

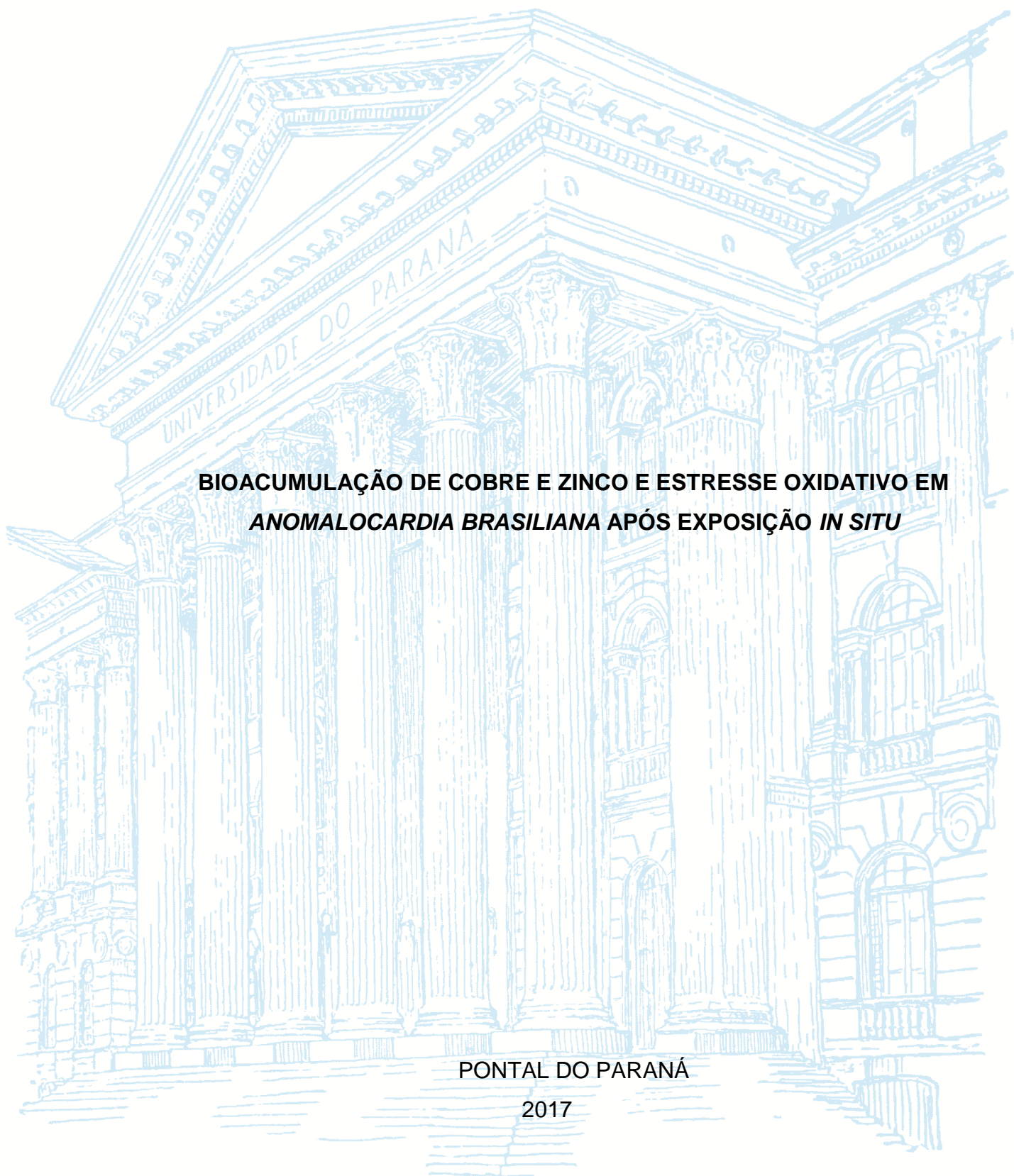
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO MARCENO DE OLIVEIRA

**BIOACUMULAÇÃO DE COBRE E ZINCO E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
*ANOMALOCARDIA BRASILIANA* APÓS EXPOSIÇÃO *IN SITU***

PONTAL DO PARANÁ

2017



GUSTAVO MARCENO DE OLIVEIRA

**BIOACUMULAÇÃO DE COBRE E ZINCO E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
*ANOMALOCARDIA BRASILIANA* APÓS EXPOSIÇÃO *IN SITU***

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel, Curso de Oceanografia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sandrini-Neto  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Fernanda Maria de Souza

PONTAL DO PARANÁ

2017

## TERMO DE APROVAÇÃO

Gustavo Marceno de Oliveira

### **"BIOACUMULAÇÃO DE COBRE E ZINCO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *ANOMALOCARDIA BRASILIANA* APÓS EXPOSIÇÃO *IN SITU*"**

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela  
Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Maikon Di Domenico - CEM/UTPR



Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior - CEM/UFPR



Prof. Dr. Leonardo Sandrini Neto  
Presidente

Pontal do Paraná, 08/12/2017

## AVALIAÇÃO DE MONOGRAFIA

Curso de Graduação em Oceanografia

Gustavo Marceno de Oliveira

**“BIOACUMULAÇÃO DE COBRE E ZINCO E ESTRESSE  
OXIDATIVO EM *ANOMALOCARDIA BRASILIANA* APÓS  
EXPOSIÇÃO *IN SITU*”**

Comissão Avaliadora:

NOTA

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Maikon Di Domenico - CEM/UFPR

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luiz Laureno Mafra Júnior - CEM/UFPR

10  
10,0

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Leonardo Sandrini Neto  
Presidente

NOTA FINAL = 10

Pontal do Paraná, 08/12/2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os coparticipantes desta viagem.

