uma região estuarina da Baía de Itamaracá, situada no nordeste do Brasil, a 40 km ao norte de Recife, Pernambuco ( $7^{\circ}34' - 7^{\circ}55' S$ ;  $34^{\circ}49' - 34^{\circ}52' W$ , Meyer *et al.*, 1998, Fig. 1A). Há duas estações bem definidas nesta região: uma seca, entre os meses de setembro a janeiro e, outra chuvosa, entre os meses de fevereiro a agosto (Medeiros e Kjerfve, 1993). Foi demonstrada grande variação na salinidade das águas do Canal de acordo com as estações, variando de 34 a 44 na estação seca e 27 a 39 na estação chuvosa (Gomes *et al.*, 2002). Até 1991 grandes quantidades de mercúrio foram lançadas no rio Botafogo, principal rio que desemboca no Canal de Santa Cruz, devido à atividade de uma fábrica de soda cáustica na região (Meyer *et al.*, 1998). Em 2003, Cavalcanti relatou existir ainda altos níveis de mercúrio nas ostras desta região. Informações recentes afirmam ainda existir fábricas de soda cáustica nas imediações do Canal de Santa Cruz, além de fábricas de cloro e papel e de plantações de cana-de-açúcar aonde são usados defensivos agrícolas (Manuel de Jesus Flores Montes, membro da UFPE e participante do Projeto do Milênio-RECOS, comunicação pessoal). Possivelmente esgotos urbanos também atingem o Canal.

A outra região escolhida para este estudo pertence ao Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim, situado no distrito de Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo. Tal Sistema Estuarino possui 65 km de extensão e área de 73,38 Fig. 1B), sendo que apenas 2,25% de sua área é protegida pela Reserva Biológica de Manguezais dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim (Luiz Fernando Loureiro Fernandes, membro da UFES e participante do Projeto do Milênio-RECOS, comunicação pessoal). Segundo outras informações de Luiz Fernando Loureiro Fernandes, o manguezal do rio Piraquê-mirim avança cerca de 9 km em direção ao continente, enquanto que o rio Piraquê-açu avança cerca de 13 km, sendo o maior avanço de maré do Espírito Santo.

Descrições do clima de Fundão, município vizinho a Aracruz, afirmam que o clima na região é do tipo tropical úmido, com maiores precipitações de outubro a maio (primavera, verão e outono), não havendo seca pronunciada na região (Cuzzuol e Lima, 2003). Não há relatos concretos dos tipos de contaminantes ocorrentes na região estuarina de Aracruz, embora se saiba que no município de Aracruz há atividades de fabricação de papel, que podem liberar compostos semelhantes a dioxinas -composto organoclorado - (IDEC on-line) para os rios e o desenvolvimento de atividades agrícolas (IBGE on-line), o que também poderia estar carreando contaminantes para áreas estuarinas. Além dessas atividades, o aporte de esgotos urbanos seria outra fonte importante de contaminação do estuário na região.

*Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) é uma espécie de ostra freqüente em muitas áreas estuarinas brasileiras, vivendo associada a raízes de plantas de mangue como a *Rhizophora mangle* (Mancera e Mendo, 1996; Silva *et al.*, 2001), *Laguncularia racemosa* (Fernandes, 1981 *apud* Meyer *et al.*, 1998), e presas também a rochas. Apresenta hábito alimentar filtrador e é considerada um recurso alimentar importante nas zonas costeiras brasileiras e colombianas (Mancera e Mendo, 1996; Silva *et al.*, 2001). Essa espécie já vem sendo utilizada no Brasil em estudos ecotoxicológicos de laboratório e de biomonitoramento, pois seu hábito filtrador pode fazê-la acumular contaminantes (Silva *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2002).

Levando em consideração que tanto o Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz como o Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim possuem áreas contaminadas, que *C. rhizophorae* é bastante freqüente em ambas as regiões e que é um bioindicador já estabelecido para estudos ecotoxicológicos, é relevante realizar a avaliação dessas regiões através do uso de biomarcadores bioquímicos relacionados à osmorregulação em *C. rhizophorae*.

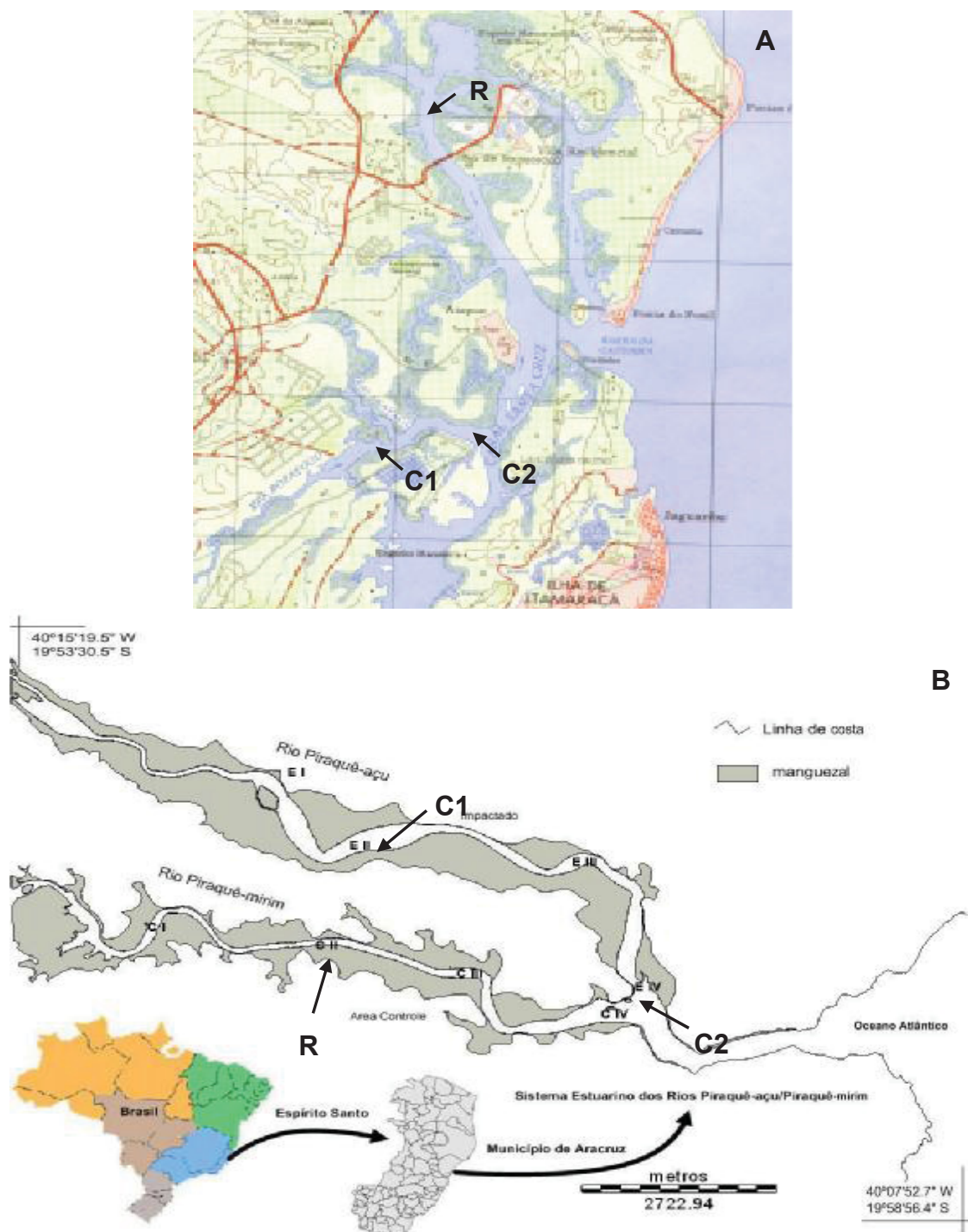
O objetivo deste estudo foi avaliar, através do uso de enzimas associadas à osmorregulação como biomarcadores bioquímicos, uma região impactada por atividades antropogênicas do Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Itamaracá-PE e do Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim, Aracruz-ES durante duas épocas anuais utilizando *Crassostrea rhizophorae*, espécie de molusco bivalve filtrador, como bioindicador.

## **I.2. Material e Métodos**

### **I.2.1. Áreas de Estudo**

De acordo com a proximidade de fontes de contaminantes, duas áreas contaminadas e uma considerada referência foram selecionadas para o trabalho dentro do Complexo Canal de Santa Cruz-PE. Os animais foram coletados em um ponto em cada uma das áreas, em duas coletas: uma durante agosto de 2003 (época seca) e a outra em fevereiro de 2004 (época chuvosa). Tais épocas foram estabelecidas de forma relativa, comparando-se a precipitação média mensal de chuvas em ambos os meses de coleta: em agosto, a precipitação permaneceu na faixa de 100 a 150mm enquanto que em fevereiro, a precipitação de chuvas atingiu a faixa de 150 a 200mm (CPTEC on-line). Os dois pontos contaminados pertencem ao rio Botafogo, sendo o ponto mais próximo a fontes de contaminação denominado Contaminado 1 (7°40'047"S; 34°51'486"W) e o ponto relativamente mais afastado, Contaminado 2 (7°40'574"S; 34°50'564"W). No rio Carrapicho, considerado isento de impacto antropogênico, foi definido o ponto controle, denominado Referência (7°43'042"S; 34°53'383"W; Fig. 1A). Para as avaliações no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim-ES, exatamente o mesmo planejamento amostral foi definido, inclusive para o estabelecimento dos pontos e épocas de coleta. Assim, as coletas foram realizadas também em agosto de 2003 (período de inverno) e em fevereiro de 2004

(período de verão). Os pontos contaminados pertencem ao rio Piraquê-Açu: Contaminado 1 ( $19^{\circ}55'20,22''S$ ;  $40^{\circ}11'31,24''W$ ) e Contaminado 2 ( $19^{\circ}56'31,52''S$ ;  $40^{\circ}10'37,60''W$ ); no rio Piraquê-mirim, foi definido o ponto Referência ( $19^{\circ}56'14,67''S$ ;  $40^{\circ}12'42,33''W$ ), (Fig. 1B).



**Fig. 1-** A- Região de coleta no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Baía de Itamaracá, PE. B- Região de coleta no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim no distrito de Santa Cruz, Aracruz, ES. Os pontos de coleta estão representados por C1 (Contaminado 1), C2 (Contaminado 2) e R (Referência).

### **I.2.2. Coletas dos animais**

*Crassostrea rhizophorae* foram coletadas em campo por integrantes da área temática de Biodiversidade, pertencentes ao Projeto Institutos do Milênio – RECOS. As coletas foram realizadas durante o dia, em marés vazantes de quadratura e foram feitas na margem estuarina. Foram coletadas 30 exemplares de ostra por coleta (10 por ponto). Para a coleta, foi utilizado facão para a sua retirada das raízes de plantas de mangue. Após a coleta, as ostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o laboratório local.

### **I.2.3. Coleta de amostras em laboratório**

As ostras foram crioanestesiadas, abertas, e fragmentos branquiais foram retirados. As amostras foram transportadas em gelo seco até o laboratório em Curitiba onde foram imediatamente armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento para análise da atividade ATPásica Total, da  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -ATPase e da anidrase carbônica.

### **I.2.4. Análise das Amostras**

#### **I.2.4.1. Homogeneização**

As amostras de brânquias de ostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 10%P/V (homogeneizador Potter S B. Braun Biotech International), com tampão imidazol 10 mM em pH 7,5. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 2000 x g (5 min, temperatura ambiente) para precipitação de restos celulares. O sobrenadante foi separado e utilizado como fonte enzimática de ambas as enzimas. Uma alíquota do sobrenadante também foi separada para a verificação da concentração de proteínas.

#### **I.2.4.2. Atividade ATPásica Total e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

O sobrenadante de brânquias das ostras foi incubado em duas soluções-tampão diferentes: SOLUÇÃO 1 – tampão imidazol (20 mM) com MgSO<sub>4</sub> (6 mM), KCl (20 mM), NaCl (100 mM), pH 7,5, sem ouabaína; SOLUÇÃO 2 – solução 1 porém sem KCl (substituído por NaCl, 20 mM) mais ouabaína 2 mM, inibidor específico da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Freire *et al.*, 1995). Todas as amostras foram incubadas por 30 min a 25°C na presença de EDTA 2 mM. O padrão utilizado foi o Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, e o substrato, o Tris-ATP 3 mM. A reação foi interrompida fervendo-se as amostras por 2 min. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi analisado em uma alíquota do sobrenadante da reação utilizando-se reagente contendo ácido ascórbico (20%) e molibdato de amônio (0,84%) em ácido sulfúrico 2N, misturados no momento da utilização. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 830 nm, sendo que a diferença das leituras entre as soluções tampão utilizadas, ou seja, a produção de Pi sensível à inibição por ouabaína, foi atribuída à atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. A leitura proveniente apenas da SOLUÇÃO 1 foi atribuída à atividade ATPásica Total. A atividade específica da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e ATPásica Total foram expressas em μmols Pi/mg proteína/hora após a quantificação de proteínas das amostras.

#### **I.2.4.3. Atividade da Anidrase Carbônica**

A atividade da anidrase carbônica branquial foi determinada segundo método estabelecido por Vitale *et al.* (1999). O método consiste na quantificação da atividade desta enzima através de um meio de reação que contém manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. A 7,5 ml deste meio foram acrescentados 0,05 ml do sobrenadante do homogeneizado tecidual e 1 ml de água destilada saturada com CO<sub>2</sub> a 2,5°C. A queda do pH foi medida durante 20s através do pHmêtro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®. Uma reta de regressão linear do pH x tempo foi

estabelecida, onde a inclinação da reta correspondeu à taxa de reação catalizada (TC). A taxa de reação não catalizada (TNC) foi medida da mesma forma e no mesmo tempo, porém, no lugar da amostra colocou-se 0,05 ml do tampão no qual a amostra havia sido diluída inicialmente. Para calcular a atividade da anidrase carbônica (AAC) utilizou-se a fórmula:  $AAC = [TC/TNC-1]/mg$  proteína total.

#### **I.2.4.4. Quantificação de Proteínas**

A concentração de proteínas totais do homogeneizado foi dosada utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976). Este método baseia-se na mudança de cor do Coomassie Brilliant Blue G-250 de vermelho para azul após ligar-se a proteínas. O complexo formado proteínas-Coomassie Brilliant Blue G-250 possui um alto coeficiente de extinção e, por isso, possui alta sensibilidade para a quantificação de proteínas. As dosagens foram feitas em triplicata em microplacas utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay da Bio-Rad Laboratories® e lidas a 610 nm no leitor de ELISA ELX 800 Auto Reader da Meridian Diagnostics Inc.

### **I.3. Análise Estatística**

As médias dos valores obtidos para os animais dos pontos Contaminados e do ponto Referência entre as épocas sazonais foram comparadas através de análise de variância (Anova) de duas vias seguida do teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Quando dados referentes a apenas uma das épocas de coleta estiveram disponíveis foi utilizada anova de uma via seguida de teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) para dados paramétricos ou Kruskal- Wallis One way Anova on Ranks para dados não-paramétricos. Com exceção da anova de duas vias, os testes estão apresentados nos resultados de forma abreviada: 1-anova para a anova de uma via seguida de teste de Tukey ou KW para

Kruskal-Wallis. Anova on Ranks. As análises estatísticas, assim como médias e erros padrão das médias foram obtidas através do Programa Estatístico Sigma Stat<sup>®</sup> para Windows<sup>®</sup> 2.0 da Jandel Corporation.

#### I.4. Resultados

A Tabela 1 apresenta alguns parâmetros abióticos da água dos pontos de coleta das ostras das regiões de PE e ES que serão utilizados para a discussão dos resultados.

**Tabela 1** - Parâmetros abióticos da água em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 nos pontos de coleta no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Baía de Itamaracá, PE\* e do Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim, Aracruz, ES\*\*.

Parâmetro	Ponto de Coleta	Pernambuco		Espírito Santo	
		Agosto/03	Fevereiro/04	Agosto/03	Fevereiro/04
<b>Salinidade</b> (‰)	Contaminado 1	21,7	18,3	37,6	17,6
	Contaminado 2	26,5	21,0	33,5	23,2
	Referência	29,9	20,7	35,0	20,8
<b>Temperatura</b> (°C)	Contaminado 1	28,0	29,9	23,9	28,7
	Contaminado 2	28,5	30,1	24,1	28,4
	Referência	27,5	30,4	24,2	29,7
<b>pH</b>	Contaminado 1	7,83	8,55	7,07	11,00
	Contaminado 2	8,03	8,24	7,73	13,30
	Referência	8,15	8,31	6,69	10,10

\*- dados pertencentes ao Projeto Institutos do Milênio-RECOS, coletados pela equipe de Oceanografia Química da UFPE.

\*\* - dados pertencentes ao Projeto Institutos do Milênio-RECOS, coletados pela equipe de Sedimentação, Geomorfologia, Uso e Ocupação Costeira da UFES.

#### **I.4.1. Atividade ATPásica Total**

Para as ostras coletadas na região de PE, nenhuma diferença significativa na atividade ATPásica total nas brânquias foi observada, tanto para as coletadas em agosto, quanto para as coletadas em fevereiro. Na comparação entre as épocas de coleta para esta região, também não foram observadas diferenças entre os respectivos grupos (Tabela 2).

Para os animais coletados na região de ES, apenas para os provenientes do ponto Contaminado 2 da coleta de fevereiro apresentaram aumento quando comparados com os da Referência. Referência=  $6,22 \pm 0,50$   $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$  (n=10) e Contaminado 2=  $10,76 \pm 1,14$   $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$  (n=6, p=0,023, Tabela 2). Quando comparadas as épocas de coleta, foi observado ainda menor atividade ATPásica total para os animais dos pontos Contaminado 1 e Referência de fevereiro em relação aos animais destes mesmos pontos coletados em agosto. Referência-agosto=  $9,26 \pm 1,33$   $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$  (n=10, p= 0,040), Contaminado 1-agosto=  $11,43 \pm 1,24$   $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$  (n=9) e Contaminado 1-fevereiro=  $6,83 \pm 0,67$  (n=7, p=0,007, Tabela 2).

#### **I.4.2. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

Não foram encontradas diferenças na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de ostras coletadas em PE durante agosto (KW, Tabela 2). Para as ostras coletadas em fevereiro, pouquíssimas amostras apresentaram atividade desta enzima, sendo por isso, desconsideradas como resultado (Tabela 2).

Para as ostras coletadas em ES, foi observado menor atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para aquelas provenientes do ponto Contaminado 2 quando comparadas com as da Referência coletadas em agosto. Referência=  $2,22 \pm 0,50$   $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$  (n=8)

e Contaminado 2=  $0,91 \pm 0,24$   $\mu\text{mols Pi/mg prote\u00edna/h}$  ( $n=8$ ,  $p=0,042$ , Tabela 2).

Para as coletadas em fevereiro, nenhuma diferen\u00e7a entre os grupos foi observada. Na compara\u00e7\u00e3o de \u00e9pocas de coleta, apenas as ostras do ponto Refer\u00eancia de fevereiro mostraram menor atividade em rela\u00e7\u00e3o \u00e0quelas do ponto Refer\u00eancia de agosto. Refer\u00eancia-fevereiro=  $0,88 \pm 0,48$   $\mu\text{mol Pi/mg prote\u00edna/h}$  ( $n=4$ ,  $p=0,041$ , Tabela 2).

**Tabela 2-** Atividade ATP\u00e1sica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em br\u00e2nquia da ostra *Crassostrea rhizophorae*, coletadas em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 no Sistema Estuarino Canal de Santa Cruz, Itamarac\u00e1, PE e no Complexo Estuarino dos rios Piraqu\u00ea-a\u00e7\u00fa e Piraqu\u00ea-mirim, Aracruz, ES\*.