Primeiramente agradeço aqueles que foram os mentores deste trabalho, o qual sem eles não seria possível.

Ao Leonardo Sandrini que me aceitou como orientado no final do segundo tempo. Sua dedicação e paciência me inspiram, sua atuação é um exemplo de profissionalismo.

A Fer, por me orientar desde o começo do curso, tendo paciência e ensinado este mancebo a ser um oceanógrafo. Estar com você e com Eli foi crucial para minha formação acadêmica e pessoal.

A banca da minha defesa, Maik e Mafra que aceitaram o convite e dispuseram de tempo para me avaliar e aconselhar.

Ao corpo docente do CEM... são muitos...

Aos amigos, também são muitos, mas... Pepe, Rafa's, Yuri, Oda, Alotoni, Azaghal, Briggs, Marcus, João's, Lucas's, Pedro's, Diogo (esse muleke é hiperativo, sabe?!), Angel, Taw, Laíza, Ilara, Julião, Lígia, Bruno, Drika, Thay, Diego, etc...

Ao Bruno Gabriel Costelini, o melhor bibliotecário que já conheci.

A Luiza-swan, pela confiança, amizade sincera e sopa de batata.

A todos os outros que não citei, sinta-se agradecido também, ao vê-los na rua, com certeza reconhecerei e lhes cumprimentarei. Até mais e obrigado pelos peixes!

“Kaizoku ou ni ore wa naru!”

Monkey D. Luffy

## RESUMO

A contaminação por metais em ambientes aquáticos é um problema recorrente, que tem se intensificado com o crescimento industrial e a urbanização de regiões costeiras. Este trabalho teve como objetivo analisar a bioacumulação de metais e estresse oxidativo em *Anomalocardia brasiliiana* após exposição a cobre e/ou zinco por meio de um experimento manipulativo de campo com 30 dias de duração. Foram analisadas as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e níveis de peroxidação de lipídios (LPO). A hipótese testada foi que os níveis de bioacumulação e a atividade dos biomarcadores analisados seriam significativamente maiores nos tratamentos manipulados, conforme o aumento no tempo de exposição aos metais. Doze unidades experimentais foram aleatoriamente dispostas em dois baixios de maré situados na Baía de Paranaguá (sul do Brasil). Foram aleatoriamente alocados quatro tratamentos (3 unidades para cada tratamento) às unidades experimentais: contaminação por Zinco (Zn), contaminação por Cobre (Cu), contaminação combinada por Cobre e Zinco (CZ), e sedimento não manipulado (NM). Em cada unidade experimental foram dispostas duas gaiolas com 5 bivalves cada, expostos ao contaminante para determinação dos níveis de bioacumulação e estresse oxidativo. Não foram detectadas diferenças significativas nas taxas de bioacumulação e na resposta dos biomarcadores entre tratamentos experimentais e tempos de exposição que pudessem ser inequivocamente atribuídas à adição dos metais *in situ*. Diferenças na concentração de cobre estiveram relacionadas a variabilidade espacial dos baixios detectada pela ANOVA. Diferenças na concentração de zinco foram mais complexas e dependeram da interação entre tratamentos, tempos e baixios.

Palavras-chave: Bioacumulação. Estresse oxidativo. *Anomalocardia brasiliiana*. Experimento manipulativo. Baía de Paranaguá.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the bioaccumulation and oxidative stress biomarkers in *Anomalocardia brasiliiana* after exposure to copper and/or zinc in a field manipulative experiment. Were analyzed the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e lipid peroxidation levels (LPO). We tested the hypothesis that the levels of metal accumulation and the biomarker response would be significantly larger in manipulated treatments at longer exposure times. Twelve experimental units were randomly disposed in two tidal flats in the subtropical estuary o Paranaguá Bay (southern Brazil). Four treatments were assigned randomly to the experimental units (3 units per each treatment): contamination by zinc (Zn), contamination by copper (Cu), combined contamination by copper and zinc (CZ), and undisturbed sediment (NM). In each experimental unit, two cages containing 5 bivalves each were placed. No significant differences were detected in the bioaccumulation levels and biomarker responses among experimental treatments and time of exposition that could be unequivocally attributed to addition of metals in situ. Differences in the concentration of copper were related to the spatial variability as an effect of tidal flats in ANOVA. Differences in the concentration of zinc were more complex and depended on the interaction among treatments, time and tidal flats.

Keywords: Bioaccumulation. Oxidative stress. *Anomalocardia brasiliiana*. Manipulative experiment. Paranaguá Bay.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	MAPA DA ÁREA DE ESTUDO. COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ REGIÃO SUL DO BRASIL E AS ÁREAS USADAS NO EXPERIMENTO .....	12
FIGURA 2 -	A) GAIOLAS PARA EXPERIMENTO COM BIVALVES. B) BIVALVES MARCADOS .....	14
GRÁFICO 1 -	CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO NOS ORGANISMOS <i>ANOMALOCARDIA BRASILIANA</i> .....	18
GRÁFICO 2 -	ATIVIDADE DAS ENZIMAS .....	20, 21, 22

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA TRIFATORIAL DAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO EM <i>A. BRASILIANA</i>	19
TABELA 2 -	TESTES SNK PARA A INTERAÇÃO TR X TE X BA APÓS ANOVA DAS CONCENTRAÇÕES DE ZN EM <i>A. BRASILIANA</i>	19
TABELA 3 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA TRIFATORIAL DAS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES EM <i>A. BRASILIANA</i> .....	23
TABELA 4 -	TESTES SNK PARA A INTERAÇÃO TR X BA APÓS ANOVA DA ATIVIDADE DA GPX EM <i>A. BRASILIANA</i> .....	23