Par\u00e2metro	Ponto de Coleta	Itamarac\u00e1-PE		Aracruz-ES	
		Agosto/03	Fevereiro/04	Agosto/03	Fevereiro/04
<b>Atividade ATP\u00e1sica Total</b> ( $\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$ )	Contaminado 1	$10,13 \pm 1,12$ ( $n=10$ )	$8,44 \pm 1,57$ ( $n=7$ )	$11,43 \pm 1,24$ ( $n=9$ )	$6,83 \pm 0,67^{\#}$ ( $n=7$ )
	Contaminado 2	$9,97 \pm 1,36$ ( $n=10$ )	$10,07 \pm 0,98$ ( $n=9$ )	$9,52 \pm 1,25$ ( $n=9$ )	$10,76 \pm 1,14^*$ ( $n=6$ )
	Refer\u00eancia	$13,71 \pm 1,07$ ( $n=10$ )	$9,78 \pm 0,94$ ( $n=10$ )	$9,26 \pm 1,33$ ( $n=10$ )	$6,22 \pm 0,50^{\#}$ ( $n=10$ )
<b>Atividade da <math>\text{Na}^+, \text{K}^+</math>-ATPase</b> ( $\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$ )	Contaminado 1	$0,97 \pm 0,09$ ( $n=6$ )	ND	$1,11 \pm 0,49$ ( $n=7$ )	$0,52 \pm 0,19$ ( $n=5$ )
	Contaminado 2	$1,79 \pm 0,37$ ( $n=6$ )	ND	$0,91 \pm 0,24^*$ ( $n=8$ )	$0,48 \pm 0,03$ ( $n=3$ )
	Refer\u00eancia	$0,94 \pm 0,10$ ( $n=5$ )	ND	$2,22 \pm 0,50$ ( $n=8$ )	$0,88 \pm 0,48^{\#}$ ( $n=4$ )

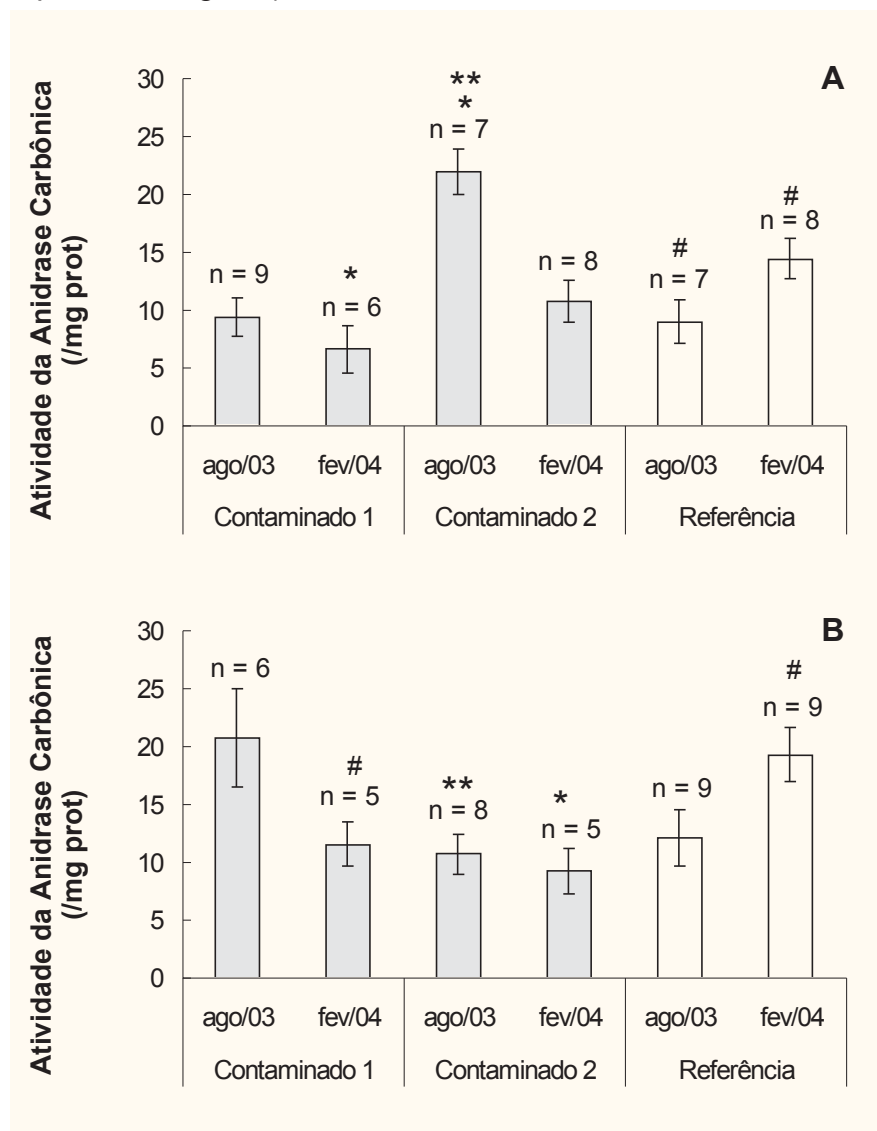
¥-Dados apresentados como m\u00e9dia  $\pm$  erro padr\u00e3o da m\u00e9dia. n= n\u00famero de animais amostrados. Contaminado 1= ponto mais pr\u00f3ximo \u00e0s fontes de contamina\u00e7\u00e3o, Contaminado 2= ponto relativamente mais afastado das fontes de contamina\u00e7\u00e3o e Refer\u00eancia= ponto considerado isento de contamina\u00e7\u00e3o. \*=diferen\u00e7a significativa em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 Refer\u00eancia em uma mesma \u00e9poca de coleta; \*\*=diferen\u00e7a significativa em rela\u00e7\u00e3o ao outro grupo Contaminado em uma mesma \u00e9poca de coleta; #=diferen\u00e7a significativa em rela\u00e7\u00e3o ao mesmo grupo em outra \u00e9poca de coleta. ND= dados n\u00e3o dispon\u00edveis.

### I.4.3. Atividade da Anidrase Carbônica

Em PE, os animais coletados durante agosto no ponto Contaminado 2 apresentaram maior atividade da anidrase carbônica branquial em torno de 2,5 vezes o valor obtido para aqueles do ponto Referência ( $p < 0,001$ ) e do ponto Contaminado 1 ( $p < 0,001$ ). Referência-agosto =  $9,01 \pm 1,40$  /mg proteína ( $n=7$ ), Contaminado 1-agosto =  $9,38 \pm 1,51$  /mg proteína ( $n=9$ ), e Contaminado 2-agosto =  $21,95 \pm 2,63$  /mg proteína ( $n=7$ , Fig. 2A). Para as ostras coletadas durante fevereiro, resultado diferente foi encontrado: indivíduos do ponto Contaminado 1 apresentaram menor atividade da anidrase carbônica branquial cerca de 1,5 vezes o valor obtido para os indivíduos do ponto Referência. Referência-fevereiro =  $14,46 \pm 2,60$  /mg proteína ( $n=8$ ) e Contaminado 1-fevereiro =  $6,62 \pm 1,06$  /mg proteína ( $n=6$ ),  $p=0,018$ . Ao serem comparadas as diferentes épocas sazonais em PE, nota-se que durante fevereiro houve maior atividade da anidrase carbônica nas ostras coletadas no ponto Referência ( $p=0,045$ ) e redução para as ostras do ponto Contaminado 2 quando tais grupos foram comparados com seus respectivos da época de agosto. Contaminado 2-fevereiro =  $10,75 \pm 1,01$  /mg proteína ( $n=8$ ,  $p=0,001$ , Fig. 2A).

No Espírito Santo, houve diferença quando comparados os grupos contaminados coletados durante agosto, sendo que o grupo Contaminado 2 apresentou cerca de 1 vez menor atividade da anidrase carbônica branquial que os do grupo Contaminado 1. Contaminado 1 =  $20,78 \pm 4,26$  /mg proteína ( $n=6$ ) e Contaminado 2 =  $10,72 \pm 1,77$  /mg proteína ( $n=8$ ,  $p=0,030$ , Fig. 2B). Para a coleta realizada em fevereiro, foi observada aproximadamente 1 vez menor atividade da anidrase carbônica para as ostras provenientes do ponto Contaminado 2 quando comparadas com aquelas da Referência. Referência =  $19,29 \pm 2,35$  /mg proteína ( $n=9$ ) e Contaminado 2-fevereiro =  $9,21 \pm 2,44$  /mg proteína ( $n=7$ ,  $p=0,019$ ). Na comparação entre épocas, foi observado aumento da atividade da anidrase carbônica para as ostras do grupo Referência e

redução de atividade para aquelas do grupo Contaminado 1 coletadas durante fevereiro, quando comparadas com aquelas dos respectivos grupos coletadas em agosto. Referência-agosto=  $12,10 \pm 2,46$  /mg proteína (n=9) e Referência-fevereiro=  $19,29 \pm 2,35$  / mg proteína (n=9, p=0,036) e Contaminado 1-fevereiro=  $11,59 \pm 1,96$  /mg proteína (n=5, p=0,037, Fig. 2B).



**Fig. 2-** Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04. A- coletadas na Baía de Itamaracá-PE e B- coletadas Baía de Aracruz-ES Itamaracá-PE. Contaminado 1= ponto mais próximo às fontes de contaminação, Contaminado 2= ponto relativamente mais afastado das fontes de contaminação e Referência= ponto considerado isento de contaminação. Valores médios±erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; \*\*= diferença significativa em relação ao outro grupo Contaminado; #= diferença significativa em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta.

## I.5. Discussão

### I.5.1. Complexo Estuarino Baía de Itamaracá-PE

A ausência de diferenças na atividade enzimática, tanto para a atividade ATPásica total, como para a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, nas brânquias de ostras dos pontos Referência e contaminados em ambas as épocas para a região de PE (Tabela 2) pode indicar duas respostas diversas: 1) realmente não houve diferenças nas atividades destas enzimas entre os grupos estudados ou, 2) o método utilizado para a determinação da atividade destas enzimas para as ostras desta região não foi sensível o suficiente para demonstrar a variação entre os grupos. A primeira hipótese pode ser válida, mas outros trabalhos citam a atividade ATPásica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase como sendo influenciadas por contaminantes, por exemplo, redução de atividade de várias ATPases (incluindo a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) por contaminantes em diversos grupos animais (Neufeld e Pritchard, 1979; Pinkney *et al.*, 1989; Jagoe *et al.*, 1996; Grosell *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2003; Bianchini *et al.*, 2005). A segunda hipótese é levantada porque, na determinação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial das ostras foi verificada pouca inibição por ouabaína, o que acarretou em um número reduzido de amostras com atividade desta enzima na coleta de agosto. Em fevereiro, tal número foi extremamente pequeno, e, por isso foi desconsiderado, uma vez que a amostragem não representou uma parcela da população de ostras dos pontos de coleta. Além disso, através do mesmo método utilizado para a determinação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é determinada também a atividade ATPásica total, neste caso, sem a necessidade da etapa de inibição pela ouabaína. Se o método tem-se demonstrado pouco sensível, tal problema pode estar não apenas vinculado à pouca inibição pela ouabaína, mas pode estar associado também à determinação de fosfato inorgânico formado. Métodos, como o utilizado neste trabalho, que necessitam de banho de fervura para a estabilização de espécies azuis de molibdênio (composto

que evidencia o fosfato inorgânico formado) são considerados pouco sensíveis para se estimar o fosfato inorgânico formado a partir de ensaios enzimáticos que utilizem como substrato ATP, justamente por causa da etapa de fervura que pode interferir nos resultados (Katewa e Katyare, 2003). Possivelmente também, a baixa sensibilidade do método empregado pode estar relacionada com o pequeno tamanho do organismo estudado pois, tanto foi observada esta baixa sensibilidade com ostras, como com peixes de pequeno porte (Capítulo II desta dissertação). Tal método foi utilizado neste trabalho por ser um método já estabelecido em nosso laboratório e ter apresentado boa resposta em trabalhos relacionados com peixes de grande porte como *Oncorhynchus mykiss* (Freire *et al.*, 1995) e *Notothenia neglecta* (Romão *et al.*, 2001). Dessa forma, é difícil atribuir à ausência de atividade ATPásica total e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase como sendo respostas de não efeito dos contaminantes presentes na região de PE sobre tais enzimas. Para confirmar estas respostas seriam necessários outros ensaios enzimáticos utilizando outros métodos para a determinação destas enzimas.

Com relação à anidrase carbônica, para os organismos coletados em agosto foi visualizada maior atividade desta enzima para as ostras do Contaminado 2, quando comparadas com as do Contaminado 1 e Referência. Por outro lado, para as ostras coletadas em fevereiro, houve menor atividade desta enzima para os animais do Contaminado 1 (Fig. 2A). Vários relatos de inibição desta enzima por diversos contaminantes são encontrados na literatura, tanto em vertebrados, como em invertebrados: em brânquias e intestino da enguia *Anguilla anguilla* expostos “in vitro” ao cádmio (Lionetto *et al.*, 1998 e Lionetto *et al.*, 2000); em brânquias do siri *Callinectes sapidus* e do caranguejo *Carcinus maenas* expostos “in vitro” ao cádmio, prata, cobre e zinco (Skaggs e Henry, 2002); no caranguejo *Chasmagnathus granulata* exposto ao cádmio em 2,5‰ “in vivo” e expostas ao cádmio, cobre e zinco “in vitro” (Vitale *et al.*, 1999); em anêmonas *Condylactis gigantea* e *Stichodactyla helianthus* expostas a várias

concentrações de cobre, vanádio, níquel e chumbo e nestas mesmas espécies de anêmonas e no coral *Monstaraea cavernosa* coletados em locais contaminados com hidrocarbonetos derivados de petróleo (Gilbert e Guzmán, 2001). Porém, não há relatos na literatura sobre o aumento de atividade da anidrase carbônica em animais expostos a contaminantes, o que poderia corroborar os dados obtidos em agosto. Apesar disso, relatos de aumento de atividade de outras enzimas, como a atividade ATPásica total (entre elas a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) são descritos na literatura como mecanismos de tolerância à exposição a contaminantes, tanto para vertebrados (McDonald e Wood, 1993; Webb *et al.*, 2001), como para invertebrados (Harris e Santos, 2000; Bianchini *et al.*, 2005, Comoglio *et al.*, in press). Tal hipótese de tolerância também poderia ser válida para a anidrase carbônica: possivelmente a maior atividade desta enzima encontradas nos animais do ponto mais afastado da fonte de contaminação (Contaminado 2) frente ao ponto relativamente mais próximo de fontes de contaminantes (Contaminado 1) e ao ponto Referência é decorrente da tolerância. Neste caso, os animais de ambos os pontos contaminados teriam desenvolvido igualmente mecanismos de tolerância à exposição a contaminantes, mas para os animais do Contaminado 1 os níveis de contaminantes teriam excedido aos que deram origem à tolerância, gerando então inibição da anidrase carbônica. Essa inibição, contudo, não foi forte o suficiente para ser significativa quando comparada com as ostras do ponto Referência. Como a tolerância, uma vez desenvolvida, não muda com o aumento da concentração de contaminantes (McDonald e Wood, 1993), o que estaria ocorrendo no ponto Contaminado 1 é uma resposta de tendência à inibição enzimática pós-tolerância, ou seja, que os mecanismos compensatórios desenvolvidos não estariam sendo suficientes para contornar as interações entre os contaminantes e as enzimas estudadas.

A sazonalidade afetou as enzimas estudadas, pois na comparação entre as duas épocas foi observada diferença na anidrase carbônica para os animais do ponto Referência, mostrando maior atividade para os organismos deste ponto coletados em fevereiro (Fig. 2A). Tal variação pode ser devida, principalmente, à variação de salinidade do ponto Referência, pois os outros parâmetros analisados, temperatura e pH, não diferiram muito entre as épocas sazonais para este ponto, como mostrado na Tabela 1. A salinidade, relativamente menor, encontrada para todos os pontos durante fevereiro, é decorrente da diluição da água estuarina devido à maior precipitação de chuvas durante esta época (CEPTEC on-line).

A relação da salinidade com atividades enzimáticas é citada na literatura em estudos com siris e peixes eurialinos. Em siris *Callinectes sapidus*, foi observado que a anidrase carbônica responde de forma inversamente proporcional à salinidade: quanto maior a salinidade, menor a atividade desta enzima (Henry, 2001), exatamente como o observado neste trabalho para as ostras. Esta mesma espécie de siri, quando aclimatada a várias diluições da água do mar mostrou diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial acompanhando a redução de salinidade (Neufeld *et al.*, 1980), resposta semelhante à dos peixes eurialinos que, ao serem expostos à salinidade reduzida, ou mesmo em exposição à água doce, podem ter uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial pela diminuição das CC (Venturini *et al.*, 1992). Quando expostos a maiores salinidades em longo prazo, peixes eurialinos podem responder ao aumento da mesma com o aumento no número de células de cloreto branquiais (CC) e aumento da atividade de sua  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para excreção de íons (Venturini *et al.*, 1992; Jobling, 1995; McCormick, 1995), mostrando, dessa forma, uma relação diretamente proporcional entre a salinidade e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Cabe ressaltar que estes estudos que relacionam a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase com salinidade expõem os animais normalmente por longo prazo a uma dada salinidade, ou seja, não envolvem protocolos experimentais de flutuação rápida de salinidade como em estudo de campo de um ambiente estuarino, como neste trabalho. Portanto, tais estudos podem servir como base, mas não refletem necessariamente o que ocorre com a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e da anidrase carbônica em animais de um ambiente estuarino.

Resposta diferenciada entre as épocas sazonais também foi observada na atividade da anidrase carbônica para as ostras do ponto Contaminado 2, sendo que as coletadas em fevereiro apresentaram menor atividade desta enzima frente àquelas de agosto (Fig. 2A). Tal efeito pode ser tanto decorrente da variação de salinidade (Tabela 1), como da diferença de biodisponibilidade de contaminantes entre as diferentes épocas, a qual poderia acarretar em uma maior absorção e bioacumulação de contaminantes (Fent, 1996) e esta, modificar a atividade de enzimas em agosto. Contudo, é possível que o resultado encontrado para as ostras do Contaminado 2 seja devido à soma de efeitos da variação salinidade e da biodisponibilidade diferenciada entre as épocas. Apesar desta possível soma de efeitos, quando avaliada a concentração de mercúrio em *C. rhizophorae* durante as épocas de chuva e de seca no Canal de Santa Cruz, não houve variação na acumulação de Hg nas ostras (Meyer *et al.*, 1998). Com relação ao Hg, o contaminante considerado mais abundante na região analisada em PE devido à atuação de fábricas de soda cáustica (Meyer *et al.*, 1998), a literatura cita que este é um contaminante que causa patologias em brânquias, interferindo na osmorregulação de peixes e causando inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Jagoe *et al.*, 1996). Estes autores mencionam também que foi encontrada uma correlação entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a concentração de Hg em *Platichthyes flesus* expostos a concentrações realísticas de Hg em estuário (Stagg *et al.*, 1992 *apud*

Jagoe *et al.*, 1996). Relato de perturbação na capacidade osmorregulatória também é descrito para o caranguejo *Eriocheir sinensis* (Péqueux *et al.*, 1996). Estes autores descrevem que 0,1 ppm de Hg afeta diretamente a permeabilidade de membranas epiteliais para  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nesta espécie e que o transporte ativo destes íons também é comprometido pelo Hg, possivelmente por inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A partir destes efeitos sobre processos osmorregulatórios e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, acredita-se que os efeitos encontrados sobre a anidrase carbônica branquial de ostras da região de PE também podem ser vinculados à contaminação por mercúrio.

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, percebe-se que tanto em agosto (período de seca), quanto em fevereiro (período de chuvas) para a região analisada em PE, os contaminantes presentes nos pontos contaminados estão influenciando a atividade da anidrase carbônica. A atividade ATPásica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não se mostraram bons biomarcadores, possivelmente devido ao método utilizado para a verificação de atividade destas enzimas, mas um outro método mais sensível, poderia vir a confirmá-las como um bons biomarcadores em brânquias de ostras da região. Acredita-se que, dentre as duas épocas de coletas realizadas, fevereiro seja a mais impactada por contaminantes na região de PE, pois, nesta época foi observada inibição da anidrase carbônica para os animais do ponto mais próximo de fontes de contaminantes, Contaminado 1. As chuvas mais frequentes nesta época podem carregar agrotóxicos de áreas de lavoura e esgotos para as baías, além de aumentarem o aporte de água continental para os estuários causando maior turbulência nos sistemas e, por consequência, revolverem sedimentos (Bahena-Manjarrez *et al.*, 2002) e contaminantes superficialmente já sedimentados.

### I.5.2. Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim-ES

Para a região de ES, foram verificadas diferenças nas três enzimas estudadas. A atividade ATPásica total foi maior apenas para as ostras coletadas em fevereiro no ponto Contaminado 2, enquanto que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi menor nas ostras coletadas em agosto (Tabela 2). Para peixes, o aumento de síntese de ATPases é considerada uma das respostas mais comuns à exposição subletal crônica a metais (McDonald e Wood, 1993). Estes autores citam vários trabalhos nos quais foi observado maior síntese de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em peixes de água doce após exposição a metais. Citam também trabalhos que sugerem que estas respostas podem ser devidas à proliferação celular (hipertrofia ou hiperplasia) de células de cloreto do epitélio branquial (CC). Para invertebrados, aumento da atividade ATPásica total e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase branquial ocorreram no camarão *Litopenaeus vannamei* expostos a 0,62 e 1,31  $\mu\text{g}$  de metil paration por via trófica, enquanto que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não foi responsiva a este pesticida (Comoglio *et al.*, in press), o que sugere que a  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase seja mais sensível que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para esta espécie de camarão. Por outro lado, aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi descrito em tecido muscular do ouriço-do-mar *Diadema antillarum* exposto por 48h a 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Ag}/\text{l}$ , sugerindo que tal resposta seja um efeito compensatório à exposição à prata (Bianchini *et al.*, 2005). Resposta similar foi encontrada em brânquias de siris *Callinectes danae* de uma área contaminada quando comparada com uma área referência, na região estuarina de Santos, SP. Neste caso, foi sugerido que a maior atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase possa ser uma resposta adaptativa de *C. danae* para conferir “resistência” de mecanismos iono-regulatórios a elevadas concentrações de metais pesados no meio poluído, ou ainda, que haja ligação diferenciada da ouabaína no sítio de ligação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de *C. danae* de áreas poluídas e não poluídas (Harris e Santos, 2000).

As hipóteses mencionadas acima para *D. antillarum*, *C. danae* e também as referentes ao desenvolvimento de adaptações e tolerância para os peixes eurialinos, poderiam também ser válidas para as ostras *C. rhizophorae*, pois, uma vez que são organismos sésseis após o assentamento larval, as populações desta espécie nas áreas contaminadas devem estar expostas aos contaminantes de forma crônica. Isto poderia gerar respostas adaptativas com desenvolvimento de tolerância e sobrevivência à contaminação do ambiente, o que justificaria a resposta de maior atividade ATPásica total em brânquia de *C. rhizophorae* coletadas em fevereiro.

Apesar da literatura mostrar, dentre as ATPases, geralmente relato de aumento de atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase como mecanismo de tolerância, os resultados obtidos neste trabalho para a região de ES não o corroboram. Neste caso, houve aumento na atividade ATPásica total para os animais dos pontos contaminados coletados em fevereiro, mas os dados da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não diferiram entre os grupos nesta época, sugerindo que outras ATPases estejam com suas atividades aumentadas, como o encontrado por Comoglio *et al.*, (in press). Por outro lado, o método utilizado na determinação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pareceu menos sensível para os animais de fevereiro, o que acarretou em um número bastante reduzido de animais amostrados com atividade desta enzima. Em outras palavras, essa sub-amostragem pode estar mascarando uma resposta de efeito de contaminantes sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nesta época do ano.

A menor atividade observada para a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial das ostras coletadas em agosto (Tabela 2) é corroborada por vários autores, os quais descrevem a inibição desta enzima por diversos tipos de contaminantes em vertebrados - como TBT (Pinkney *et al.*, 1989), mercúrio (Jagoe *et al.*, 1996), prata (Grosell *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2001), chumbo (Rogers *et al.*, 2003) - e invertebrados, como DDT (Neufeld e Pritchard, 1979) e prata (Bianchini *et al.*, 2005).

Embora tenha sido utilizado para a atividade ATPásica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase das ostras desta região o mesmo método descrito para as análises em PE, o qual foi considerado pouco sensível para as ostras daquela região, os resultados encontrados para ES representam um indicativo de efeito dos contaminantes sobre tais organismos. Possivelmente, por um método mais sensível, as diferenças nas atividades destas enzimas seriam ainda mais evidentes. Como já mencionado acima, as ostras desta região coletadas em fevereiro apresentaram um baixo número de amostras com atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial. Essa resposta foi semelhante à observada para as ostras de PE, região na qual um baixíssimo número de amostras com atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial foi obtida para os organismos coletados em fevereiro, sendo inclusive, desconsiderada como resultado. Não se sabe por que apenas em fevereiro houve essa menor sensibilidade para a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em ambas as regiões. Como já citado, em ambientes com menor salinidade, como em fevereiro em ambas as regiões (Tabela 1), geralmente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é menor (Neufeld *et al.*, 1980, Venturini *et al.*, 1992). Possivelmente, o método utilizado torna-se menos responsivo quando a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é reduzida, o que justificaria essa menor sensibilidade do mesmo para as ostras coletadas em fevereiro em ambas as regiões, PE e ES.

Para a anidrase carbônica foi observada menor atividade desta enzima nas ostras do ponto Contaminado 2 de ES coletadas em fevereiro (Fig. 2B). Como já levantado para a região de PE, vários são os relatos de inibição desta enzima por contaminantes (Lionetto *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1999; Lionetto *et al.*, 2000; Gilbert e Guzmán, 2001; Skaggs e Henry, 2002), o que corrobora o resultado encontrado aqui. Para os animais coletados em agosto foi observada diferença entre os grupos contaminados, sendo que as ostras do ponto Contaminado 2 apresentaram menor atividade da anidrase carbônica que aquelas do ponto Contaminado 1. Tais dados

demonstram que há diferença de contaminação entre os pontos, mas como ambos os grupos não diferem do grupo Referência, não é possível afirmar que mecanismos de tolerância estejam realmente ocorrendo para os animais do ponto Contaminado 1, assim como não é possível afirmar que inibição pós-tolerância esteja ocorrendo para as ostras do Contaminado 2.

Diferenças sazonais também foram encontradas para as atividades enzimáticas das ostras coletadas no ES, sendo que houve redução na atividade ATPásica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e aumento na atividade da anidrase carbônica das ostras coletadas em fevereiro no ponto Referência. A Tabela 1 mostra que os dados de salinidade, temperatura e pH diferiram para ES entre as épocas estudadas, inclusive no ponto Referência. Como já mencionado para a região de PE, seção 1.5.1, vários estudos relacionam a atividade das enzimas estudadas por este trabalho com variações de salinidade. Assim, as ostras coletadas no ponto Referência de ES mostraram o mesmo padrão de resposta geralmente relatada pela literatura: a atividade ATPásica total e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase relacionaram-se de forma diretamente proporcional com a salinidade, enquanto que a anidrase carbônica apresentou relação inversamente proporcional à mesma.

Certamente as diferenças encontradas nos fatores abióticos entre as duas épocas de coleta também influenciaram as respostas das ostras dos pontos contaminados, principalmente para o ponto Contaminado 1 para o qual foi observada redução na atividade ATPásica total (Tabela 2) e da anidrase carbônica (Fig. 2B) para as ostras coletadas em fevereiro/04 em comparação com aquelas coletadas em agosto/03. Como já explicitado para PE, as respostas obtidas nos pontos contaminados devem ir além dos efeitos destes fatores sobre a fisiologia das ostras. Em ambientes contaminados, fatores ambientais incluindo temperatura, pH e composição iônica da água são variáveis importantes que influenciam a biodisponibilidade dos contaminantes

(Fent, 1996). Assim, acredita-se que tenha ocorrido interação de fatores abióticos com a biodisponibilidade de contaminantes, possivelmente ocasionando uma maior bioacumulação e consequentemente, maior susceptibilidade das ostras coletadas em fevereiro para os biomarcadores aqui tratados. Segundo Fent (1996), compostos orgânicos clorados como o DDT e PCBs (bifenilas policloradas) têm alto potencial para a bioacumulação, alta solubilidade, rápida absorção, baixo metabolismo e eliminação pelos organismos. Contaminantes organoclorados como os mencionados acima e os semelhantes a dioxinas podem ocorrer na região de ES, visto que podem ser resíduos de agrotóxicos ou da fabricação de papel (IDEC on-line). Além disso, durante o verão há maior precipitação de chuvas para esta região (CEPTEC on-line), o que torna válida a mesma hipótese levantada para PE: maior carreamento de resíduos de fábricas de papel e agrotóxicos pelo maior aporte de água continental no estuário. Além disso, um maior trânsito de embarcações e maior aporte de dejetos orgânicos podem ocorrer nesta região devido à época de veraneio, aumentando ainda mais a contaminação do meio.

Com relação aos valores de pH, os dados de fevereiro foram altíssimos e é difícil acreditar que as ostras consigam sobreviver em um ambiente tão básico. Possivelmente, algum erro de medição deve ter ocorrido. Porém, supondo que as ostras consigam sobreviver em um ambiente tão hostil, certamente mecanismos de tolerância a este ambiente deveriam estar ativados e parte da energia metabólica seria gasta na tolerância a estes ambientes, o que poderia reduzir a energia disponível para os mecanismos de tolerância à contaminação, gerando assim, maior susceptibilidade dos animais aos contaminantes destes ambientes.

## I.6. Conclusão

Pelas respostas obtidas sugere-se que as enzimas estudadas responderam à contaminação de duas formas em ambas as regiões estudadas: (1) com maior atividade enzimática nas brânquias de *Crassostrea rhizophorae*, o que sugere desenvolvimento de tolerância, com maior síntese protéica para a formação das enzimas estudadas para compensar as inibições por contaminantes e (2) com menor atividade enzimática para *C. rhizophorae* dos pontos contaminados. A tolerância desenvolvida é uma das primeiras respostas a ocorrer e, se a contaminação ambiental aumenta, o organismo não consegue mais tolerar, ocorrendo então a inibição enzimática. Partindo-se desta teoria, tanto para os pontos estudados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz-PE, como no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim-ES, fevereiro foi a época mais impactada, pois houve, para ambas as regiões, menor atividade da anidrase carbônica neste período para pontos contaminados. Para PE, o ponto Contaminado 1 mostrou ser o mais impactado, enquanto que para ES, o ponto Contaminado 2 foi o que mostrou maior susceptibilidade das ostras. Tais afirmações são baseadas na atividade da anidrase carbônica branquial das ostras, pois em ambas as regiões estudadas, esta enzima mostrou ser um bom biomarcador, bastante responsivo aos contaminantes. Com relação aos outros biomarcadores estudados, apenas em ES foi possível distinguir respostas de atividade ATPásica total e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, possivelmente pelo método empregado para a determinação destas enzimas não ser o mais adequado para ostras. A maior contaminação no mês de fevereiro das regiões estudadas em PE e ES, sugerida pelas respostas da anidrase carbônica branquial, são corroboráveis pela maior incidência de chuvas nesta época de coleta. A maior precipitação de chuvas pode carregar resíduos de contaminantes para o estuário e revolver contaminantes já sedimentados. Este é o primeiro trabalho utilizando a atividade ATPásica total, a

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e a anidrase carbônica como biomarcadores para avaliação de impacto de contaminantes em ostras. Através deste trabalho, sugere-se o uso da anidrase carbônica como biomarcador para estudos de biomonitoramento por vários motivos: 1) foi um biomarcador bastante responsivo para ostras; 2) sua atividade indica perturbação em processos de regulação iônica ou de regulação ácido básica, sendo uma enzima importante em todos os grupos animais e; 3) a determinação de sua atividade é rápida, simples e de baixo custo.

## Capítulo II.

### A Osmorregulação como Biomarcador do Impacto de Contaminantes em *Crassostrea rhizophorae* e *Cathorops spixii* na Baía de Paranaguá-PR<sup>2</sup>.

#### Resumo

O Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paraná, é impactado por despejos de esgoto urbano, atividades industriais e portuárias e possivelmente por pesticidas provenientes de áreas agrícolas da região. Com o objetivo de se verificar as respostas osmorregulatórias frente à contaminação nesta região estuarina, a ostra *Crassostrea rhizophorae* e o bagre *Cathorops spixii* foram utilizados como bioindicadores. Foram escolhidos três pontos de coleta em cada uma das regiões: um próximo a fontes de contaminação industriais e portuárias (C1), um próximo de despejos de esgotos (C2) e um mais afastado, considerado menos contaminado (Referência). As ostras foram coletadas nestes três pontos em duas épocas do ano: agosto/03 (inverno) e fevereiro/04 (verão), ao passo que os bagres foram coletados apenas nos pontos C1 e Referência em abril/03 (outono), agosto/03 e fevereiro/04. Foram avaliadas, em ambas as espécies, as atividades enzimáticas ATPásica total, da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e da anidrase carbônica (AC) branquial, bem como, a osmolalidade e as concentrações iônicas hemolinfáticas e plasmáticas de Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Os resultados obtidos sugerem dois tipos de respostas das enzimas estudadas para ambas as espécies: 1) menor atividade para animais dos pontos contaminados, o que sugere efeito de contaminantes sobre as enzimas ou, 2) maior atividade enzimática para os organismos dos pontos contaminados, o que é citado pela literatura como sendo um mecanismo de tolerância a contaminantes. As ostras do ponto C2 apresentaram a resposta do tipo 2 para a atividade ATPásica total em agosto e AC em agosto e fevereiro. Os bagres também apresentaram a resposta do tipo 2 para a atividade ATPásica total de indivíduos de abril e fevereiro e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase para aqueles coletados em fevereiro; apresentaram ainda a resposta do tipo 1 para AC nos animais de abril. A contaminação do ambiente levou a aumento na osmolalidade e redução na [Mg<sup>2+</sup>] da hemolinfa das ostras coletadas em agosto. Para os bagres, aumento na osmolalidade e alterações nas concentrações plasmáticas de todos os íons foram evidentes, principalmente para os animais coletados em agosto. Sugere-se, pelos resultados obtidos, que agosto/03 (período de inverno) foi a época de maior impacto da contaminação sobre processos osmorregulatórios em ambas as espécies, o que pode refletir uma maior biodisponibilidade de contaminantes nesta época. A AC foi bastante responsiva aos contaminantes, assim como, os níveis extracelulares de Mg<sup>2+</sup>, em ambas as espécies.

---

<sup>2</sup> Este trabalho foi formatado segundo as regras para publicação da Revista Aquatic Toxicology. As figuras e tabelas, porém, estão inseridas no texto para facilitar suas análises.

## Abstract

The estuarine complex of Paranaguá Bay, located next to the city of Paranaguá, State of Paraná (PR), is highly impacted by domestic sewage, runoffs of industrial and harbour activities, and also possibly by agricultural activities. Enzymes linked to the function of osmoregulation and extracellular fluid osmo-ionic concentrations were studied in the resident oyster *Crassostrea rhizophorae* and the catfish *Cathorops spixii*. Three collection sites were chosen for the oysters: one next to harbour and industrial pollution sources (C1), one next to domestic sewage runoffs (C2), and a third one considered devoid of significant pollution, considered the "Reference". Oysters were collected from these 3 sites 2 times, once in August 2003 (winter), and once in February 2004 (summer). Catfish, due to their mobility, were collected only from C1 and Reference in April 2003 (autumn), and also in August 2003 and February 2004. The function of osmoregulation as biomarker was assessed through the following parameters: oyster and fish branchial total ATPase, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Carbonic Anhydrase (CA) activities, and additionally osmolality, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations in hemolymph and plasma. The results obtained suggest 2 types of responses of the enzymes studied. The first type was of lower activities in the polluted sites, suggesting enzyme inhibition, in agreement with the literature. The second type of response was of higher activity in the contaminated sites. The literature refers to this response as indicative of mechanisms of resistance/tolerance developed after exposure to pollution. Oysters from C2 displayed increased activities of total ATPase in August and CA in both seasons. Catfish also displayed enhancement of activity for total ATPase activity in April and February, and of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in February; there was also CA inhibition in April. Estuary contamination led to increases in hemolymph osmolality and reduced [Mg<sup>2+</sup>] in oysters in winter. In catfish there was increased osmolality and alterations in all ions measured, mainly in August. Winter season (August 2003) was the time of higher osmoregulatory impact of pollution on the chosen bioindicators, possibly due to higher availability of pollutants. Branchial CA activity and extracellular levels of magnesium ion seemed to be especially sensitive to contamination, for both bioindicators.

## II.1. Introdução

O uso associado de vários biomarcadores e de diferentes bioindicadores em estudos de avaliação de áreas contaminadas, pode fornecer respostas mais completas sobre a saúde do ambiente e sugerir mecanismos de tolerância similares para organismos de uma mesma região. Neste trabalho foram usadas duas espécies de bioindicadores para avaliar áreas contaminadas do Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá, PR: *Crassostrea rhizophorae*, ostra filtradora (já descrita Capítulo I, seção I.1) e o bagre *Cathorops spixii* (Ariidae), que habita regiões costeiras e se alimenta principalmente de invertebrados e pequenos peixes (FishBase on line). Biomarcadores bioquímicos e fisiológicos foram analisados para ambas as espécies na tentativa de se compreender o possível papel de mecanismos osmorregulatórios como biomarcadores inespecíficos a contaminantes.

O Complexo Estuarino Baía de Paranaguá (25°16'34"S; 48°17'42"W) é o maior estuário do Paraná, estendendo-se cerca de 50 km para o interior do continente (Kolm *et al.*, 2002). Às margens deste estuário localiza-se a cidade de Paranaguá, cuja população é estimada em mais de 140.000 pessoas (IBGE on-line). Kolm *et al.* (2002), citam que a região ainda não possui tratamento de esgotos adequado, sendo a maior parte do esgoto urbano lançado em dois rios da região: Itiberê e Emboguaçú. Além do esgoto da cidade, ainda há áreas de atividades agropecuárias na região que possivelmente contribuem com dejetos e restos de pesticidas para os rios. Atividades industriais e portuárias também são importantíssimas na região e certamente contribuem para a poluição das águas do estuário, pois geram resíduos industriais, de combustíveis devido ao fluxo de navios e de carregamento e descarregamento de mercadorias, incluindo fertilizantes e derivados de petróleo. Vale ressaltar que o Porto de Paranaguá é considerado o maior porto do Sul do Brasil e se destaca no cenário

brasileiro e da América Latina por exportação de granéis sólidos, principalmente de soja. Em 2002 e 2003, boa parte das exportações do Porto de Paranaguá foi referente a granéis, enquanto suas principais importações foram fertilizantes, com mais de 60% em ambos os anos (APPA on-line).

A partir das informações acima, pode-se afirmar que o Complexo Estuarino Baía de Paranaguá possui áreas impactadas por atividades antropogênicas. Assim, torna-se relevante realizar a avaliação de algumas destas áreas para verificar se o nível de contaminação nas mesmas está afetando a saúde de espécies animais de diferentes hábitos alimentares.

Este trabalho teve por objetivo, avaliar, em duas épocas do ano, uma região contaminada por atividades humanas no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá-PR, através de estudos de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos, utilizando *Crassostrea rhizophorae* e *Cathorops spixii*, como bioindicadores.