## LISTA DE ABREVIações

B1	-	Baixio 1
B2	-	Baixio 2
BA	-	Baixio
BSA	-	Soro de albumina bovina
CAT	-	Catalase
CDNB	-	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CU	-	Cobre
CZ	-	Cobre e zinco
EPA	-	Environmental Protection Agency
ERO	-	Espécies Reativas de Oxigênio
EU	-	Unidade experimental
GPx	-	Glutathione peroxidase
GSH	-	Glutathione reduzida
GST	-	Glutathione s-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Peróxido de hidrogênio
LPO	-	Peroxidação lipídica
SOD	-	Superóxido dismutase
NM	-	Não manipulado
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	Radicais superóxido
SNK	-	Student Newman-Keuls
TE	-	Tempo
TR	-	Tratamento
ZN	-	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>12</b>
3. 1 ÁREA DE ESTUDO .....	12
3. 2 EXPERIMENTO.....	13
3. 3 PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO .....	15
3. 3. 1 Bioacumulação .....	15
3. 3. 2 Biomarcadores bioquímicos .....	15
3. 4 ANÁLISE DE DADOS .....	16
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
4. 1 BIOACUMULAÇÃO .....	17
4. 2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	19
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
5. 1 BIOACUMULAÇÃO .....	24
5. 2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	24
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cobre e zinco são micronutrientes essenciais aos organismos vivos desempenhando papel fundamental no crescimento, desenvolvimento, mecanismos de regulação celular, e no controle homeostático (CHASAPIS, 2011; RINGWOOD, 1998). Contudo, em excesso, esses elementos traços desregulam o metabolismo e podem provocar danos à saúde do organismo (RAINBOW, 2006). Embora, esses metais ocorram naturalmente no ambiente aquático, atividades antrópicas como o despejo de efluentes industriais e domésticos contribuem para o aumento das suas concentrações (KENNISH, 2002).

A contaminação por metais pode ser avaliada por meio da bioacumulação e análise de estresse oxidativo em organismos expostos. A análise desses parâmetros permite verificar efeitos subletais dos contaminantes em nível suborganísmico, antes que estes se manifestem em níveis de organização biológica superior, como populações e comunidades.

A bioacumulação de metais em organismos vivos, em geral, reflete o grau de contaminação de um ambiente (CAMBEK, 2007), contudo essa acumulação é mediada tanto por fatores abióticos quanto bióticos, pois estes interferem na assimilação do elemento (RAJOTE et al., 2003).

O uso de biomarcadores de estresse oxidativo exerce um importante papel na avaliação de impactos e no monitoramento ambiental, pois mudanças nas defesas antioxidantes têm sido frequentemente associadas a exposição à contaminantes (VAN DER OORST, 2003). A poluição por metais pode realçar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo ao estresse oxidativo (VAN DER OOST, 2003). A geração de ERO é um processo fisiológico contínuo que pode se intensificar com a presença de contaminantes. Estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO que causam dano celular, e ativação das defesas antioxidantes, com favorecimento da primeira (ABELE;PUNTARULO, 2004).

Alguns biomarcadores se manifestam em resposta a tipos específicos de compostos tóxicos de acordo com seu mecanismo de defesa, enquanto outros se manifestam em resposta à presença de diversos contaminantes (SANNI et al., 2017). Algumas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD),

catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), assim como defesas não-enzimáticas como níveis de glutathione reduzida (GSH), são importantes para proteção das células contra compostos xenobióticos (LÜCHMAN et al., 2011). A glutathione S-transferase (GST) atua como um antioxidante indireto, pois age nos processos de detoxificação celular, eliminando os subprodutos das ERO (BOUTET et al., 2004). Essas defesas, entretanto, podem não ser eficientes o suficiente para prevenir danos oxidativos no organismo em termos de peroxidação de lipídios (LPO) (TURJA et al., 2013; ZANETTE et al., 2015). A SOD, por sua vez, é descrita como sendo uma das enzimas mais ativas, com tempo de resposta relativamente rápido (LÜCHMAN et al., 2011).

Devido à alta capacidade de bioacumulação, bivalves têm um potencial significativo como bioindicador para monitoramento de metais (ZUYKOV, 2013). A determinação dos níveis de bioacumulação, bem como a ativação de defesas antioxidantes, têm sido frequentemente realizada em bivalves para se avaliar a contaminação ambiental, devido às características fisiológicas e comportamentais que os tornam bons bioindicadores (BLASCO et al., 2008; SARDI et al., 2016; VIDAL-LIÑÁN et al., 2010; TURJA et al., 2014). *Anomalocardia brasiliiana* é um molusco filtrador, resistente a variações ambientais e é amplamente distribuído pela costa brasileira, principalmente em enseadas, baías e estuários (BOEHS et al., 2008; SANDRINI-NETO, 2016).

Neste trabalho foi analisada a bioacumulação isolada e combinada de cobre e zinco, bem como avaliada a resposta de biomarcadores de estresse oxidativo no bivalve *A. brasiliiana* durante um experimento manipulativo de campo. Foi testada a hipótese de que a concentração de metais nos tecidos e a resposta dos biomarcadores seriam significativamente maiores nos tratamentos experimentais em relação aos controles não-manipulados conforme o aumento no tempo de exposição.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os metais estão entre os contaminantes inorgânicos mais abundantes em ambientes aquáticos. Ao contrário dos compostos orgânicos, os metais não podem ser degradados e se acumulam nos sedimentos e organismos (BERTIN; AVERBECK, 2006; SEEBAUGH et al., 2005). Os metais são lançados nos ambientes marinhos a partir de diversas atividades antrópicas, tais como o despejo de efluentes industriais e domésticos, mineração, processamento de minérios, queima de combustíveis fósseis e lixiviação de áreas urbanas e lixões (FORSTNER, 1980). Como consequência, as concentrações de metais em áreas poluídas próximas a centros urbanos são maiores do que em áreas não urbanizadas (STARK, 1998). Embora muitos metais sejam elementos essenciais, quando em altas concentrações podem se tornar tóxicos e causar impactos persistentes às comunidades bênticas.