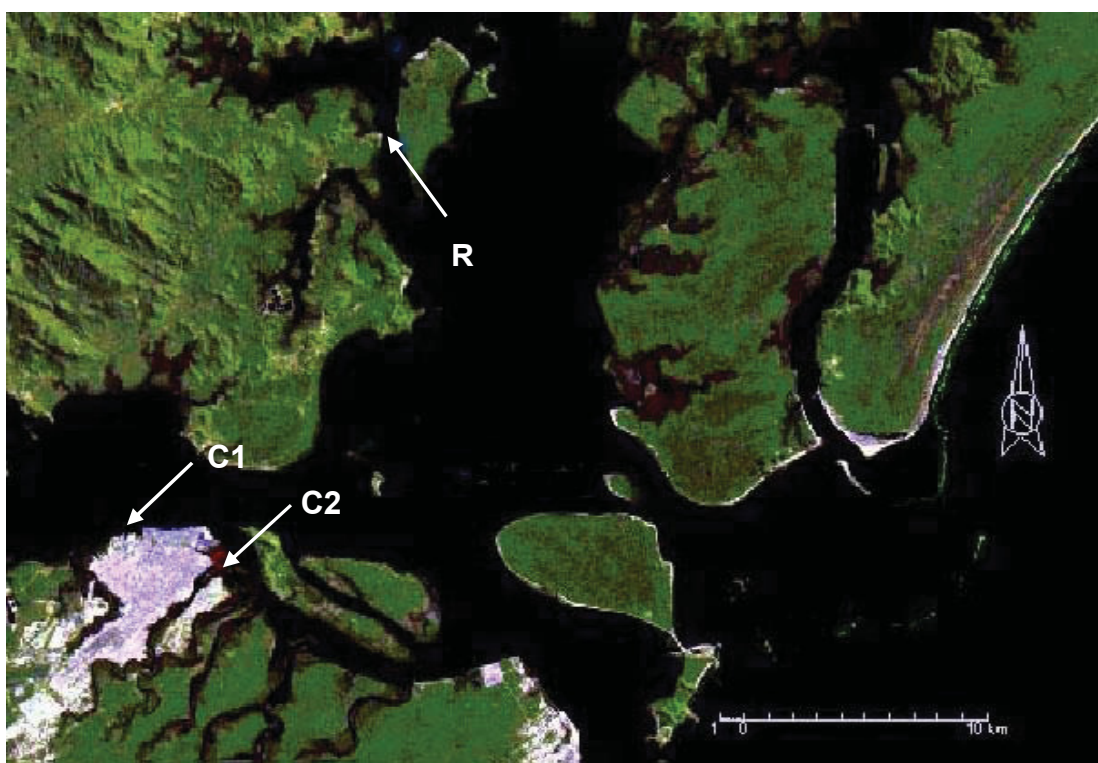


Fig. 3- Região de coleta no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá, PR e os pontos amostrados durante duas coletas anuais para cada biomarcador. Os pontos de coleta estão representados por C1 (Contaminado 1), C2 (Contaminado 2) e R (Referência).

## **II.2. Material e Métodos**

### **II.2.1. Áreas de Estudo**

Neste trabalho foram escolhidas duas áreas bastante contaminadas e uma terceira, considerada menos contaminada, dentro do Complexo Estuarino Baía de Paranaguá. Os pontos mais contaminados foram escolhidos em áreas com histórico diferente de contaminação: o ponto Contaminado 1 (25°19'430" S; 48°29'690" W) situa-se na região próxima ao terminal de carga/descarga portuária de fertilizantes de Paranaguá (Fospar), região esta que sofre contaminação por receber o despejo de esgotos urbanos, atividades industriais, resíduos de combustíveis devido ao intenso tráfego de navios e resíduos de mercadorias carregadas/descarregadas no Porto de Paranaguá. O outro ponto contaminado, Contaminado 2 (25°21'050" S; 48°25'97" W), foi escolhido em uma região próxima à desembocadura do rio Itiberê (rio que recebe a maior parte do esgoto da cidade de Paranaguá e que possivelmente recebe restos de pesticidas carregados de lavouras da região). Dentro da Baía de Laranjeiras foi definido um ponto como Referência, por esta área ser menos impactada por contaminantes em geral (25°31'271" S; 48°29'690" W; Fig. 3).

### **II.2.2. Coleta dos animais**

As ostras foram coletadas nos três pontos supra-citados em duas épocas: agosto de 2003 (período de inverno) e fevereiro de 2004 (período de verão). Para estas, foi seguido o mesmo protocolo de coleta descrito em I.2.2. Os bagres foram coletados apenas no ponto Contaminado 1 e no ponto Referência, pois a coleta destes animais no ponto Contaminado 2 não foi bem sucedida. Os bagres também foram coletados em duas épocas: para biomarcadores bioquímicos (atividades enzimáticas), foi realizada uma coleta em abril de 2003 (período de outono) e outra em fevereiro de 2004 (período de verão); enquanto que, para os biomarcadores fisiológicos

(osmolalidade e concentrações iônicas), foi realizada uma coleta em agosto de 2003 (inverno) e outra em fevereiro 2004 (verão). Desta última foram utilizados os mesmos indivíduos para ambos os tipos de biomarcadores analisados. Para a coleta dos bagres foi utilizada rede de arrasto de porta, com o arrasto sendo realizado durante 5 minutos. As coletas foram realizadas durante o dia, em marés vazantes de quadratura e foram feitas na margem estuarina, a uma profundidade pouco variável (1,5 a 2,5 m) e em fundos lamosos ou areno-lamosos.

### **II.2.3. Coleta de amostras em laboratório**

Exatamente o mesmo protocolo descrito em I.2.3 foi utilizado para as ostras, porém, antes de tecidos branquiais serem coletados, a hemolinfa foi retirada. A coleta de hemolinfa deu-se por punção do seio hemolinfático do músculo adutor com agulha e seringa descartável, obtendo-se uma amostra de, pelo menos, 0,2 ml de hemolinfa. As amostras foram transportadas em gelo seco até o laboratório em Curitiba, onde cada amostra foi centrifugada a 2000 x g por 5 min e o “soro” obtido foi guardado em tubos Eppendorf e congelado em freezer a -20°C até a análise da osmolalidade e dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Para os bagres, foi utilizada benzocaína (50 mg/ml diluída em água) para a anestesia. Logo após este procedimento, foi coletada uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml de sangue por punção da veia caudal ou do coração com agulhas e seringas heparinizadas. A amostra de sangue foi centrifugada a 2000 x g, por 5 min e o plasma obtido foi colocado em tubos Eppendorf, congelado e transportado em gelo seco até Curitiba, onde foi congelado em freezer comum e armazenado até as análises de osmolalidade e íons (mesmas já citadas para as ostras). Após a coleta de sangue, 3 arcos branquiais do lado esquerdo do corpo dos bagres foram retirados para a determinação de atividades enzimáticas neste tecido. As

amostras foram acondicionadas para transporte, transportadas e armazenadas até sua análise de forma idêntica ao descrito para as ostras em I.2.3.

#### **II.2.4. Análise das amostras**

Para as análises enzimáticas de ambos os bioindicadores, os mesmos métodos já tratados no Capítulo I foram utilizados. Neste, são feitas referências ao Capítulo I nas diversas etapas do processamento das amostras.

##### **II.2.4.1. Homogeneização das amostras**

A homogeneização das amostras de brânquias de ostras e bagres foi realizada segundo método já estabelecido em I.2.4.1.

##### **II.2.4.2. Atividade ATPásica Total e da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

O método utilizado para as ostras é exatamente o mesmo descrito na seção I.2.4.2.

Para os bagres, as amostras do sobrenadante branquial foram incubadas também em duas soluções, sendo a SOLUÇÃO 1 idêntica à já descrita para ostras e a SOLUÇÃO 2 idêntica à SOLUÇÃO 1 mais 2mM de ouabaína (sem a substituição do KCl por NaCl como descrito para a SOLUÇÃO 2 das ostras).

##### **II.2.4.3. Anidrase Carbônica**

O mesmo método descrito em I.2.4.3 foi utilizado para ostras e bagres.

##### **II.2.4.4. Quantificação de Proteínas**

O mesmo método descrito em I.2.4.4 foi utilizado para ambas as espécies.

#### II.2.4.5. Osmolalidade

A osmolalidade das amostras de hemolinfa e plasma sanguíneo foi determinada no micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor 5520 VAPRO. Os valores de osmolalidade da água foram estimados utilizando-se do trabalho de Prosser (1973). Neste trabalho, Prosser relaciona com a água marinha (34,33‰) os valores da sua osmolalidade e concentrações iônicas. A partir de uma regra de três com os valores fornecidos por Prosser e a salinidade do local de coleta, é possível estimar a osmolalidade e concentrações iônicas desta última.

#### II.2.4.6. Dosagens iônicas

As dosagens dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram realizadas em duplicata com a utilização de fotômetro de chama DM 61 – Digimed do Departamento de Química da UFPR logo após a diluição das amostras (ostras=  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ : 1:2000; bagres=  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ : 1:1000). As concentrações dos íons  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foram realizadas por método colorimétrico (kits Labtest®), com leitura de absorbância no espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, também logo após diluição das amostras (ostras=  $\text{Cl}^-$ : 1:5;  $\text{Mg}^{2+}$ : 1:50 e  $\text{Ca}^{2+}$ : 1:5; bagres=  $\text{Cl}^-$ : 1:3;  $\text{Mg}^{2+}$ : 1:10 e  $\text{Ca}^{2+}$ : 1:3). Os íons cloreto reagem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico, com leitura de absorbância a 470 nm. Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, com leitura de absorbância a 505 nm. Os íons cálcio formam um complexo corado com cresoltaleína em meio alcalino, com leitura de absorbância a 570 nm. Os valores dos íons analisados para a água estuarina foram obtidos por aproximação segundo os valores fornecidos por Prosser (1973) para a água marinha (34,33‰), conforme já explicado no item II.2.4.5.

### II.3. Análise Estatística

Foi utilizada análise de variância (anova) de duas vias seguida de teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), tanto para as comparações dos parâmetros bioquímicos, como para os parâmetros fisiológicos de ostras e bagres. Para os dados não-normais ou sem igualdade de variâncias para a anova de 2-vias, mas atendendo a estes requisitos para a anova de uma via, esta última foi aplicada seguida de teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Neste caso, a comparação dos grupos em épocas sazonais diferentes deu-se por teste “t” de Student não-pareado ( $\alpha=0,05$ ) ou teste de Mann-Whitney Rank Sum, se não paramétricos. Quando dados referentes a apenas uma das épocas de coleta estiveram disponíveis também foi utilizada anova de uma via seguida de teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Com exceção da anova de duas vias, todos os testes são representados nos resultados de uma forma abreviada: 1-anova para a anova de uma via seguida de teste de Tukey; teste “t” para o teste “t” de Student não-pareado; MW para o teste de Mann-Whitney Rank Sum. Para a determinação de diferenças entre os parâmetros fisiológicos e o valor estimado para a água estuarina, foi utilizado a média±intervalo de confiança de 95% dos valores, uma vez que os valores para água do estuário eram únicos (sem média).

As análises estatísticas, assim como médias, erros padrão das médias e intervalos de confiança foram obtidos através do Programa Estatístico Sigma Stat<sup>®</sup> para Windows<sup>®</sup> 2.0 da Jandel Corporation.

## II.4. Resultados

A Tabela 3 apresenta alguns parâmetros abióticos da água dos pontos de coleta das ostras e bagres da região do PR, os quais serão utilizados para a discussão dos resultados dos biomarcadores bioquímicos e fisiológicos.

**Tabela 3** – Parâmetros abióticos da água em abril e agosto (2003) e fevereiro (2004) nos pontos de coleta no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paranaguá, PR\*

Parâmetro	Ponto de Coleta	Abril/03	Agosto/03	Fevereiro/04
Salinidade (‰)	Contaminado 1	25,0	27,0	24,0
	Contaminado 2	NA	28,0	20,3
	Referência	26,0	25,0	20,9
Temperatura (°C)	Contaminado 1	26,2	20,0	27,0
	Contaminado 2	NA	21,0	28,5
	Referência	26,2	20,5	27,8
pH	Contaminado 1	8,02	7,98	8,15
	Contaminado 2	NA	7,90	7,83
	Referência	7,87	7,87	8,23

\*- dados pertencentes ao Projeto Institutos do Milênio-RECOS, coletados pela equipe do Laboratório de Biogeoquímica Marinha da UFPR.

NA= dados não avaliados.

### II.4.1. Atividades enzimáticas em brânquias de ostras *C. rhizophorae*

#### II.4.1.1. Atividade ATPásica Total

Em apenas uma situação houve diferença significativa na atividade ATPásica total de ostras: os animais do ponto Contaminado 2 coletados em agosto apresentaram maior atividade ATPásica total em relação àqueles do ponto Referência. Referência=  $3,84 \pm 0,51$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=11) e Contaminado 2=  $7,48 \pm 0,49$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=12, p=0,001, Tabela 4). Para os animais coletados em fevereiro, não se

observou qualquer diferença na atividade ATPásica total das ostras dos três pontos estudados, assim como não foram encontradas diferenças sazonais na atividade desta enzima entre os grupos.

#### **II.4.1.2. Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

Não foram encontradas variações entre as ostras dos três pontos, tanto quando comparados os grupos de agosto, como quando comparados os de fevereiro. Na comparação entre as duas épocas de coleta, os animais do ponto Contaminado 2 coletados em fevereiro apresentaram redução na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em quase 4 vezes o valor médio para este grupo da coleta de agosto. Contaminado 2-agosto= 0,31±0,04 μmols Pi/mg proteína/h (n=8) e Contaminado 2-fevereiro=0,08±0,01 μmols Pi/mg proteína/h (n=4, Tabela 4).

#### **II.4.1.3. Atividade da Anidrase Carbônica**

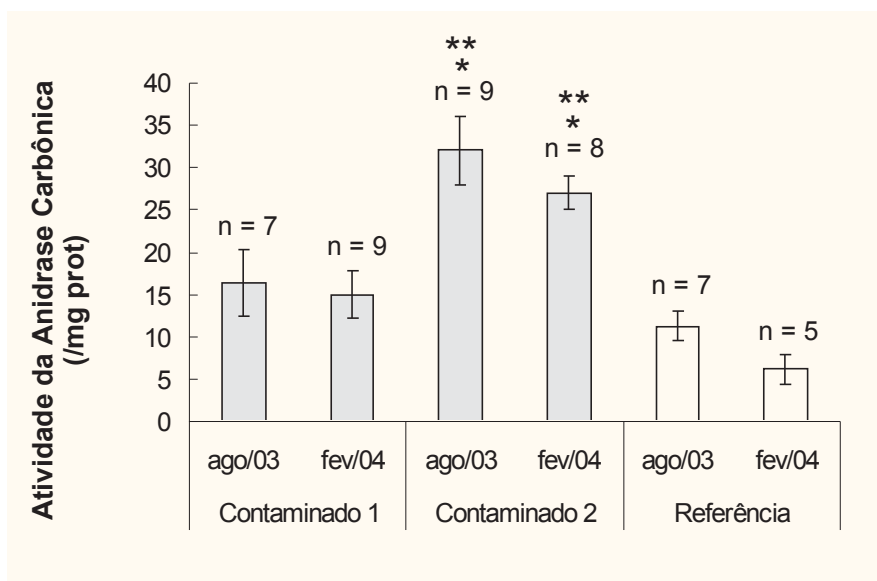
Foi evidenciada maior atividade da anidrase carbônica branquial para as ostras do ponto Contaminado 2 quando comparadas com as do ponto Referência e do ponto Contaminado 1, em ambas as épocas de coleta. Para a coleta de agosto, as ostras do ponto Contaminado 2 apresentaram maior atividade desta enzima em cerca de 3 vezes o obtido para aquelas do ponto Referência (p<0,001) e 2 vezes para aquelas do ponto Contaminado 1 (p=0,002). Referência= 11,25±1,76 /mg proteína (n=7), Contaminado 1=16,33±3,90 /mg proteína (p=7) e Contaminado 2= 32,10±4,07 /mg proteína (n=9). Em fevereiro, relação praticamente similar ocorreu: as ostras do ponto Contaminado 2 apresentaram atividade da anidrase carbônica maior em mais de 4 vezes os atingidos por aquelas do ponto Referência (p<0,001) e 2 vezes maior que o obtido por aquelas do ponto Contaminado 1 (p=0,016). Referência= 6,19±1,75 /mg proteína (n=5),

Contaminado 1=15,01±2,75 /mg proteína (p=9) e Contaminado 2= 26,99±1,95 /mg proteína (n=8, Fig. 4). Não foram observadas diferenças sazonais.

**Tabela 4-** Atividade ATPásica total e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em brânquia da ostra *Crassostrea rhizophorae* em agosto de 2003 e fevereiro de 2004 e do bagre *Cathorops spixii* coletados em abril de 2003 e fevereiro de 2004 no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, PR<sup>‡</sup>.

Parâmetro	Ponto de Coleta	<i>C. rhizophorae</i>		<i>C. spixii</i>	
		Agosto/03	Fevereiro/04	Abril/03	Fevereiro/04
Atividade ATPásica Total ( $\mu\text{mols Pi/mg prot/h}$ )	Contaminado 1	5,78±0,85 (n=11)	6,13±0,74 (n=9)	17,64±3,47 <sup>*</sup> (n=6)	17,11±2,29 <sup>*</sup> (n=9)
	Contaminado 2	7,48±0,49 <sup>*</sup> (n=12)	6,84±0,63 (n=10)	NA	NA
	Referência	3,84±0,51 (n=11)	5,41±1,01 (n=9)	10,67±1,36 (n=7)	9,39±1,58 (n=8)
Atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase ( $\mu\text{mols Pi/mg prot/h}$ )	Contaminado 1	0,23± 0,05 (n=5)	0,15± 0,07 (n=4)	1,22± 0,23 (n=3)	1,58± 0,38 <sup>*</sup> (n=8)
	Contaminado 2	0,31± 0,05 (n=8)	0,08±0,01 <sup>#</sup> (n=4)	NA	NA
	Referência	0,21± 0,03 (n=6)	0,16± 0,07 (n=5)	0,39±0,24 (n=3)	0,65± 0,18 (n=8)

<sup>‡</sup>-Dados apresentados como média±erro padrão da média. n= número de animais amostrados. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias, Contaminado 2= ponto próximo à fontes de contaminação de esgotos urbanos e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. \*=diferença em relação à Referência em uma mesma época de coleta; \*\*=diferença em relação ao outro grupo Contaminado em uma mesma época de coleta; #=diferença em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta. NA= dados não avaliados.



**Fig. 4-** Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias, Contaminado 2= ponto próximo à fontes de contaminação de esgotos urbanos e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios±erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; \*\*= diferença significativa em relação ao outro grupo Contaminado.

#### II.4.2. Atividades enzimáticas em brânquias de bagres *C. spixii*

Inicialmente pretendia-se fazer as análises de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos dos bagres utilizando-se os mesmos indivíduos, coletados em agosto de 2003 e fevereiro de 2004, pois, desta forma, os dados de ambos os tipos de biomarcadores poderiam ser relacionados e uma análise mais apurada de processos osmorregulatórios destes animais frente a ambientes contaminados poderia ser feita. Porém, por problemas no processamento dos fragmentos branquiais coletados durante em agosto/03, amostras de brânquias de bagres coletados em abril/03, referentes a uma coleta-piloto, foram descongeladas e processadas para as análises enzimáticas, como medida mitigatória para se ter estas análises em duas coletas anuais, referentes a duas estações do ano. Cabe ressaltar que, para abril e agosto/03, as coletas de bagres e dos tecidos corporais dos mesmos foram realizadas sob condições similares, como descrito em II.2. Vale relembrar também que os bagres foram apenas coletados

no ponto Contaminado 1 e Referência, pois no ponto Contaminado 2 estes organismos não foram encontrados.

#### **II.4.2.1. Atividade ATPásica Total**

Foram encontradas maior atividade ATPásica total para os bagres do Contaminado 1 coletados nas duas épocas, abril e fevereiro. Referência-abril=  $10,67 \pm 1,36$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=7) e Contaminado 1-abril=  $17,64 \pm 3,47$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=6,  $p=0,049$ , Tabela 4). Referência-fevereiro=  $9,39 \pm 1,58$   $\mu\text{mols Pi/ml/h}$  (n=8) e Contaminado 1-fevereiro =  $17,11 \pm 2,29$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=9,  $p=0,015$ ). Na comparação entre as duas épocas de coleta, os valores parecem bastante semelhantes entre si nos respectivo pontos estudados, não evidenciando qualquer diferença (Tabela 4).

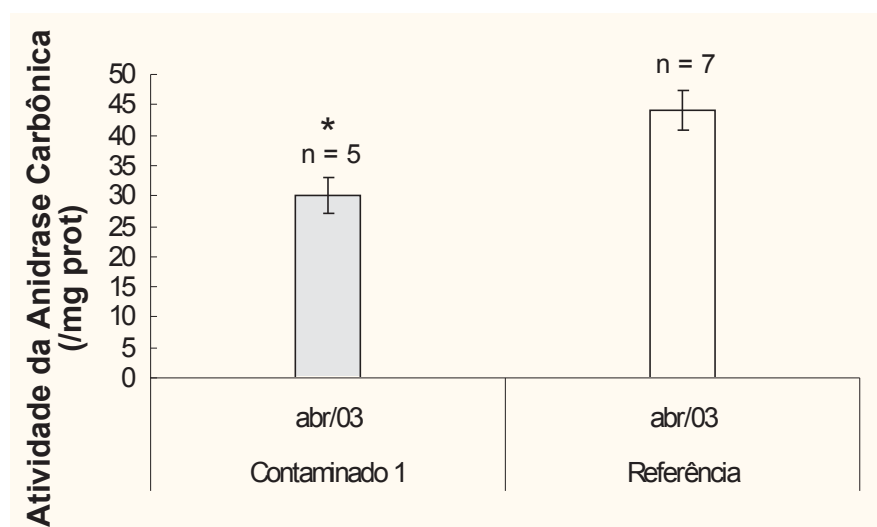
#### **II.4.2.2. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

Efeitos sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de bagres foram evidentes apenas para os organismos coletados em fevereiro: houve maior atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nos bagres coletados no ponto Contaminado 1 em cerca de 3 vezes o valor médio obtido para aqueles da Referência. Referência=  $0,65 \pm 0,18$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=8) e Contaminado 1=  $1,58 \pm 0,38$   $\mu\text{mols Pi/mg proteína/h}$  (n=8,  $p=0,027$ , Tabela 4). Devido ao baixo número de amostras (n) que apresentaram atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase provenientes da coleta abril, não foi possível evidenciar qualquer diferença significativa entre os grupos nesta época, assim como, na comparação entre abril e fevereiro (Tabela 4).

### II.4.2.3. Atividade da Anidrase Carbônica

Não foi possível determinar a atividade da anidrase carbônica para as amostras de brânquias dos bagres coletados em fevereiro/04, pois o protocolo da anidrase carbônica ainda não estava estabelecido quando tais amostras foram processadas para a atividade das outras enzimas. Dessa forma, os resultados aqui demonstrados referem-se apenas à atividade da anidrase carbônica branquial dos bagres processados posteriormente, ou seja, dos animais coletados em abril/03.

Houve menor atividade da anidrase carbônica branquial nos bagres coletados no ponto Contaminado 1. Referência=  $44,15 \pm 3,25$  /mg proteína (n=7) e Contaminado 1=  $30,07 \pm 3,05$  /mg proteína (n=5),  $p=0,013$ , 1-ANOVA, Fig. 5).

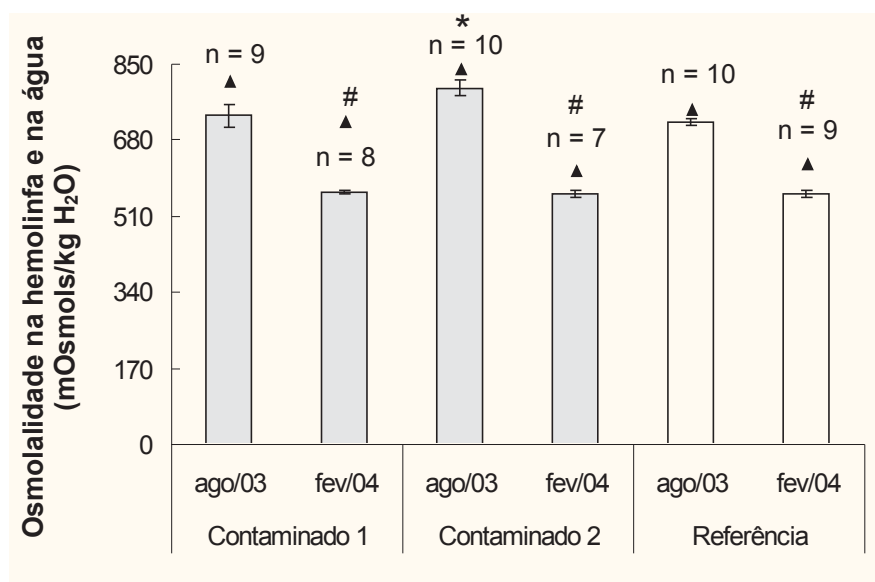


**Fig. 5-** Atividade da Anidrase Carbônica (/mg proteína) em homogeneizado de brânquias de *Cathorops spixii* coletados em abril/03 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios ± erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência.

### **II.4.3. Osmolalidade e concentrações iônicas na hemolinfa de ostras *C. rhizophorae***

#### **II.4.3.1. Osmolalidade**

Nas ostras coletadas durante agosto foi encontrada maior osmolalidade da hemolinfa nos animais do ponto Contaminado 2 em relação ao ponto Referência: Referência=  $720,30 \pm 9,32$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=10) e Contaminado 2=  $796,50 \pm 18,31$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=10, p=0,019, 1-ANOVA, Fig. 6). Para as coletadas em fevereiro, não houve diferenças ao se comparar a osmolalidade entre os grupos, 1-ANOVA, (Fig. 6). Na comparação entre as épocas de coleta, a osmolalidade foi menor para os animais coletados em fevereiro em todos os três grupos estudados, em relação aos de agosto: Referência (p<0,001, teste "t"), Contaminado 1 (p<0,001 em MW) e Contaminado 2 (p<0,001, teste "t"). Referência-fevereiro=  $561,33 \pm 7,14$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=9), Contaminado 1-agosto=  $735,33 \pm 26,40$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=9), Contaminado 1-fevereiro=  $564,63 \pm 2,78$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=8) e Contaminado 2-fevereiro=  $559,43 \pm 7,34$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=7; Fig. 6). Em comparação com a osmolalidade estimada para a água estuarina, as ostras mostraram-se hipo-osmóticas em todos os pontos analisados em ambas as coletas (Fig. 6).



**Fig. 6-** Osmolalidade (mOsmols/kg H<sub>2</sub>O) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias, Contaminado 2= ponto próximo à fontes de contaminação de esgotos urbanos e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios±erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência; #=diferença em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta. ▲ = osmolalidade estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

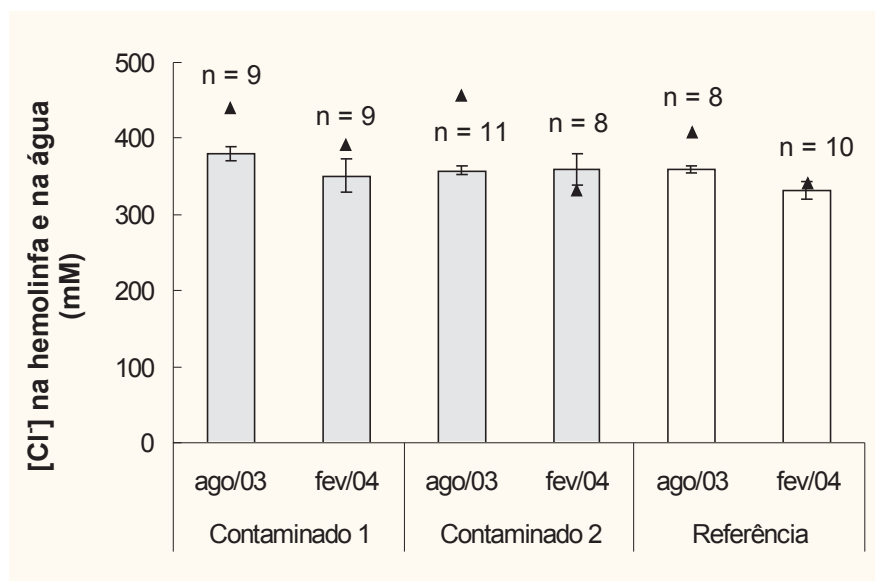
#### II.4.3.2. Íons Cloreto

Não houve diferenças nas concentrações de Cl<sup>-</sup> entre os animais dos pontos Referência e contaminados, tanto para os animais coletados em agosto como para os coletados em fevereiro, (1-ANOVA,

Fig. 7). Na comparação entre as épocas de coleta também não foram observadas diferenças entre os grupos (MW para Referência e teste “t” para Contaminado 1 e 2).

Em relação à concentração de cloreto estimada para a água estuarina as ostras dos três grupos mostraram-se hipo-iônicas em agosto e iso-iônicas em fevereiro (

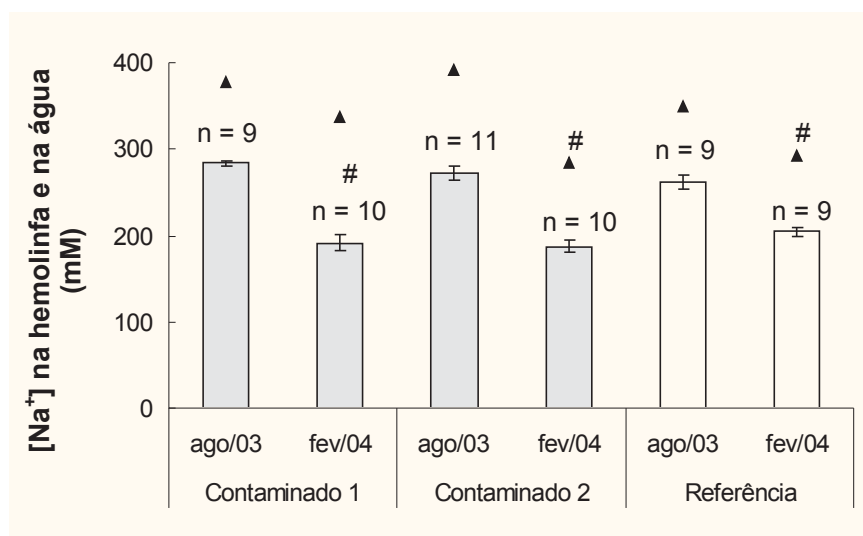
Fig. 7).



**Fig. 7-** Concentração de Cloreto ( $[Cl^-]$ , mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. ▲ = concentração de  $Cl^-$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.3.3. Íons Sódio

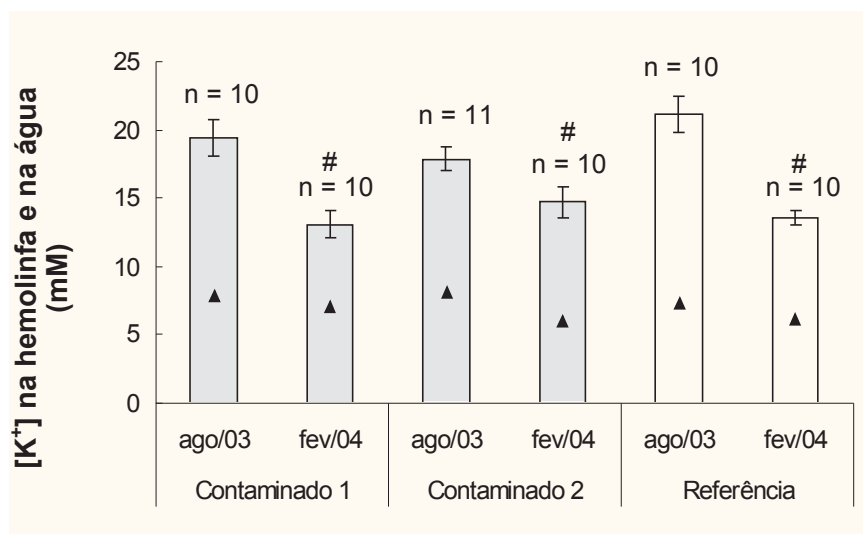
Os níveis de  $Na^+$  na hemolinfa de ostras não diferiram entre os grupos em ambas as épocas do ano estudadas (Fig. 8). Na comparação sazonal, os animais dos três grupos coletados em fevereiro mostraram redução bastante significativa nas concentrações de  $Na^+$  em relação aos de agosto: Referência-agosto=  $262,22 \pm 8,51$  mM (n=9) e Referência-fevereiro=  $204,17 \pm 5,10$  mM (n=9;  $p < 0,001$ ); Contaminado 1-agosto=  $283,61 \pm 3,18$  mM (n=9) e Contaminado 1- fevereiro=  $191,25 \pm 9,29$  mM (n=10;  $p < 0,001$ ); e Contaminado 2-agosto=  $271,82 \pm 8,84$  mM (n=11) e Contaminado 2-fevereiro=  $187,50 \pm 7,02$  mM (n=10,  $p < 0,001$ , Fig. 8). Em relação à concentração de sódio estimada na água estuarina, a hemolinfa das ostras foi hipoiônica nos três pontos estudados, em ambas as épocas de coleta.



**Fig. 8-** Concentração de Sódio ( $[Na^+]$ , mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. ▲ = concentração de  $Na^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.3.4. Íons Potássio

De forma similar ao ocorrido para a  $[Na^+]$ , não houve diferenças na  $[K^+]$  na hemolinfa dos animais dos três grupos, em ambas as épocas de coleta (Fig. 9). Porém, foi observada redução nos níveis deste íon quando comparados os respectivos grupos nas 2 épocas: Referência-agosto=  $21,10 \pm 1,31$  mM (n=10) e Referência- fevereiro=  $13,55 \pm 0,57$  mM (n=10;  $p < 0,001$ ); Contaminado 1-agosto=  $19,45 \pm 1,33$  mM (n=10) e Contaminado 1- fevereiro=  $13,05 \pm 1,00$  mM (n=10;  $p < 0,001$ ); e Contaminado 2-agosto=  $17,84 \pm 0,87$  mM (n=11) e Contaminado 2- fevereiro=  $14,70 \pm 1,07$  mM (n=10;  $p = 0,037$ ). Todas as ostras, coletadas em ambas as épocas de coleta, mostraram-se hiper-iônicas para o potássio em relação ao estimado para o ambiente (Fig. 9).

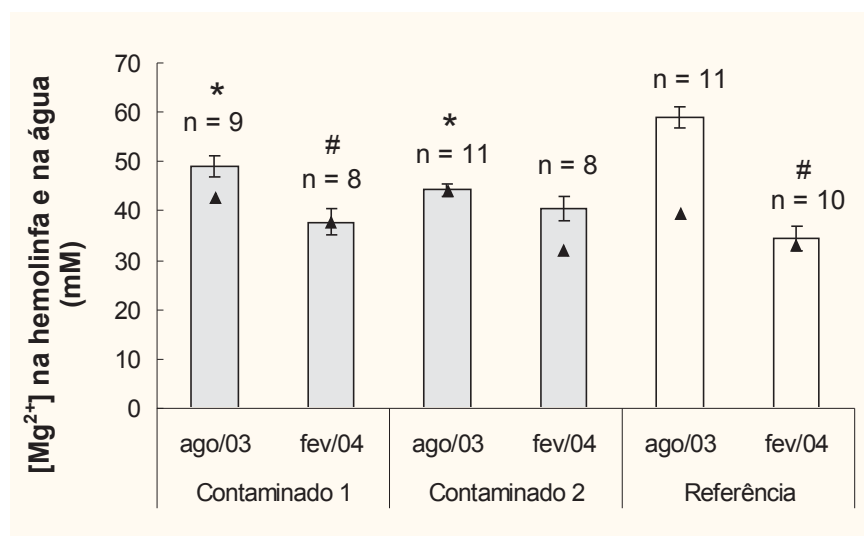


**Fig. 9-** Concentração de Potássio ( $[K^+]$ , mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. ▲ = concentração de  $K^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.3.5. Íons Magnésio

Foi observada menor concentração de  $Mg^{2+}$  na hemolinfa de ostras coletadas durante agosto nos pontos contaminados: Referência=  $59,02 \pm 2,22$  mM (n=11), Contaminado 1=  $49,04 \pm 2,18$  mM (n=9,  $p=0,005$ ) e Contaminado 2=  $44,27 \pm 1,34$  mM (n=11,  $p<0,001$ , Fig. 10). Para os animais coletados em fevereiro não foram observadas diferenças quando comparados os três grupos estudados. Na comparação entre as épocas de coleta, as ostras coletadas em fevereiro tiveram concentração de magnésio hemolinfático menor que aquelas de agosto para os animais do ponto Referência ( $p<0,001$ ) e Contaminado 1 ( $p=0,001$ ): Referência-fevereiro=  $34,47 \pm 2,35$  mM (n=10) e Contaminado 1- fevereiro=  $37,80 \pm 2,68$  mM (n=8). Em relação à concentração de magnésio estimada para a água estuarina, as ostras do ponto Referência e Contaminado 1 foram hiper-iônicas em agosto e iso-iônicas em fevereiro.

Para as do Contaminado 2, resposta contrária foi observada, sendo as de agosto iso-iônicas e as de fevereiro hiper-iônicas para o  $Mg^{2+}$  (Fig. 10).

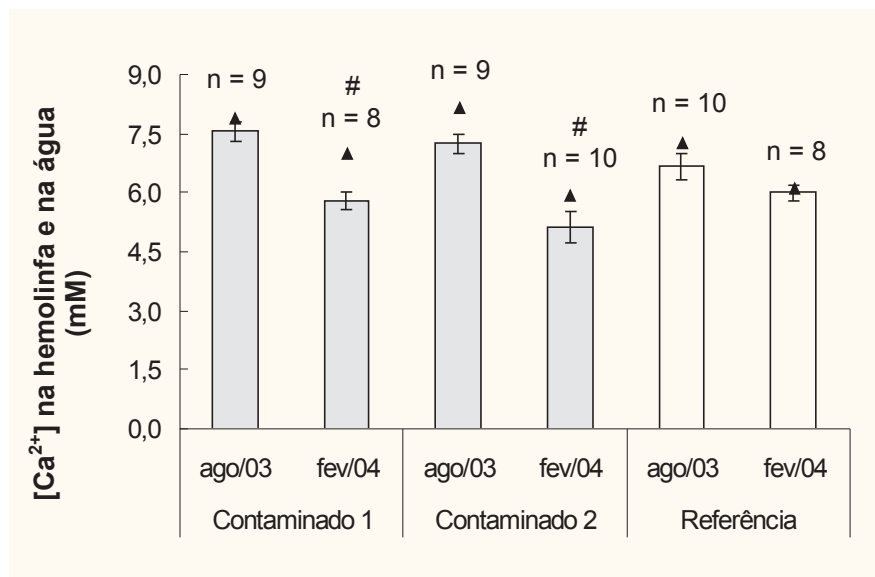


**Fig. 10-** Concentração de Magnésio ( $[Mg^{2+}]$ , mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. ▲ = concentração de  $Mg^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.3.6. Íons Cálcio

Semelhante ao ocorrido para outros íons, a contaminação não causou diferenças entre os níveis de  $Ca^{2+}$  na hemolinfa de ostras dos pontos Referência e contaminados em ambas as épocas de coleta (Fig. 11). Na comparação sazonal, houve redução significativa nos níveis de  $Ca^{2+}$  para as ostras dos pontos Contaminado 1 e Contaminado 2 coletadas em fevereiro quando comparadas com aquelas dos mesmos grupos coletadas em agosto: Contaminado 1-agosto=  $7,57 \pm 0,25$  mM (n=9) e Contaminado 1-fevereiro=  $5,80 \pm 0,22$  mM (n=8;  $p < 0,001$ ); e Contaminado 2-agosto=  $7,25 \pm 0,25$  mM (n=9) e Contaminado 2-fevereiro=  $5,14 \pm 0,40$  mM (n=10;  $p < 0,001$ ). As ostras foram, geralmente, iso-iônicas para o  $Ca^{2+}$  em relação ao estimado para a água estuarina, sendo que em apenas duas situações estes organismos foram hipo-iônicos

ao meio: no ponto Contaminado 2 em agosto e no Contaminado 1 em fevereiro (Fig. 11).