A toxicidade dos metais varia de acordo com diversas características do ambiente de entorno, como a espécie química disponível, salinidade, pH e temperatura. Além disso, interações entre diferentes contaminantes, processos ecológicos como competição, migração, recrutamento, e a variabilidade física do ambiente podem afetar a acumulação, persistência e toxicidade de muitos contaminantes e modificar as respostas das comunidades ante um agente tóxico. Com isso, os efeitos encontrados em laboratório podem ser diferentes dos que ocorrem na natureza (JOHNSTON; KEOUGH, 2003). Os impactos causados por um distúrbio podem variar também em função de diferenças de sensibilidade entre as espécies e na estrutura e composição das comunidades entre locais e tempos distintos (LINDEGARTH; HOSKIN, 2001). Além disso, organismos podem desenvolver tolerância a distúrbios específicos, tornando difícil a predição de impactos ecológicos dos contaminantes em testes de toxicidade em laboratório (KLERKS; LEVINTON, 1993).

Muitos estudos mostram efeitos negativos quando são realizados em laboratório e/ou em uma única espécie ou população. Estes experimentos, no entanto, não refletem as condições complexas às quais os organismos estão naturalmente sujeitos, como interações intra- e interespecíficas, e as alterações físicas e químicas naturais do ambiente (UNDERWOOD; PETERSON, 1988). Em

revisão feita por Mayer-Pinto et al. (2010), observou-se que os efeitos de metais em comunidades, quando detectados, variam muito entre tempos e locais, e fatores externos são usualmente responsáveis por grande parte da variação encontrada, dificultando a predição dos efeitos dos metais sobre as comunidades.

Estudos em campo tem a vantagem de que todas as variáveis, exceto a que está sendo manipulada, podem variar naturalmente. Neste sentido, muitos estudos em micro- e mesocosmos tem sido realizados para investigar os efeitos da poluição por metais (BUFFET et al., 2014), buscando criar uma condição mais próxima da natural para testar a toxicidade. Contudo, nestes estudos, assim como nos estudos de laboratório, muitas variáveis são mantidas constantes e podem não variar naturalmente. No mesocosmo pode ocorrer diferenças nas propriedades do sedimento e da água intersticial, comparadas com as condições naturais, além das diferenças no número de espécies e a impossibilidade de recrutamento de novos organismos (BERGE et al., 1986).

As evidências de impactos por metais sobre a macrofauna bêntica em campo surgem principalmente da observação de padrões correlativos. No Brasil, diversos trabalhos utilizaram as respostas da macrofauna bêntica na avaliação da contaminação por metais: Buruaem et al. (2013) avaliaram a qualidade dos sedimentos em áreas portuárias de Santos através da análise integrada entre testes de toxicidade, teores de metais traço, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e estrutura da comunidade bêntica; Paixão et al. (2010) avaliaram a qualidade dos sedimentos de manguezais na Baía de Camamu (Bahia) através das relações entre a comunidade bêntica e a biodisponibilidade de metais traço; Hatje et al. (2006) avaliaram a contaminação dos sedimentos e seus efeitos sobre a macrofauna bêntica em uma área próxima ao depósito de uma fundição no sistema estuarino de Subaé (Bahia). Na Baía de Paranaguá (Paraná), Choueri et al. (2009) avaliaram a qualidade dos sedimentos através das características físico-químicas, testes de toxicidade e análise da comunidade bêntica. Estudos correlativos, contudo, não demonstram relações de causalidade entre o grau de contaminação e as alterações observadas (MAYER-PINTO et al., 2010).