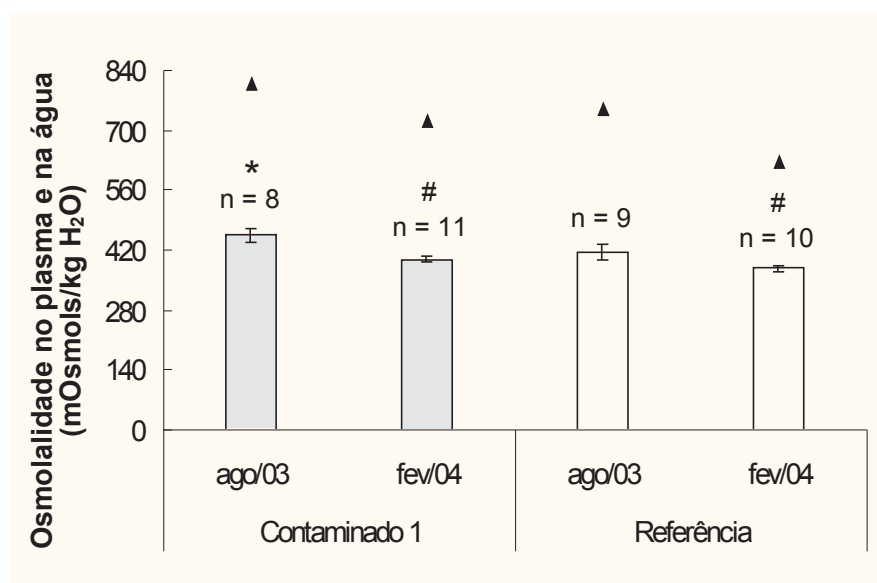
**Fig. 11-** Concentração de Cálcio ( $[Ca^{2+}]$ , mM) na hemolinfa de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em agosto/03 e fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 6. ▲ = concentração de  $Ca^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.4. Osmolalidade e concentrações iônicas no plasma sanguíneo de bagres *C. spixii*

As análises de osmolalidade e concentrações iônicas dos bagres descritas abaixo são referentes aos animais coletados em agosto/03 e fevereiro/04, diferentemente do apresentado para as atividades enzimáticas dos bagres (abril/03 e fevereiro/04). Essa diferença deve-se ao fato de que as análises de osmolalidade e concentrações iônicas já haviam sido realizadas quando houve problemas no processamento dos fragmentos branquiais dos bagres de agosto/03. Assim, substituiu-se os bagres de agosto/03 por bagres de abril/03 apenas para as análises enzimáticas.

#### II.4.4.1. Osmolalidade

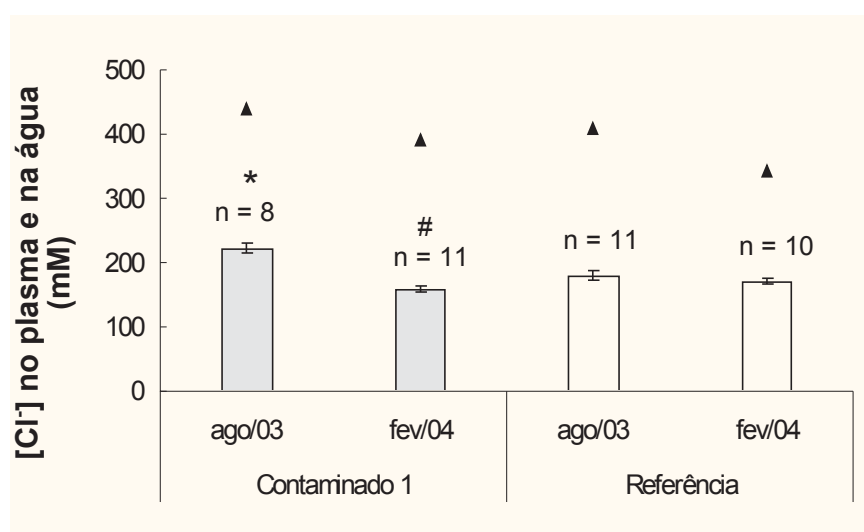
Apenas bagres da coleta de agosto do ponto contaminado (Contaminado 1) apresentaram maior osmolalidade que aqueles do ponto Referência (Fig. 12). Referência=  $414,33 \pm 18,27$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=9) e Contaminado 1=  $454,50 \pm 14,04$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=8, p=0,033). Ao se comparar as épocas sazonais, houve redução na osmolalidade plasmática para os bagres do ponto Referência e do ponto Contaminado 1 coletados em fevereiro em relação aos de agosto: Referência-fevereiro=  $377,90 \pm 7,72$  mOsmols/kg H<sub>2</sub>O (n=10, p=0,040) e Contaminado 1-fevereiro=  $399,46 \pm 7,68$  mM (n=11; p=0,003; Fig. 12). Todos os bagres mostraram-se hiposmóticos em relação à osmolalidade estimada para o meio.



**Fig. 12-** Osmolalidade (mOsmols/kg H<sub>2</sub>O) no plasma sangüíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Contaminado 1= ponto próximo à fontes de contaminação portuárias e Referência= ponto afastado, menos impactado por contaminantes em geral. Valores médios±erro padrão da média; n= número de animais amostrados. \*= diferença significativa em relação à Referência. #=diferença em relação ao mesmo grupo em outra época de coleta. ▲ = osmolalidade estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.4.2. Íons Cloreto

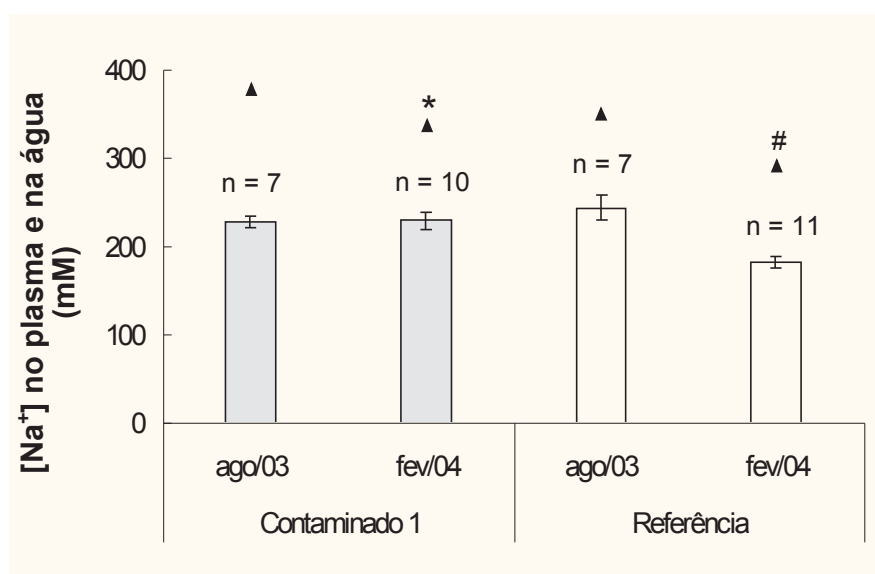
Para os bagres coletados em agosto foi encontrada maior concentração plasmática de  $\text{Cl}^-$  nos pertencentes ao ponto Contaminado 1 em relação aos do ponto Referência. Referência=  $179,46 \pm 7,08$  mM (n=11) e Contaminado 1=  $221,84 \pm 7,56$  mM (n=8,  $p < 0,001$ , Fig. 13). Para os animais coletados em fevereiro, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos (Fig. 13). Na comparação entre épocas sazonais, foi observada menor concentração de  $\text{Cl}^-$  para os animais do ponto Contaminado 1 coletados em fevereiro em relação aos do mesmo ponto coletados em agosto: Contaminado 1-fevereiro=  $159,01 \pm 5,15$  mM (n=11,  $p < 0,001$ , Fig. 13). Em relação aos níveis de cloreto estimados para a água do estuário, os bagres mostraram-se bastante hipo-iônicos para este íon, em ambos os pontos e épocas de coleta (Fig. 13).



**Fig. 13-** Concentração de Cloreto ( $[\text{Cl}^-]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. ▲ = concentração de  $\text{Cl}^-$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

### II.4.4.3. Íons Sódio

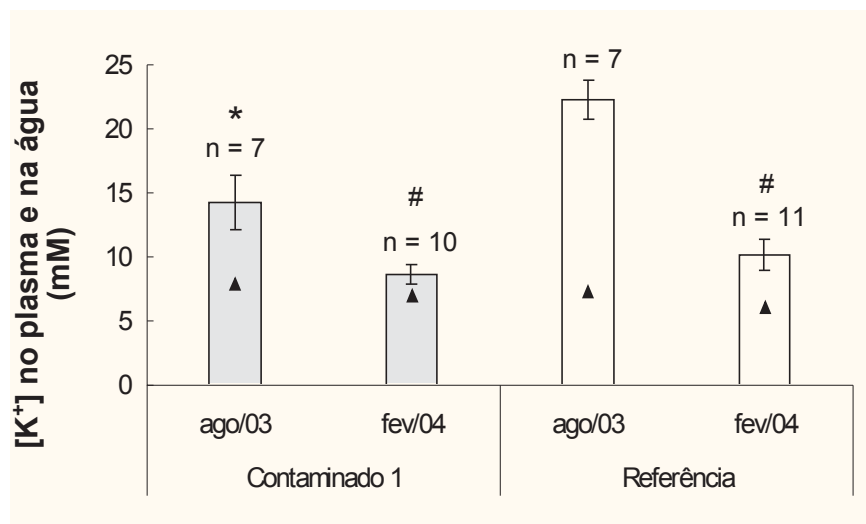
Não foram encontradas diferenças entre os níveis de  $\text{Na}^+$  no plasma sangüíneo de bagres coletados nos pontos Referência e Contaminado 1 em agosto (Fig. 14). Porém, maior concentração deste íon foi evidente para os bagres do ponto Contaminado 1 de fevereiro em relação aos bagres do ponto Referência: Referência=  $181,82 \pm 6,51$  mM (n=11) e Contaminado 1=  $229,75 \pm 10,20$  mM (n= 10,  $p < 0,001$ , Fig. 14). Em relação às diferentes épocas sazonais de coleta, houve apenas menor concentração de sódio nos bagres do ponto Referência coletados em fevereiro quando comparados com os do mesmo ponto coletados em agosto: Referência-agosto=  $243,92 \pm 14,52$  mM (n=7;  $p < 0,001$ ). Em todas as situações analisadas, os bagres foram hipo-iônicos para o  $\text{Na}^+$  em relação ao estimado para a água estuarina (Fig. 14).



**Fig. 14-** Concentração de Sódio ( $[\text{Na}^+]$ , mM) no plasma sangüíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. ▲ = concentração de  $\text{Na}^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.4.4. Íons Potássio

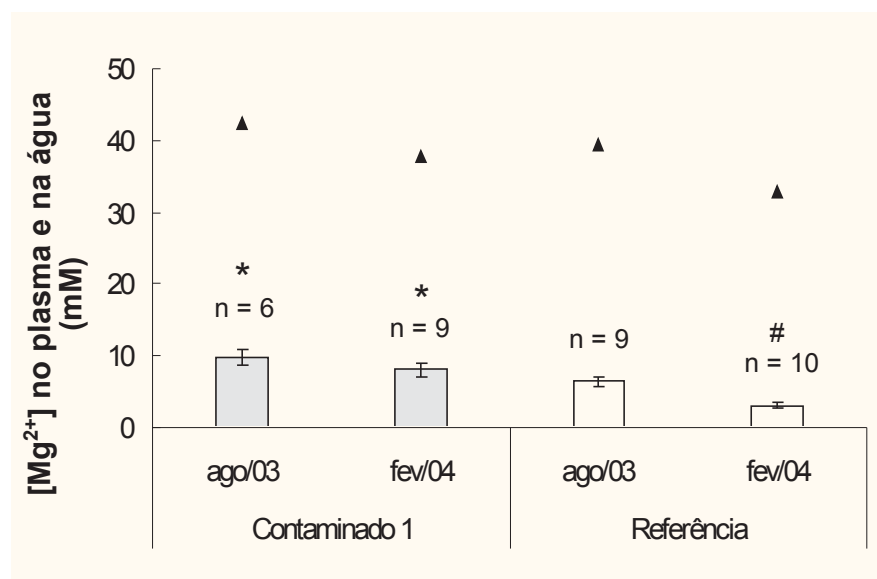
Para os bagres coletados em agosto foi evidenciada menor concentração de  $K^+$  plasmático para aqueles do ponto Contaminado 1: Referência=  $22,32 \pm 1,53$  mM (n=7) e Contaminado 1=  $14,29 \pm 2,11$  mM (n=7,  $p < 0,001$ , Fig. 15). Para os animais coletados em fevereiro, não houve diferenças nos níveis de  $K^+$  plasmático na comparação dos dois grupos analisados (Fig. 15). Comparando as épocas sazonais, é evidente uma menor concentração de potássio nos animais coletados em fevereiro, tanto para os do ponto Referência ( $p < 0,001$ ), como para os do ponto Contaminado 1 ( $p = 0,008$ ): Referência-fevereiro=  $10,09 \pm 1,23$  mM (n=11) e Contaminado 1-fevereiro=  $8,65 \pm 0,73$  mM (n=10). Os bagres mostraram-se geralmente hiper-iônicos para o  $K^+$  em relação ao estimado para a água estuarina, havendo apenas uma exceção: indivíduos do ponto Contaminado 1 de agosto foram iso-iônicos (Fig. 15).



**Fig. 15-** Concentração de Potássio ( $[K^+]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. ▲ = concentração de  $K^+$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.4.5. Íons Magnésio

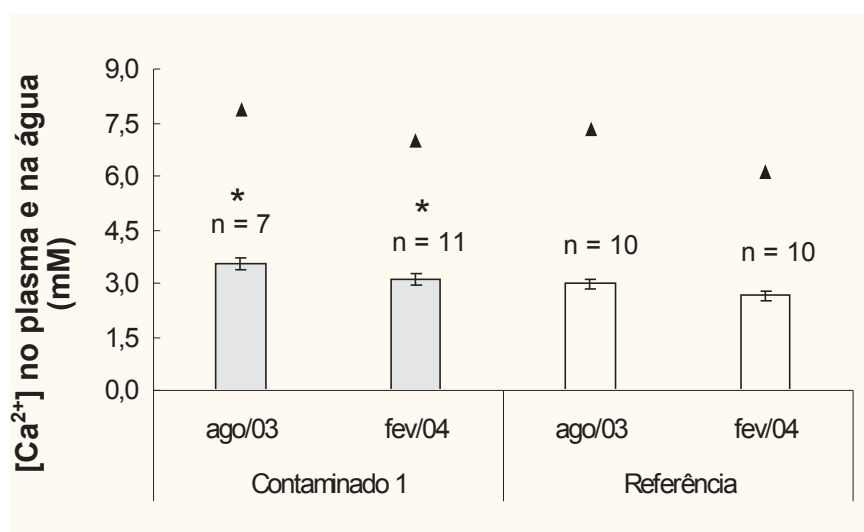
Para os bagres coletados em agosto houve maior concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  para os provenientes do ponto Contaminado 1 quando comparados com os do ponto Referência: Referência=  $6,41 \pm 0,59$  mM (n=9) e Contaminado 1=  $9,82 \pm 1,09$  mM (n=6,  $p=0,006$ , Fig. 16). Em fevereiro, os bagres do ponto Contaminado 1 também apresentaram maiores concentrações de  $Mg^{2+}$  em relação aos do ponto Referência: Referência-fevereiro=  $3,09 \pm 0,43$  mM (n=10) e Contaminado 1-fevereiro=  $8,03 \pm 0,95$  mM (n=9,  $p<0,001$ , Fig. 16). Na comparação das épocas sazonais, houve menor concentração de magnésio nos bagres do ponto Referência coletados em fevereiro quando comparados com os coletados no mesmo local em agosto ( $p=0,003$ ). Nenhuma diferença sazonal foi encontrada para os animais do ponto Contaminado 1. Com relação à concentração de magnésio estimado para a água do estuário, os bagres foram sempre hipo-iônicos (Fig. 16).



**Fig. 16-** Concentração de Magnésio ( $[Mg^{2+}]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. ▲ = concentração de  $Mg^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

#### II.4.4.6. Íons Cálcio

Houve maior nível de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático nos bagres coletados no ponto Contaminado 1 em relação àqueles do ponto Referência em agosto: Referência=  $2,98 \pm 0,15$  mM (n= 10) e Contaminado 1=  $3,53 \pm 0,16$  mM (n= 7,  $p=0,021$ , Fig. 17). Para os bagres coletados em fevereiro, resultado idêntico ocorreu, sendo maior o nível de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático nos bagres coletados no ponto Contaminado 1: Referência=  $2,66 \pm 0,13$  mM (n= 10) e Contaminado 1=  $3,10 \pm 0,15$  mM (n= 11,  $p=0,036$ , Fig. 17). Na comparação entre as épocas sazonais de coleta, nenhuma diferença foi observada para os animais de ambos os pontos. Em relação ao estimado para a água estuarina, os bagres sempre foram hipo-iônicos para o  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 17).



**Fig. 17-** Concentração de Cálcio ( $[\text{Ca}^{2+}]$ , mM) no plasma sanguíneo de *Cathorops spixii* coletados em agosto/03 ou fevereiro/04 na Baía de Paranaguá-PR. Descrições dos pontos e diferenças significativas conforme legenda da Fig. 12. ▲ = concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  estimada para a água do estuário em cada local de coleta.

## II.5. Discussão

### II.5.1. Ostras

Foram observadas diferenças na atividade ATPásica total e anidrase carbônica entre as ostras do ponto Contaminado 2 e Referência. Para a atividade ATPásica total, apenas indivíduos do ponto Contaminado 2 da coleta realizada em agosto apresentaram maior atividade enzimática frente às ostras do ponto Referência (Tabela 4). Como já sugerido na seção I.5 (Capítulo I), o aumento na atividade ATPásica total pode ser uma resposta de tolerância desenvolvida frente à contaminação pois, como já mencionado no capítulo anterior, vários trabalhos relatam o aumento de atividade de ATPases (incluindo a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) como sendo uma resposta de exposição a contaminantes, tanto em peixes (McDonald e Wood, 1993; Webb *et al.*, 2001), como em invertebrados (Harris e Santos, 2000; Bianchini *et al.*, 2005; Comoglio *et al.*, in press).

Neste trabalho, contudo, a maior atividade ATPásica total parece não ser devida ao aumento de atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mas sim de outras ATPases, uma vez que não houve diferenças na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase entre indivíduos dos pontos contaminados e Referência (Tabela 4). Esta hipótese é corroborada pela literatura, pois a mesma cita aumento da atividade ATPásica total e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase branquial no camarão branco *Litopenaeus vannamei* expostos via trófica a 0,62 e 1,31  $\mu\text{g}$  de metilparation enquanto que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase permaneceu semelhante aos animais dos grupos controle. (Comoglio *et al.*, in press). Tais autores sugerem, desta forma, que a  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase branquial é mais sensível aos contaminantes analisados que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial de *L. vannamei* e relatam que tal resultado já havia sido obtido por outros autores com *Procambarus clarkii* expostos a metais pesados.

Como já levantado no Capítulo I, seção I.5, o método utilizado para a determinação de atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase mostrou-se pouco responsivo,

principalmente para as ostras coletadas em fevereiro. Vários autores afirmam que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase relaciona-se com a salinidade de forma diretamente proporcional, em diversas espécies animais (Neufeld *et al.*, 1980; Venturini *et al.*, 1992; Jobling, 1995; McCormick, 1995) e, como a salinidade foi menor em fevereiro do que em agosto (Tabela 3), espera-se que a atividade desta enzima seja menor nessa época do ano. Assim, a sensibilidade do método pode ter sido reduzida pela menor atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase das ostras em fevereiro, conforme também já discutido em I.5.

As ostras do ponto Contaminado 2 tiveram maior atividade da anidrase carbônica quando comparadas com aquelas do ponto Referência e do ponto Contaminado 1, em ambas as épocas de coleta: agosto/03 e fevereiro/04 (Fig. 4). Apesar de não haver na literatura relatos de aumento de atividade da anidrase carbônica frente a contaminantes, o aumento desta enzima pode também ser resultado de tolerância desenvolvida, como o observado para as ATPases supra-citadas. Além disso, no Capítulo I, tanto na região de PE, como na região de ES houve maior atividade da anidrase carbônica para ostras dos pontos contaminados, o que corrobora os resultados obtidos aqui também para as ostras do ponto Contaminado 2. Assim, percebe-se que as ostras do ponto Contaminado 2 estão sendo afetadas por contaminantes, respondendo em ambas as épocas analisadas com mecanismos de tolerância à contaminação. Para as ostras do ponto Contaminado 1, porém, não é possível afirmar que a contaminação não esteja afetando a atividade da anidrase carbônica, pois, apesar de não haver diferenças entre as mesmas e as ostras do ponto Referência, uma resposta de tendência à inibição pós-tolerância poderia estar ocorrendo, ou seja, primeiramente teria ocorrido um aumento na atividade da anidrase carbônica como mecanismo de tolerância. Em um segundo momento, o nível de contaminação teria aumentado acima dos valores que deram origem à tolerância e, como a tolerância não muda com o aumento da contaminação (como observado para

metais por McDonald e Wood, 1993), a anidrase carbônica teria começado a ser inibida até chegar em níveis próximos aos da Referência. Dessa forma, vê-se que, como as enzimas estudadas podem responder inicialmente com um aumento de atividade, para posteriormente serem inibidas, as respostas de não diferença nas suas atividades entre animais dos locais contaminados e Referência não podem simplesmente ser interpretadas como ausência de efeitos; justamente podem indicar um momento de transição entre as respostas de tolerância e de inibição aos contaminantes. Para evitar esse tipo de ambigüidade de respostas é imprescindível associar estes biomarcadores a outros, fisiológicos, bioquímicos, histológicos, dentre outros, pois assim, mais apurada será a interpretação de seus resultados.