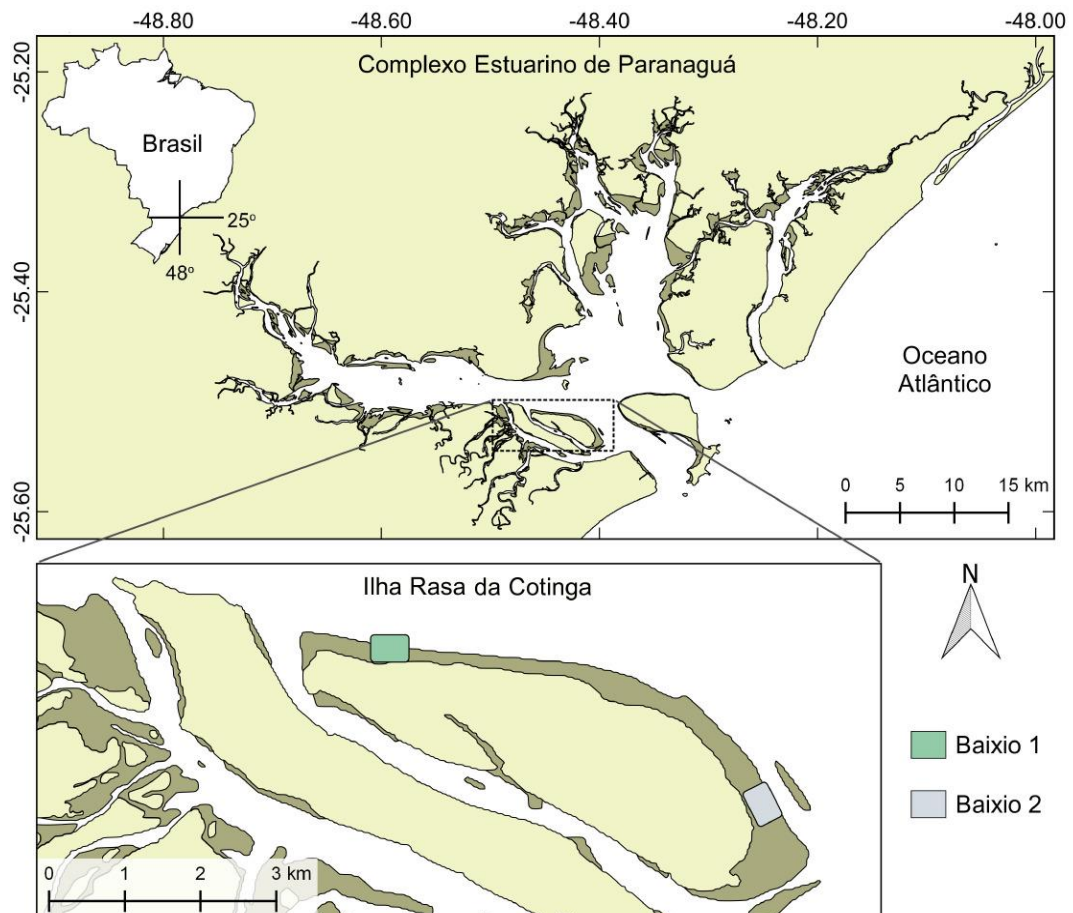


### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) está localizado na costa sul do Brasil ( $25^{\circ} 03' S$ ;  $48^{\circ} 25' W$ ), e é um dos maiores e mais preservados sistemas estuarinos da América do Sul (SANTOS, 2017). Seu ecossistema é composto de grande diversidade de habitats como os manguezais, costas rochosas e planícies de maré (LANA et al., 2001). A área de estudo do presente trabalho se encontra na Ilha Rasa da Cotinga, localizada no setor euhalino do setor do estuário. Para a realização do experimento foram escolhidos dois baixios de maré, um na parte norte da ilha ( $25^{\circ}30'36.81''S$ ,  $48^{\circ}27'16.89''W$ ) e outro na parte sul ( $25^{\circ}31'34.24''S$ ,  $48^{\circ}24'21.09''W$ ), ambos com características hidrodinâmicas e granulométricas similares (FIGURA 1).

FIGURA 1 - MAPA DA ÁREA DE ESTUDO. COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ REGIÃO SUL DO BRASIL E AS ÁREAS USADAS NO EXPERIMENTO.



### 3.2 EXPERIMENTO

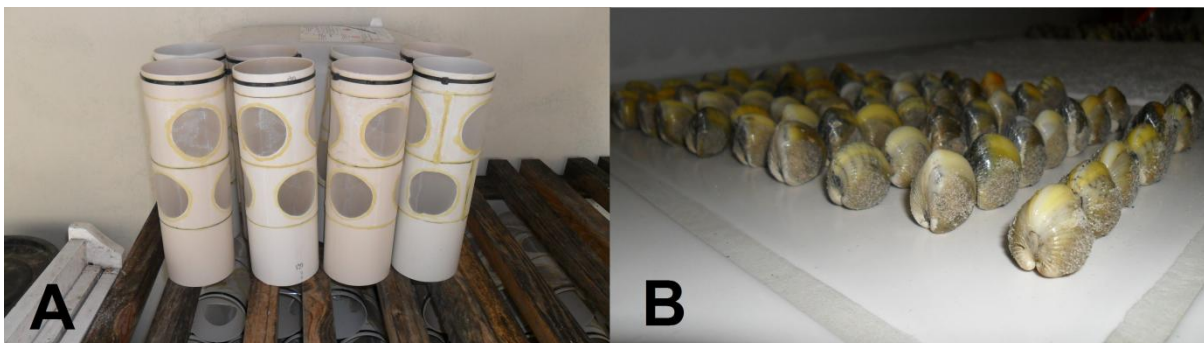
As unidades de sedimento manipulado foram produzidas por contato com blocos de gesso contaminados, enterrados no sedimento. Para a obtenção desses blocos de gesso fez-se uma solução de água deionizada, gesso e sulfato de zinco e/ou sulfato de cobre referente a cada tratamento determinado, de acordo com o método descrito por Morrissey et al. (1996) e Lindegarth e Underwood (1999, 2002). Para a implementação do experimento, doze unidades experimentais (UE) foram aleatoriamente dispostas em cada um dos dois baixios de maré. Estas unidades eram compostas por quatro tratamentos: contaminação por Zinco (Zn), composta de 200g de sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 350 g de gesso e 450 ml de água deionizada; contaminação por Cobre (Cu), composta de 200 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 350 g de gesso e 450 ml de água deionizada; contaminação combinada por Cobre e Zinco (CZ), composta de 100 g de sulfato de cobre, 100g de sulfato de zinco, 350g de gesso e 450 ml de água deionizada e; sedimento não manipulado (NM) no qual não houve alocação de blocos com gesso. A área de cada UE possuía de 1 metro de diâmetro envolto por seis blocos de gesso. Os blocos foram enterrados a 10 cm de profundidade. Esta técnica teve a finalidade de contaminar o interior do círculo de cada tratamento, de onde foram tomadas as amostras, por meio da dissolução do gesso. Trinta dias após a implementação das unidades experimentais, foi selecionada aleatoriamente uma unidade experimental de cada tratamento para alocação das gaiolas. As gaiolas consistiam de uma secção de tubo de PVC com 10 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, com seis furos nas laterais cobertos com malha de 300  $\mu m$ , tanto nas laterais quanto na parte superior (FIGURA 2A), impedindo que os organismos migrassem com a oscilação maré, mas que ainda esteja sob sua influência.