Dentre os biomarcadores fisiológicos estudados para as ostras, foram observados efeitos da contaminação apenas na osmolalidade e nos níveis de magnésio. Para a osmolalidade, foi observado aumento da mesma nas ostras do ponto Contaminado 2 coletadas em agosto (Fig. 6). A ausência de efeitos sobre a osmolalidade das ostras do ponto Contaminado 1 e a proximidade das salinidades dos três pontos estudados em agosto sugerem que o efeito encontrado sobre a osmolalidade seja decorrente da presença de contaminantes específicos no ponto Contaminado 2, provenientes de esgoto urbano e possivelmente de áreas de lavoura. Em trabalhos com pesticidas organoclorados e organofosforados, Galindo-Reyes *et al.*, (2000), observaram que o camarão branco *L. vannamei* apresentou mudanças em sua osmolalidade hemolinfática quando expostos a estes pesticidas e à variações na salinidade. Segundo estes autores, *L. vannamei* expostos à salinidade de 10‰ e a vários pesticidas isoladamente (lorsban, diazinon, folidol, guzation e lindane) apresentaram redução na osmolalidade e, apenas na exposição à mesma salinidade e ao DDT não houve diferenças na osmolalidade destes animais. Em salinidades próximas à da água do mar, 30‰, não houve efeitos claros dos pesticidas analisados

e, em 50‰, foi observado que os pesticidas organoclorados (DDT, lindane e lorsban) causaram redução na osmolalidade de *L. vannamei* enquanto que os organofosforados (diazinon, folidol, guzation) causaram aumento na mesma. Vê-se assim que tais pesticidas podem interagir com processos de regulação osmótica de *L. vannamei* e, possivelmente, alguns destes pesticidas podem estar ocorrendo no ponto Contaminado 2 do trabalho aqui apresentado, ocasionando o aumento da osmolalidade relatada para as ostras deste local. É importante ressaltar que apenas para os animais coletados em agosto (inverno), foi observado este efeito. Para os coletados em fevereiro (verão), nenhuma diferença na osmolalidade das ostras foi observada. Apesar da perturbação osmótica verificada nas ostras do ponto Contaminado 2 em agosto, esta perturbação não foi grande o suficiente para comprometer a regulação osmótica observada em relação ao estimado para a água estuarina, pois as ostras foram hipo-osmóticas em todos os pontos analisados, o que sugere que sejam hipo-reguladoras. Para a maioria dos íons analisados as ostras realmente foram hipo-reguladoras, sendo que apenas para o  $K^+$  e o  $Mg^{2+}$  foi observado hiper-regulação. Em alguns casos ainda, as ostras foram iso-iônicas ao meio, resposta que poderia refletir o fechamento de suas conchas com a manutenção do meio interno, mas que não faz sentido ao se verificar que houve resposta diferenciada na regulação de vários íons nos mesmos indivíduos. De acordo com Bianchini *et al.*, (2005), a lebre-do-mar *Aplvsia californica* e o ouriço-do-mar *Diadema antillarum* são hiper-reguladores para o  $Mg^{2+}$ , enquanto que o camarão marinho *Penaeus duorarum* é hipo-regulador para o  $Cl^-$ , respostas de regulação iônica idênticas às observadas para as ostras *C. rhizophorae* estudadas aqui.

Para o magnésio, foi observada redução nas concentrações deste íon nas ostras de ambos os pontos contaminados coletadas em agosto (Fig. 10). Isto indica que em ambos os pontos considerados bastante contaminados há contaminantes causando perturbação nos processos de regulação iônica do  $Mg^{2+}$  nas ostras, pois, como já

mencionado para a osmolalidade, as salinidades nos três pontos estudados nesta época do ano foram próximas (Tabela 3). Assim, sugere-se que a concentração de  $Mg^{2+}$  seja um bom biomarcador, responsivo tanto a contaminantes provenientes de esgotos urbanos e áreas de lavoura, como de locais contaminados por dejetos industriais e de atividades portuárias. Apesar deste resultado para os animais coletados em agosto, nas ostras coletadas em fevereiro os níveis de  $Mg^{2+}$  hemolinfático foram semelhantes para os animais dos três pontos analisados.

Efeitos de metais sobre processos osmorregulatórios (incluindo a concentração de  $Mg^{2+}$ ) são descritos na literatura para peixes (maior detalhamento em II.5.2). Para o anfípoda dulcícola *Gammarus pulex*, foi descrito redução na concentração de  $Na^+$  hemolinfático e no influxo de sódio após 4 h de exposição a 100  $\mu g$  Cu/l ou maior concentração de cobre (Brooks e Mills, 2003). Por outro lado, na exposição à 1 ou 10  $\mu g$  Ag/l não foram observados efeitos sobre a osmolalidade e concentrações iônicas de  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  hemolinfáticos de três espécies de invertebrados marinhos: a lebre-do-mar *A. californica*, o ouriço *D. antillarum* e o camarão *P. duorarum* (Bianchini *et al.*, 2005). Assim, vê-se que as respostas osmo-iônicas frente a contaminantes podem ser bastante variáveis e certamente dependem do contaminante utilizado, da concentração do mesmo, de sua interação com outros fatores abióticos (e outros contaminantes) e da susceptibilidade da espécie animal estudada. Como encontrado neste trabalho, apenas a concentração de magnésio foi afetada por contaminantes presentes no ponto Contaminado 1 e, esta resposta apenas ocorreu para os animais coletados em agosto (período de inverno).

Na comparação entre as diferentes épocas de coleta, percebe-se que há um componente sazonal influenciando os resultados, pois foram observadas diferenças na osmolalidade e nas concentrações de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  para as ostras do ponto Referência entre as épocas (Fig. 8 Fig. 9 Fig. 10, respectivamente). A Tabela 3 mostra

que houve variações na salinidade, temperatura e pH neste ponto quando comparadas as épocas de agosto e fevereiro. Efeitos da salinidade e temperatura são descritos por Sardella *et al.* (2004) para a tilápia híbrida 'California' Mozambique (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) como influenciando a regulação osmo-iônica e a atividade de enzimas deste animal. Tal trabalho será melhor discutido juntamente com a sazonalidade para os bagres em II.5.2.

As diferenças sazonais também foram encontradas entre os animais dos pontos contaminados: no Contaminado 1 e 2 foram verificadas diferenças na osmolalidade e concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  hemolinfáticas (Fig. 8 Fig. 9 Fig. 11, respectivamente). Somente para o ponto Contaminado 1 foi verificada diferença na concentração de  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 10) e, apenas para o ponto Contaminado 2 foi verificado menor atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nas ostras coletadas em fevereiro (Tabela 4). As diferenças sazonais encontradas para osmolalidade e as concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  sugerem que tais parâmetros estejam sendo influenciados pelas variações da salinidade, temperatura e pH (conforme mostrado na Tabela 3), uma vez que variações sazonais também foram encontradas na comparação dos animais do ponto Referência de agosto/03 e fevereiro/04, como discutido acima. Por outro lado, pode, como já discutido em I.5, ocorrer biodisponibilidade diferenciada de contaminantes sazonalmente pela influencia da salinidade, temperatura e pH (Fent, 1996), podendo assim, haver uma absorção e bioacumulação de contaminantes pelos organismos também diferenciadas. Além disso, os resultados obtidos podem ainda ser um somatório de efeitos da salinidade, temperatura e pH e da biodisponibilidade diferenciada sobre os animais dos pontos Contaminados 1 e 2. Para a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , para os quais houve efeitos sazonais apenas sobre animais de pontos contaminados, sugere-se que a diferença sazonal seja decorrente de variação na biodisponibilidade de contaminantes para os pontos Contaminado 1 e 2, uma vez que não houve variações

sazonais para os animais do ponto Referência para estes parâmetros e que as diferenças entre salinidade, temperatura e pH não foram grandes entre os animais do ponto Referência e contaminados em cada uma das coletas (Tabela 3). Assim, os fatores abióticos salinidade, temperatura e pH não estariam agindo diretamente sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas indiretamente, por ação na biodisponibilidade.

Vale ressaltar que não há na literatura relatos de trabalho apresentando estudos de processos de regulação osmo-iônica em ostras, o que dificulta a discussão dos dados obtidos neste trabalho. Apesar disso, pelos resultados obtidos pode-se sugerir que as ostras possuem certa capacidade de regulação iônica e que mecanismos de fechamento de concha devem ocorrer para que as mesmas tolerem uma grande diluição da água estuarina - o que não foi observado neste trabalho, mas que está de acordo com o sugerido por Schmidt-Nielsen (1996) como o esperado para ostras, tendo por base o padrão de respostas de outros moluscos de ambiente marinho.

Reunindo as respostas dos biomarcadores bioquímicos e fisiológicos para ostras, é nítida a maior ocorrência de efeitos nos animais do ponto Contaminado 2, principalmente para os coletados em agosto. Sugere-se, assim, que este ponto seja mais poluído que o ponto Contaminado 1, ou seja, que os contaminantes presentes no Contaminado 2 causem mais efeitos biológicos que os presentes no Contaminado 1. Além disso, possivelmente ocorra uma biodisponibilidade aumentada de contaminantes em agosto (período de inverno) do que em fevereiro (período de verão) ou que contaminantes diferentes sejam liberados nos mesmos pontos em diferentes épocas do ano. Essa maior biodisponibilidade ou contaminação diferenciada poderia gerar uma maior bioacumulação, ocasionando os maiores efeitos biológicos encontrados.

Os efeitos sobre a atividade da anidrase carbônica em ambas as épocas de coleta para os animais do Contaminado 2 sugerem este seja um biomarcador bastante

responsivo a pesticidas e compostos provenientes de esgotos urbanos. Apesar da maior atividade ATPásica total e da anidrase carbônica poderem estar relacionadas com as variações osmótica e de níveis de  $Mg^{2+}$  encontrados nas ostras coletadas em agosto, acredita-se que outros mecanismos de regulação osmo-iônica devem estar sendo afetados pelos contaminantes nesta época, pois também houve maior atividade da anidrase carbônica para as ostras coletadas em fevereiro no ponto Contaminado 2, mas não foram encontradas diferenças na regulação do  $Mg^{2+}$  as mesmas nesta época.

### **II.5.2. Bagres**

A atividade ATPásica total em brânquias foi maior nos bagres *Cathorops spixii* coletados no ponto Contaminado 1 (único ponto contaminado analisado para os bagres), em ambas as épocas de coleta destes peixes, abril e fevereiro (Tabela 4). Como observado para as ostras *C. rhizophorae* desta mesma região e da região de PE e ES (Capítulo I) e já discutido para as mesmas, vários trabalhos citam atividades aumentadas de ATPases (entre elas a  $Na^+,K^+$ -ATPase) como um mecanismo de tolerância à contaminantes, tanto em peixes (McDonald e Wood, 1993; Webb *et al.*, 2001), como em invertebrados (Harris e Santos, 2000; Bianchini *et al.*, 2005; Comoglio *et al.*, *in press*). Para os bagres, foi possível observar também aumento na atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase para os indivíduos coletados em fevereiro (Tabela 4), reforçando que compensações fisiológicas estejam ocorrendo como forma de tolerância aos contaminantes. Por outro lado, não foram encontrados efeitos sobre a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase nos bagres coletados em abril. Porém, como o método utilizado para a determinação da atividade desta enzima mostrou-se pouco responsivo para os bagres desta época, o que acarretou em um baixíssimo número de amostras com atividade, não é possível afirmar essa ausência de efeitos. Se um maior número de amostras tivesse apresentado atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase, possivelmente diferenças seriam

observadas na análise estatística. Esta baixa sensibilidade do método de determinação de atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é descrita também para ostras neste Capítulo e no Capítulo I e é discutida com mais detalhes na seção I.5.

De acordo com o descrito por McDonald e Wood (1993), a tolerância desenvolvida em função da exposição crônica aos contaminantes pode ter ocasionado o aumento de células de cloreto (CC), ocorrendo maior síntese de enzimas presentes em tais células, conseqüentemente. Assim, como já descrito para as ostras, para uma inibição enzimática ocorrer, o nível de contaminação deveria aumentar, de tal modo a ultrapassar a tolerância desenvolvida, o que não aconteceu para a atividade ATPásica Total e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase dos bagres.

A atividade da anidrase carbônica branquial, analisada para os bagres coletados apenas em abril, mostrou menor atividade para os indivíduos do ponto Contaminado 1 (Fig. 5). Tal redução de atividade está de acordo com as inibições na atividade da anidrase carbônica descrita pela literatura a vários contaminantes como em brânquias e intestino da enguia *Anguilla anguilla* expostos “in vitro” ao cádmio (Lionetto *et al.*, 1998 e Lionetto *et al.*, 2000); crustáceos eurialinos expostos a metais (Skaggs e Henry, 2002; Vitale *et al.*, 1999) e anêmonas expostas a derivados de petróleo (Gilbert e Guzmán, 2001), como já descrito em I.5. Dessa forma, a atividade da anidrase carbônica branquial mostrou-se um bom biomarcador para os bagres analisados, responsiva aos contaminantes presentes no ponto Contaminado 1 em abril. Acredita-se, pela sensibilidade da anidrase carbônica na resposta a contaminantes mostrada para ostras (inclusive das regiões de PE e ES, Capítulo I) e para bagres, que esta enzima seria também responsiva para os bagres coletados em outras épocas, caso tivesse sido possível sua análise.

Em geral, os biomarcadores fisiológicos (osmolalidade e concentrações iônicas) dos bagres mostraram diferenças entre os pontos contaminados e Referência,

sugerindo perturbação de processos osmorregulatórios devido à exposição aos contaminantes. Cabe lembrar que as análises dos biomarcadores fisiológicos foram realizadas para bagres coletados em agosto e fevereiro, não sendo possível as análises enzimáticas para os animais de agosto, conforme já explicado em II.4.2.

Foi visualizado aumento na osmolalidade dos bagres coletados no ponto Contaminado 1 em agosto, mas este aumento não ocasionou comprometimento osmótico, pois os bagres deste ponto foram hipo-osmóticos ao estimado para o meio, assim como os demais bagres analisados para ambas as épocas de coleta (Fig. 12). Tal resposta está de acordo com o esperado para peixes marinhos e estuarinos nas salinidades analisadas (Cataldi *et al.*, 1995; Plaza-Yglesias *et al.*, 1988; Plaut, 1998; Prodocimo e Freire, 2001).

Para os íons cloreto, apenas os bagres coletados em agosto apresentaram diferenças em sua regulação: houve maior concentração deste íon para os animais do ponto Contaminado 1 (Fig. 13). Como a variação de salinidade é pequena entre os pontos Referência e Contaminado 1 em agosto (Tabela 3), sugere-se que há perturbação do cloreto. Porém, esta perturbação não chega a comprometer a concentração deste íon nos bagres em relação ao estimado para a água, pois em todos os casos estes animais foram hipo-iônicos ao meio, como esperado para peixes marinhos e estuarinos (Cataldi *et al.*, 1995; Plaza-Yglesias *et al.*, 1988; Prodocimo e Freire, 2001). O aumento nos níveis de  $\text{Cl}^-$  nos bagres do Contaminado 1 justificam também o aumento encontrado na osmolalidade plasmática nestes mesmos indivíduos coletados em agosto. Em uma revisão de Singh *et al.* (2002), estes autores citam vários trabalhos que relatam mudanças em níveis iônicos de peixes expostos a inseticidas. Há respostas tanto de hipo como de hiperclorémia, dependendo do inseticida aos quais os peixes foram expostos como do tempo de exposição.

Os níveis de íons sódio foram maiores no plasma sanguíneo dos bagres do ponto Contaminado 1 coletados em fevereiro (Fig. 14). Porém, a perturbação sugerida devido a esta variação não compromete os níveis de  $\text{Na}^+$  nos animais em relação ao meio, pois, em todos os casos, os animais foram hipo-iônicos para o  $\text{Na}^+$ , como esperado para peixes estuarinos e marinhos (Plaza-Yglesias *et al.*, 1988; Cataldi *et al.*, 1995; Plaut, 1998; Prodocimo e Freire, 2001). Aumento nas concentrações de sódio no plasma sanguíneo é a resposta mais comum para diversas espécies de peixes expostas a inseticidas, mas reduções também são relatadas por Singh *et al.*, 2002.

Para o  $\text{K}^+$  foi evidente menor concentração plasmática deste íon para os bagres do ponto Contaminado 1 coletados em agosto (Fig. 15). Relatos de hipocalemia são descritos para o bagre *Clarias batrachus* expostos a carbaril e carbofuranos (compostos existentes em inseticidas) após 30 dias de exposição, como citado na revisão de Singh *et al.*, 2002. Esta revisão também cita um trabalho com *Platichthys flesus*, espécie que apresentou uma grande redução na concentração de potássio após exposição de longo prazo ao cádmio. É discutido ainda que a perturbação do potássio possa ser devida a comprometimento da reabsorção de potássio no túbulo renal. Em outros trabalhos citados por Singh *et al.*, 2002, contudo, a perturbação leva a hipercalemia. Assim, perturbação na reabsorção renal de  $\text{K}^+$  também pode ser sugerida para os bagres do ponto Contaminado 1 coletados em agosto, mas isto não comprometeu a manutenção da hiper-ionicidade de  $\text{K}^+$  no plasma sanguíneo dos bagres. Apenas para os bagres do ponto Contaminado 1 coletados em fevereiro foram iso-iônicos em relação ao estimado para a água estuarina. Porém, isso não foi acompanhado de qualquer diferença entre os níveis de  $\text{K}^+$  nos animais do ponto Referência e Contaminado 1.

Para o  $\text{Mg}^{2+}$  foram observados maiores níveis deste íon nos animais do ponto Contaminado 1 coletados em agosto e fevereiro (Fig. 16). Apesar disso, não houve

comprometimento final nas concentrações de magnésio dos animais em relação ao estimado para a água do estuário: em todos os casos os animais foram hipo-iônicos ao ambiente, tal como esperado para peixes marinhos e estuarinos (Plaza-Yglesias *et al.*, 1988; Prodocimo e Freire, 2001). Na revisão de Singh *et al.*, 2002, tanto hipo como hipermagnesemia são citadas para várias espécies de peixes expostos a derivados de inseticidas. A justificativa dada para a hipermagnesemia é que esta seja decorrente de danos renais como retração de glomérulos e atrofia de túbulos renais, acarretando em deficiência para a excreção do excesso de  $Mg^{2+}$ , conforme citado por outros trabalhos na revisão de Singh *et al.* (2002) para *Puntius conchonus* expostos ao cádmio e ao carbaril. Assim, sugere-se para os bagres que há perturbação do magnésio para os animais do ponto Contaminado 1, possivelmente por danos renais impedindo a excreção do excesso deste íon. Porém, tais danos não chegaram a causar mudanças no gradiente de  $Mg^{2+}$  estabelecido entre os animais e o meio. Vale lembrar que, para as ostras coletadas em agosto, perturbação dos níveis de magnésio também foi visualizada para aquelas dos pontos Contaminados 1 e 2, o que reforça o uso dos níveis de magnésio como biomarcador.

Por fim, os níveis de  $Ca^{2+}$  também foram maiores nos bagres do ponto Contaminado 1 em ambas as épocas de coleta (Fig. 17). Singh *et al.* (2002) citam trabalhos indicando respostas tanto de hipo como de hipercalcemia no soro de peixes contaminados por derivados de inseticidas e suas combinações. Além disso, citam que o efeito tóxico de inseticidas pode levar à liberação de cálcio de órgãos vitais para o sangue, aumentando assim, os níveis séricos deste íon. Esta justificativa também pode ser estendida aos bagres; talvez os contaminantes presentes no ambiente estejam causando liberação de cálcio para o plasma sangüíneo devido à sua toxicidade para alguns grupos celulares, porém, tal fato não modificou a hipo-ionicidade deste íon dos

bagres em relação ao estimado para o ambiente, ou seja, o processo de perturbação não interfere no equilíbrio iônico deste íon dos bagres em relação ao ambiente.

Apesar dos relatos de pesticidas sobre as concentrações iônicas em peixes, trabalhos com metais também mostram efeitos sobre a regulação iônica nestes animais: na exposição a  $1,1 \pm 0,04$  mg de Pb/l, após 48h a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) teve redução nas concentrações de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento nos níveis de  $\text{Mg}^{2+}$  plasmáticos (Rogers *et al.*, 2003). Na exposição a 25 e 29  $\mu\text{g}$  Cu/l por 96h, *Prochilodus scrofa* também mostrou redução nas concentrações de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e aumento na  $[\text{K}^+]$  plasmático. Relatos de aumento nos níveis de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  em peixes marinhos após exposição à prata são citados pela revisão de Wood *et al.*, (1999). No peixe estuarino *Morone saxatilis* exposto a várias concentrações de TBT por 14 dias, embora tenha ocorrido um aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, não foram evidenciadas perturbações nos níveis iônicos plasmáticos, sugerindo que mecanismos fisiológicos compensatórios estejam ativados para a manutenção das concentrações iônicas (Pinkney *et al.*, 1989). Por outro lado, a traíra *Hoplias malabaricus*, peixe dulcícola, apresentou redução nas concentrações de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$  após receber 8 doses de 0,03  $\mu\text{g}$  de TBT/g por via trófica com intervalo de 5 dias entre as contaminações (Azevedo *et al.*, dados não publicados). Vê-se assim que vários contaminantes podem interferir nos processos de regulação osmo-iônica de peixes. Para este trabalho, o ambiente contaminado em questão (ponto Contaminado 1) é esperado que ocorram maiores níveis de metais pesados e de TBT e, pelas respostas encontradas e as descrições da literatura, pode-se dizer que os bagres estão sofrendo perturbação osmótica e iônica, principalmente para os animais coletados em agosto, o que pode ser devido à maior biodisponibilidade de contaminantes nesta época, a qual poderia levar à maior

apreensão e bioacumulação de contaminantes (Fent, 1996) como também observado para as ostras em II.5.1.

As variações encontradas nos bagres do ponto Referência entre as épocas sazonais para as enzimas ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e da anidrase carbônica) devem ser decorrentes de variação de salinidade, como mostrado na Tabela 3 para abril/03 e fevereiro/04. Trabalhos relacionando a variação de salinidade e enzimas já foram descritos em I.5.

Para a osmolalidade e íons dos bagres do ponto Referência, além da variação de salinidade entre as épocas de agosto/03 e fevereiro/04, há também variação da temperatura, como indicado na Tabela 3. Efeitos associados destes dois fatores abióticos são citados na literatura para a tilápia híbrida Mozambique (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*), para as quais foi observado interação entre a temperatura e salinidade sobre a osmolalidade plasmática e concentração de cloreto e sódio. É relatado ainda que a baixa temperatura reduz a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Sardella *et al.*, 2004). Estes autores mencionam, baseando-se em outros trabalhos, que as perturbações osmorregulatórias devidas à variação de temperatura podem ser resultantes de mudanças na integridade de membrana pela alteração da estrutura lipídica das mesmas, o que vai mudar a permeabilidade para a água e íons. Tais modificações podem levar a ruptura na membrana e permitir o movimento de água e de íons através da mesma e também alterar domínios lipídicos associados ao funcionamento normal de enzimas. Assim, possivelmente os efeitos sazonais observados não apenas para os bagres, mas também para as ostras podem ser decorrentes de interações como a citada acima.

Para os bagres do ponto contaminado (Contaminado 1), considera-se também que a influência de fatores abióticos seja a principal causa das variações nas concentrações iônicas dentre as épocas, pois não houve diferenças nas concentrações

iônicas nos animais do ponto Contaminado 1 em relação àqueles do ponto Referência em ambas as épocas para o mesmo íon analisado. Porém, como já discutido para as ostras, variações em biodisponibilidade podem também estar ocorrendo devido à interação da mesma com as variações de salinidade e temperatura e pH. Uma maior biodisponibilidade poderia levar à uma maior bioacumulação de contaminantes e, conseqüentemente, ocasionar maiores efeitos biológicos.

Pelas respostas dos biomarcadores bioquímicos analisados para os bagres, não é possível prever qual época foi a mais impactada, se abril (período de outono) ou em fevereiro (período de verão). Em abril, a anidrase carbônica foi, dentre as três enzimas estudadas, a mais sensível e mostrou atividade reduzida para os animais do ponto Contaminado 1, mas não se pode afirmar que os animais responderiam também com redução de atividade da desta enzima durante fevereiro. Para os biomarcadores fisiológicos, contudo, as respostas mais evidentes de perturbação foram, semelhante às ostras, apresentadas em agosto, época de menor precipitação de chuvas para a região de Antonina, município vizinho à cidade de Paranaguá e ao Complexo Estuarino Baía de Paranaguá (Simepar on-line). Sugere-se assim, que a biodisponibilidade de contaminantes seja maior nesta época, possivelmente acarretando maior bioacumulação de contaminantes nos animais dos locais estudados. Apesar de geralmente se associar o carreamento de contaminantes de rios para estuários à abundância em chuvas, a ausência das mesmas pode, aparentemente, concentrar no sedimento contaminantes provenientes de despejos antropogênicos nos estuários, como citado para um estuário tropical mexicano, onde os maiores níveis de metais traços ocorreram na época de seca (Bahena-Manjarrez *et al.*, 2002).

## II.6. Conclusão

Para o Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, ostras e bagres responderam à contaminação principalmente com maiores atividades das enzimas estudadas, sugerindo para as ostras, que a exposição aos contaminantes não foi grande o suficiente para ultrapassar a capacidade de tolerância previamente desenvolvida para aquelas do ponto Contaminado 2, tanto para a atividade ATPásica total em agosto, como também para a anidrase carbônica em agosto e fevereiro. Para os bagres, mecanismos de tolerância, também foram evidentes para os animais do ponto Contaminado 1, tanto para a atividade ATPásica total em abril e fevereiro, como para a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em fevereiro. Houve um segundo tipo de resposta para os bagres: menor atividade enzimática da anidrase carbônica em abril, a qual é relatada na literatura como uma resposta à contaminação por diversos contaminantes. Assim, a atividade da anidrase carbônica branquial de ambas as espécies estudadas mostrou-se mais susceptível à contaminação do que as outras enzimas avaliadas, sendo considerada um biomarcador bastante responsivo para ostras e bagres.

É notável que os bagres foram muito mais responsivos à contaminação que as ostras em relação à osmolalidade e às concentrações iônicas, pois enquanto para estas houve perturbação na osmolalidade e concentrações iônica para o cloreto, sódio, potássio, magnésio e cálcio, principalmente para os coletados em agosto, para aquelas apenas foram visualizadas diferenças na osmolalidade e nos níveis de magnésio nos animais do ponto Contaminado 2, também coletados em agosto. Apesar das diferentes respostas, pode-se afirmar que houve perturbação de processos reguladores de íons em ambas as espécies. Além disso, os níveis de magnésio também foram bastante responsivos para ambas as espécies e pode ser considerado o melhor biomarcador fisiológico avaliado neste trabalho.

Assim, pelo somatório dos maiores efeitos de contaminantes observados tanto sobre os biomarcadores bioquímicos (para ostras), como para os biomarcadores fisiológicos (para ostras e bagres), sugere-se que agosto/03 foi a época mais impactada para ambas as espécies. Para as ostras, o ponto Contaminado 2 foi o mais impactado, enquanto que para os bagres, o ponto Contaminado 1 mostrou-se mais impactado que o ponto Referência (lembrando que para estes apenas estes dois pontos foram analisados). Possivelmente durante agosto a biodisponibilidade de contaminantes é maior que em fevereiro, haja vista que a menor precipitação de chuvas desta época pode favorecer uma acumulação maior de contaminantes provenientes de despejos humanos no sedimento devido à pouca diluição da água estuarina.

### **3. Conclusão Geral**

Uma vez que os biomarcadores utilizados neste trabalho não são específicos, é difícil sugerir através dos mesmos quais contaminantes têm sido os mais ocorrentes nas áreas avaliadas. Contudo, notou-se que os biomarcadores estudados foram responsivos à exposição a contaminantes: houve diferenças em mecanismos osmorregulatórios tanto em ostras, como nos bagres. Tais diferenças foram manifestadas principalmente de duas formas nas enzimas estudadas: com inibição ou aumento nas atividades destas. Em ambos os casos, há relatos na literatura de respostas semelhantes, sendo geralmente observado inibição enzimática. Aumento de atividade enzimática, porém, é sugerida na literatura como mecanismo de tolerância desenvolvida para compensar perturbações ionorregulatórias. Para os biomarcadores fisiológicos, também foram observados efeitos, principalmente nas concentrações iônicas dos bagres. A enzima anidrase carbônica foi o biomarcador bioquímico mais

responsivo, ao passo que a concentração de íons magnésio foi o melhor biomarcador fisiológico, tanto para ostras como para bagres. Através dos resultados obtidos, sugere-se para o Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, Baía de Itamaracá, PE e para o Sistema Estuarino Piraquê-açú e Piraquê-mirim, Aracruz, ES, que fevereiro/04 (período com maior precipitação de chuvas), foi a época de maior impacto dos contaminantes sobre as atividades enzimáticas de ostras. Possivelmente nesta época há maior biodisponibilidade de contaminantes em ambas as regiões, pois as chuvas podem carregar contaminantes de áreas continentais para os estuários e aumentar a turbulência deste meio, re-suspendendo contaminantes já sedimentados. Para o Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, PR, as respostas dos biomarcadores analisados em ostras e bagres foram mais indicativas de efeitos para os animais coletados em agosto/03, possivelmente por maior biodisponibilidade de contaminantes nesta época.

#### 4. Referências Bibliográficas

Alves, S.R.C., Severno, P.C., Ibbotson, D.P., Sáens, L.A., Bainy, A.C.D., 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. Marine Environ. Research. 54, 241-245.

APPA on-line (Administração dos Portos de Paranaguá e Antonina). URL: <http://www.pr.gov.br/portos>. Atualizado em 28/01/2005.

Avella, M., Berhaut, J., Bornancin, M., 1993. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. J. Fish Biol. 42, 243-254.

Bahena-Manjarrez, J.L., Rosales-Hoz, L., Carranza-Edwards, A., 2002. Spatial and temporal variation of heavy metals in a tropical estuary. Environmental Geology 42, 575-582.

Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C. M., Walsh, P. J., 2005. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. Aquat. Toxicol. 72, 67-82.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254.

Brooks, S.J., Mills, C.L., 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. 135A, 527-537.

Buckler, D.R., Tillitt, D.E., 1992. Biochemical and physiological indicators of contaminant stress in aquatic organisms of large river systems. Em: Schoettger, R.A. (Ed.) Problems of Aquatic Toxicology Biotesting and Water Quality Management – Proceedings of USA-RUSSIA Symposium, Borok, Jaroslavl Oblast, July 21-23, 1992. Ecosystems Research Division, Athens, pp. 162-174.

Cataldi, E., Ciccotti, E., Di Marco, P., Di Santo, O., Bronzi, P., Cataudella, S., 1995. Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: morpho-physiological descriptors. *J. Fish Biol.* 47, 609-618.

Cavalcanti, 2003. Monitoring of trace elements in oysters marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. *Cad. Saúde Publica.* 19, 1545-1551.

Comoglio, L., Amin, O., Roque, A., Betancourt-Lozano, M., Anguas, D., Haro, B.M., 2004. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* In press.

CEPTEC on-line (Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos). URL: [http://www.cptec.inpe.br/clima/monit/monitor\\_brasil.shtml](http://www.cptec.inpe.br/clima/monit/monitor_brasil.shtml). Atualizado em 20/04/2005

Cuzzuol, M.G.T., Lima R.N., 2003. Análise da sensibilidade física da área de proteção ambiental do Goiapaba-açú (Fundão-ES): Subsídios ao zoneamento ambiental. *Natureza on line.* 1, 28-36.

Evans, D.H., 1993. Osmotic and ionic regulation. Em: Evans, D. H. (Ed.) *The Physiology of Fishes.* Marine Science Series. CRC Press, Boca Raton, pp. 315-337.

Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1-117.

Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.* 140-141, 353-365.

Fishbase on-line, 2005. URL: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org). Atualizado em 28/01/2005.

Freire, C.A., Kinne-Saffram, E., Beyenbach, K.W., Kinne, R.K.H., 1995. Na-D-glucose cotransport in renal brush-border membrane vesicles of early teleost (*Onconhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.* 269, 592-602.

Galindo-Reyes, J.G., Dalla Venezia, L., Lazcano-Alvarez, G., Rivas-Mendoza, H., 2000. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere* 40, 233-237.

Gilbert, A.L., Guzmán, H.M., 2001. Bioindication potential of carbonic anhydrase activity in anemones and corals. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 742-744.

Gomes, C.A.A., Dos Santos, P. J. P., Alves, T. N. C., Rosa-Filho, J. S., Souza-Santos, L.P, 2002. Variação temporal da meiofauna em área de manguezal em Itamaracá – Pernambuco. *Atlântica, Rio Grande.* 24, 89-96.

Grosell, M., Hogstrand, C., Wood, C.M., Hansen, H.J.M., 2000. A nose-to-nose comparison of the physiological effects of exposure to ionic silver versus silver chloride in the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol. Amsterdam.* 48, 327-342.

Harris, R.R., Santos, M.C. F., 2000. Heavy Metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 137, 691-703.

Heisler, N., 1993. Acid-base regulation. Em: Evans, D.H. (Ed.) *The Physiology of Fishes. Marine Science Series.* CRC Press, Boca Raton, pp. 343-378.

Henry, R.P., 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 991-1002.

Henry, R.P., Cameron, J.N., 1983. The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes Sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus Lateralis*. *J. Exp. Biol.* 103, 205-223.

Henry, R.P., Gehrich, S., Weihrauch, D. Towle, D. W., 2003. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 136A, 243-258.

IBGE on-line (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). URL: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Atualizado em 28/01/2005.

IDEC on-line (Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor). URL: [http://www.idec.org.br/rev\\_servicosambiente.asp](http://www.idec.org.br/rev_servicosambiente.asp). Atualizado em 04/04/2005.

Jagoe, C.H., Shaw-Allen, P.L., Brundage, S., 1996. Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from three reservoirs with different levels of mercury contamination. *Aquatic Toxicol.* 36, 161-176.

Jobling, M., 1995. Osmotic and ionic regulation – water and salt balance. Em: Jobling, M. *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series 16. Chapman & Hall, London, pp. 211-249.

Katewa, S. D., Katyare, S., 2003. A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays *Anal. Biochem.* 323, 180-187.

Kennish, M.J., 1991. Anthropogenic Impacts on Estuaries. Em: Kennish, M. J. (Ed). *Ecology of Estuaries*. vol 2: Biological Aspects CRC Press, Boca Raton, pp. 1-8.

Ketchum, B.H., 1983. Estuaries Characteristics. Em: *Ecosystems of the World – Estuaries and Enclosed Seas*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-14.

Kolm, H.E., Schoenenberger, M.A., Piemonte, M.R., Souza, P.S.A., Schnell e Scühli, G., Mucciato, M.B., Mazzuco, R., 2002. Spatial variation of bacteria in surface waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. *Bras. Arch. Biol. Tech.* 45, 27-34.

Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat. Toxicol.* 48, 561-571.

Lionetto, M.G., Maffia, M., Cappello, M.S., Giordano, M. E., Storelli, C., Schettino, T., 1998. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A, 89-91.

Mancera, E., Mendo, J., 1996. Population dynamics of the oyster *Crassostrea rhizophorae* from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Fish. Res.* 26, 139-148.

Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Bras. J. Biol.* 62, 621-631.

McCarthy, J.F. & Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. Em: McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. (Eds.) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 3-16.

McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. Em: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds.) *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Fish Physiology Series. Academic Press, San Diego, pp. 285-315.

McDonald, D.G., Wood, C.M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. Em: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.) *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London. Fish and Fisheries Series 9. pp 297-321.

Medeiros, C., Kjerfve, B., 1993. Hidrology of a tropical estuarine system: Itamaracá, Brazil. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 36, 495-515.

Meyer, U., Hagen, W., Medeiros, C., 1998. Mercury in a northeastern Brazilian mangrove area, a case study: potential of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* as bioindicator for mercury. *Mar. Biol.* 131, 113-121.

Milênio do Mar on-line, 2005. URL: <http://www.mileniodomar.org.br>. Atualizado em 28/01/2005.

Neufeld, G.J., Holliday, C.W., Pritchard, J.B., 1980. Salinity adaption of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211, 215-224.

Neufeld, G.J., Pritchard, J.B., 1979. Osmoregulation and gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>, ATPase in the rock crab, *Cancer irroratus* : response to DDT. Comp. Biochem. Physiol. 62C, 165-172.

Nipper, M.G., 1990. Problemas de poluição em organismos bentônicos. Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 3, 24-42.

Odum, E.P., 1988. Ecologia. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Péqueux, A., Bianchini, A., Gilles, R., 1996. Mercury and osmoregulation in euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 149-155.

Pinkney, A.E., Wright, D.A., Jepson, M.A., Towle, D.W., 1989. Effects of tributyltin compounds on ionic regulation and gill atpase activity in estuarine fish. Comp. Biochem. Physiol. 92C, 125-129.

Plaut, I., 1998. Comparison of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. Fish Physiol. Biochem. 19, 181-188.

Plaza-Yglesias, M., Laufer, M., Herrera, F.C., 1988. Ionic and osmotic regulation in blood, aqueous humor, gills and retina in the euryhaline fish, *Eugerres Plumieri*. Comp. Biochem. Physiol. 89A, 377-382.

Prodocimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 262,243-253.

Prosser, C.L., 1973. Comparative animal physiology. 3ed. W. B. Philadelphia: Saunders Co.

Randall, D., Burggren, W., French, K., 2002. Equilíbrio Osmótico e Iônico. Em: Randall, D., Burggren, W., French, K. (Eds.) Fisiologia Animal - Mecanismos e

Adaptações. Eckert. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 531-581.

Rogers, J. T., Richards, J. G., Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215-234.

Romão, S. Freire, C.A., Fanta, E., 2001. Ionic Regulation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. *J. Fish Biol.* 59, 463-468.

Sardella, B. A., Cooper, J., Gonzalez, R.J., Brauner, C.J., 2004. The effect of temperature on juvenile Mozambique tilapia hybrids (*Oreochromis mossambicus* x *O. Urolepis hornorum*) exposed to full-strength and hypersaline seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 137A, 621-629.

Schmidt-Nielsen, K., 1996. *Fisiologia Animal – Adaptações e Meio Ambiente*. Ed. Santos, São Paulo.

Silva, C.A.R., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Santos, Z.L., 2001. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Res.* 35, 4072-4078.

SIMEPAR on-line (Instituto Tecnológico SIMEPAR). URL: <http://www.simepar.br/>.  
Atualizado em 20/04/2005.

Singh, N.N., Das, V.J., Srivastava, A. K., 2002. Insecticides and ionic regulation in teleosts: a review. *Zoologica Poloniae.* 47, 21-36.

Skaggs, H.S., Henry, R.P., 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 605-612.

Swenson, E.R., 2003. A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. *Comp. Biochem. Physiol.* 136A, 229-241.

Venturini, G., Cataldi, E., Marino, G., Pucci, P., Garibaldi, L., Bronzi, P., Cataudella, S., 1992. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces, Perciformes) during acclimation trials to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A, 451-454.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 121-129.

Webb, N.A., Shaw, J. R., Morgan, J., Hogstrand, C., Wood, C. M., 2001. Acute and chronic physiological effects of silver exposure in three marine teleosts. *Aquat. Toxicol.* 54, 161-178.

Wilson, R.W., Wilson, J. M., Grosell, M., 2002. Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish – why and how? *Biochim. Biophys. Acta.* 1566, 182-193.

Wood, C.M., Playle, R.C., Hogstrand, C., 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 71-83.

Zachariassen, K.E., Aunaas, T., Borseth, J.F., Einarson, S., Nordtung, T., Olsen, A., Skjervo, G., 1991. Physiological Parameters in Ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 77-79.