Os indivíduos de *A. brasiliiana* foram manualmente coletados em um baixio afastado da área onde foram implementadas as unidades experimentais, mais ao sul da Ilha Rasa da Cotinga (25°32'01.23"S, 48°24'12.58"W), e transportadas ao laboratório em sacos plásticos com água do local. Os organismos foram aclimatados em bacias com água do campo e sedimento, com aeração por 24 horas. Após o período de aclimação foram selecionados apenas organismos saudáveis, com tamanho médio entre 18 e 24 mm (eixo ântero-posterior).

As conchas dos organismos utilizados no experimento foram marcadas para facilitar sua identificação dos demais bivalves presentes na área de estudo. Para tanto, as conchas foram secas por 15 minutos e depois marcadas com cianoacrilato e areia fina (180  $\mu\text{m}$ ). O cianoacrilato foi colado no meio de valva, e em seguida fixado com areia fina (FIGURA 2B). Após a fixação, as conchas foram lavadas com água destilada e colocadas em potes com água do campo para retirar o excesso de cianoacrilato, a água foi trocada a cada 15 minutos por 3 vezes. Posteriormente, os organismos foram colocados em bacias com água do campo, que foi trocada a cada 12 horas até retornarem ao campo.

Dentro de cada gaiola foram colocados cinco indivíduos de *A. brasiliiana* marcados. Duas gaiolas foram alocadas dentro do círculo dos tratamentos. As coletas foram realizadas em três tempos: 48 horas, 15 e 30 dias após a implementação das gaiolas. O delineamento foi replicado em dois baixios (B1, B2) de entremaré.

FIGURA 2 – A) GAIOLAS PARA EXPERIMENTO COM BIVALVES. B) BIVALVES MARCADOS.



FONTE: O autor (2017)

Em cada tempo, foi aleatoriamente selecionada uma gaiola por tratamento. O sedimento coletado das gaiolas, juntamente com os bivalves, foi armazenado em sacos plásticos com água do local. Também foram coletadas amostras para análise de metais. Uma amostra de cada tratamento foi coletada aleatoriamente em cada tempo para analisar as concentrações de metais nas unidades amostrais.

### 3.3 PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO

#### 3.3.1 Bioacumulação

Para a análise de bioacumulação de metais em *A. brasiliiana* foram dissecados dois indivíduos por gaiola. Os indivíduos foram lavados com água do local filtrada em malha de 63  $\mu\text{m}$ , acondicionados em potes plásticos com água do local por 24 horas para depuração. Após a depuração, os animais foram secos e congelados em freezer por 3 horas para facilitar a abertura das conchas com espátulas de plástico. Posteriormente, os organismos foram dissecados em bandejas sobre blocos de gelo. Todo o tecido mole foi retirado e armazenado em microtubos tipo eppendorf etiquetados e congelados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

As amostras de tecido seco foram submetidas à digestão ácida assistida por microondas através do método EPA 3052 (1996) utilizando 9,0 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 65%; Merck). Os extratos foram reservados para a determinação dos metais traço por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado em um Optima 7000 DV ICP-OES (PerkinElmer). A validação analítica foi efetuada através da utilização do material de referência certificado ERM CE278K-8G Mussel Tissue.

#### 3.3.2 Biomarcadores bioquímicos

Os indivíduos de *A. brasiliiana* foram lavados com água do local filtrada em malha 63  $\mu\text{m}$  e depois dissecados em bandejas sobre blocos de gelo usando um bisturi. A glândula digestiva de cada indivíduo foi separada, armazenada em microtubo tipo eppendorf e congelada em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para determinação dos biomarcadores bioquímicos, glândulas digestivas de três indivíduos (totalizando aproximadamente 100 mg) foram homogeneizadas (1:10 w/v) em buffer de fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0), com auxílio de um homogeneizador IKA T10 Ultra-Turrax. O homogenato foi centrifugado a 15.000g por 30 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante aliqotado em microtubos tipo eppendorf e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi usado para quantificar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO). Esses

biomarcadores foram escolhidos com base em estudos anteriores sobre os efeitos de metais em organismos marinhos (GERACITANO et al., 2004; MONSERRAT et al., 2007; SANDRINI et al., 2008).

A concentração de proteínas no homogenato foi medida a 595 nm pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), usando BSA (soro de albumina bovina) como padrão. A atividade da SOD foi determinada a 440 nm pelo método proposto por Gao et al. (1998), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalo. A atividade de CAT foi medida pelo método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) exógeno pela CAT. A atividade da GST foi determinada a 340 nm pelo método de Keen et al. (1976), com base na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno) com a glutathiona reduzida (GSH). A atividade da GPx foi medida a 340 nm conforme Hafeman et al. (1974). Os níveis de LPO foram determinados através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (JIANG et al., 1992), com leitura a 570 nm.

### 3.4 ANÁLISE DE DADOS

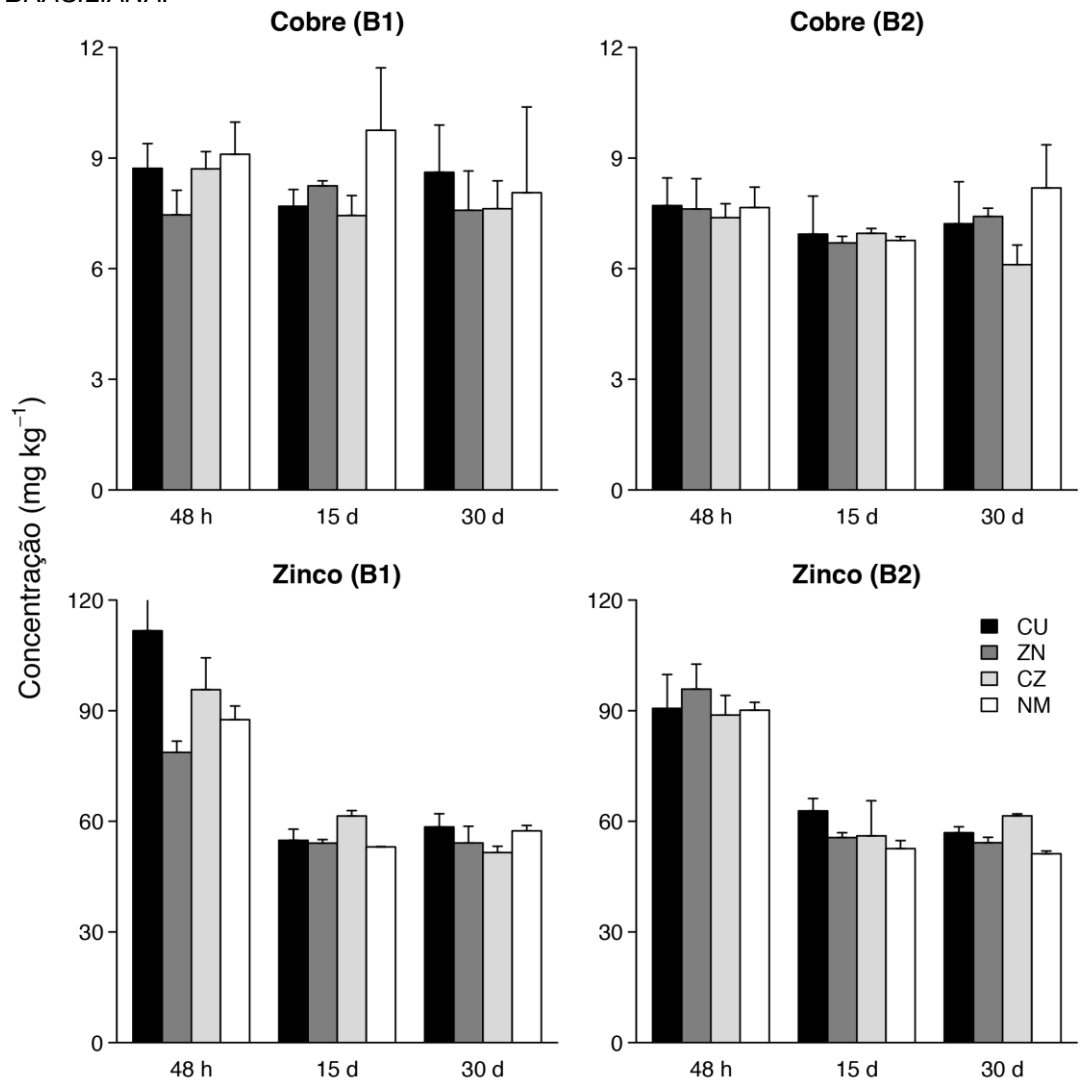
Os efeitos da contaminação por Cu e/ou Zn nos níveis de bioacumulação e nas respostas dos biomarcadores em *A. brasiliiana* foram analisados por uma análise de variância (ANOVA) com três fatores ortogonais: Tratamento (Tr, fixo, 4 níveis: adição de cobre, adição de zinco, adição de cobre e zinco, controle não-manipulado), Tempo (Te, fixo, 3 níveis: 48 h, 15 d, 30 d) e Baixo (Ba, aleatório, 2 níveis: B1, B2). A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente. Quando estes pressupostos não foram atendidos, os dados foram transformados para log. As diferenças entre as médias nos termos significativos foram identificadas por meio do teste de SNK (Student-Newman-Keuls). Todas as análises estatísticas e gráficos foram geradas na linguagem R (R CORE TEAM, 2017) com auxílio do pacote GAD (SANDRINI-NETO & CAMARGO, 2012).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 BIOACUMULAÇÃO

Não foi detectado um aumento significativo da concentração dos metais (em  $\text{mg kg}^{-1}$ ) Cu e Zn em *A. brasiliiana* conforme o tempo de exposição nos tratamentos manipulados (GRÁFICO 1). Diferenças na concentração de cobre estiveram relacionadas a variabilidade espacial, detectada como o efeito dos baixios na ANOVA (TABELA 1). As maiores concentrações de Cu em *A. brasiliiana* foram observadas em B1. Diferenças na concentração de Zn foram mais complexas e dependeram da interação entre tratamentos, tempos e baixios (TABELA 1). Comparações *a posteriori* revelaram que a concentração de zinco em *A. brasiliiana* foi significativamente superior no tratamento com adição de Cu, mas essa diferença foi apenas observada em B1 após 48h de exposição (TABELA 2). Nos demais tempos não houve diferenças significativas entre tratamentos. Nas comparações envolvendo a diferença entre tempos de exposição para cada combinação de Tratamento e Baixo, testes *a posteriori* revelaram que a concentração de Zn em *A. brasiliiana* foi significativamente superior após 48h, não diferindo entre 15 e 30d após a instalação do experimento (TABELA 2).

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO NOS ORGANISMOS *ANOMALOCARDIA BRASILIANA*.



DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Concentrações de cobre e zinco (média ± E.P.; n= 2) nos organismos *Anomalocardia brasiliana* nos tempos de exposição de 48 horas, 15 dias e 30 dias no baixio 1 (B1) e baixio 2 (B2). CU: adição de cobre; ZN: adição de zinco; CZ: adição combinada de cobre e zinco; NM: controle não manipulado.

FONTE: O autor (2017)

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA TRIFATORIAL DAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO EM A. BRASILIANA.

Fonte	Cobre			Zinco		
	gl	F	P	gl	F	P
Tratamento=Tr	3	4.2802	0.13168	3	2.2053	0.266378
Tempo= Te	2	2.1143	0.32110	2	684.4226	0.001459**
Baixio= Ba	1	7.6904	0.01057*	1	0.0098	0.921851
Tr x Te	6	0.3977	0.85676	6	0.2155	0.958057
Tr x Ba	3	0.2618	0.85216	3	1.4252	0.259935
Te x Ba	2	0.3301	0.72210	2	0.2258	0.799558
Tr x Te x Ba	6	0.6278	0.70649	6	2.9510	0.026577 *
Resíduo	24			24		

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

FONTE: O autor (2017)

TABELA 2 - TESTES SNK PARA A INTERAÇÃO TR X TE X BA APÓS ANOVA DAS CONCENTRAÇÕES DE ZN EM A. BRASILIANA.

Zinco	Tr (Te:Ba)	Te (Tr:Ba)
T1.B1	Zn=NM=CZ<Cu	Cu.B1 T3=T2<T1
T2.B1	NM=Zn=Cu=CZ	CZ.B1 T3=T2<T1
T3.B1	CZ=Zn=NM=Cu	NM.B1 T3=T2<T1
T1.B2	CZ=NM=Cu=Zn	Zn.B1 T3=T2<T1
T2.B2	NM=Zn=CZ=Cu	Cu.B2 T3=T2<T1
T3.B2	NM=Zn=Cu=CZ	CZ.B2 T3=T2<T1
		NM.B2 T3=T2<T1
		Zn.B2 T3=T2<T1

DESCRIÇÃO DA TABELA: T1: 48 h; T2: 15 d; T3: 30 d; Cu: adição de cobre; Zn: adição de zinco; CZ: adição combinada de cobre e zinco; NM: controle não manipulado. Nas comparações *a posteriori* "<" indica diferença significativa a P < 0.05 e "=" indica P > 0.05.

FONTE: O autor (2017)

## 4.2. ESTRESSE OXIDATIVO

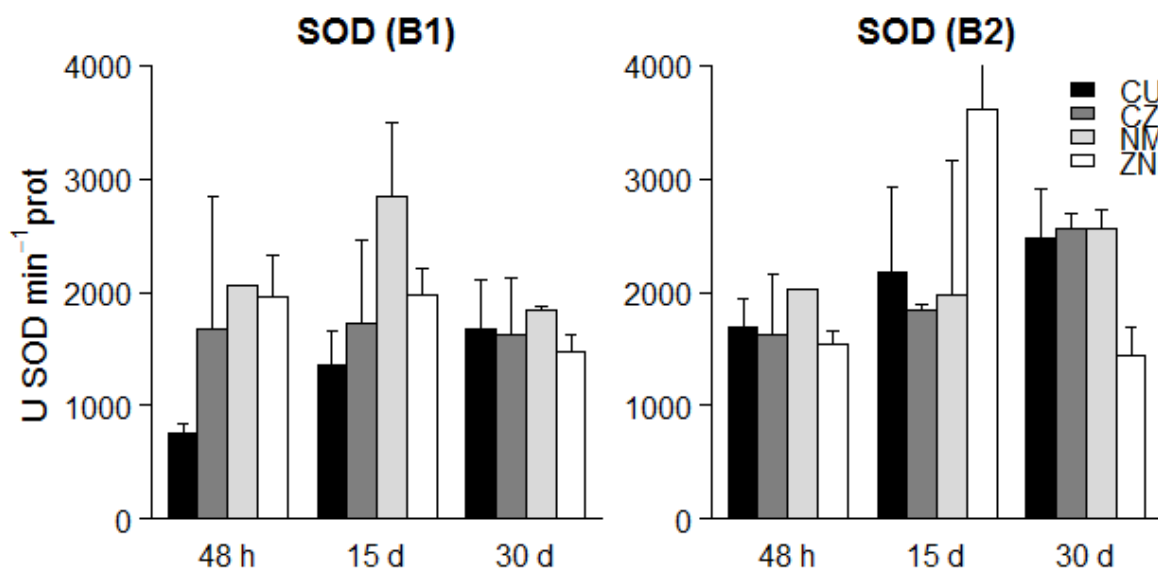
No gráfico 2 podemos observar a variação na atividade das enzimas e níveis de LPO entre tratamentos e tempos para cada um dos baixios de maré. A atividade da SOD não exibiu diferenças significativas nos fatores analisados (TABELA 3). No



caso da CAT, as diferenças na atividade estiveram relacionadas ao baixo, com atividade significativamente maior em B2 (TABELA 3). A atividade de GST diferiu significativamente entre tratamentos e também conforme interação entre tempo e baixo (TABELA 3). Comparações *a posteriori* para a interação Te x Ba revelaram que, em B1, foi observada uma inibição da atividade da GST após 48h, enquanto em B2 não foram detectadas diferenças entre tempos. Para as diferenças entre tratamentos, foi observada uma indução significativa de GST nos tratamentos Cu e NM, quando comparado aos efeitos de Zn e CZ. Diferenças na atividade da GPx dependeram somente da interação entre tempo e baixo (TABELA 3). Testes post-hoc (TABELA 4) revelaram atividades significativamente maiores de GPx após 48h, contudo este padrão somente foi observado em B1. Níveis de LPO também apresentaram diferenças significativas na interação entre tempo e baixo, contudo comparações *a posteriori* não mostraram diferenças entre médias para esta combinação de fatores.

GRÁFICO 2 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS<sup>1</sup>

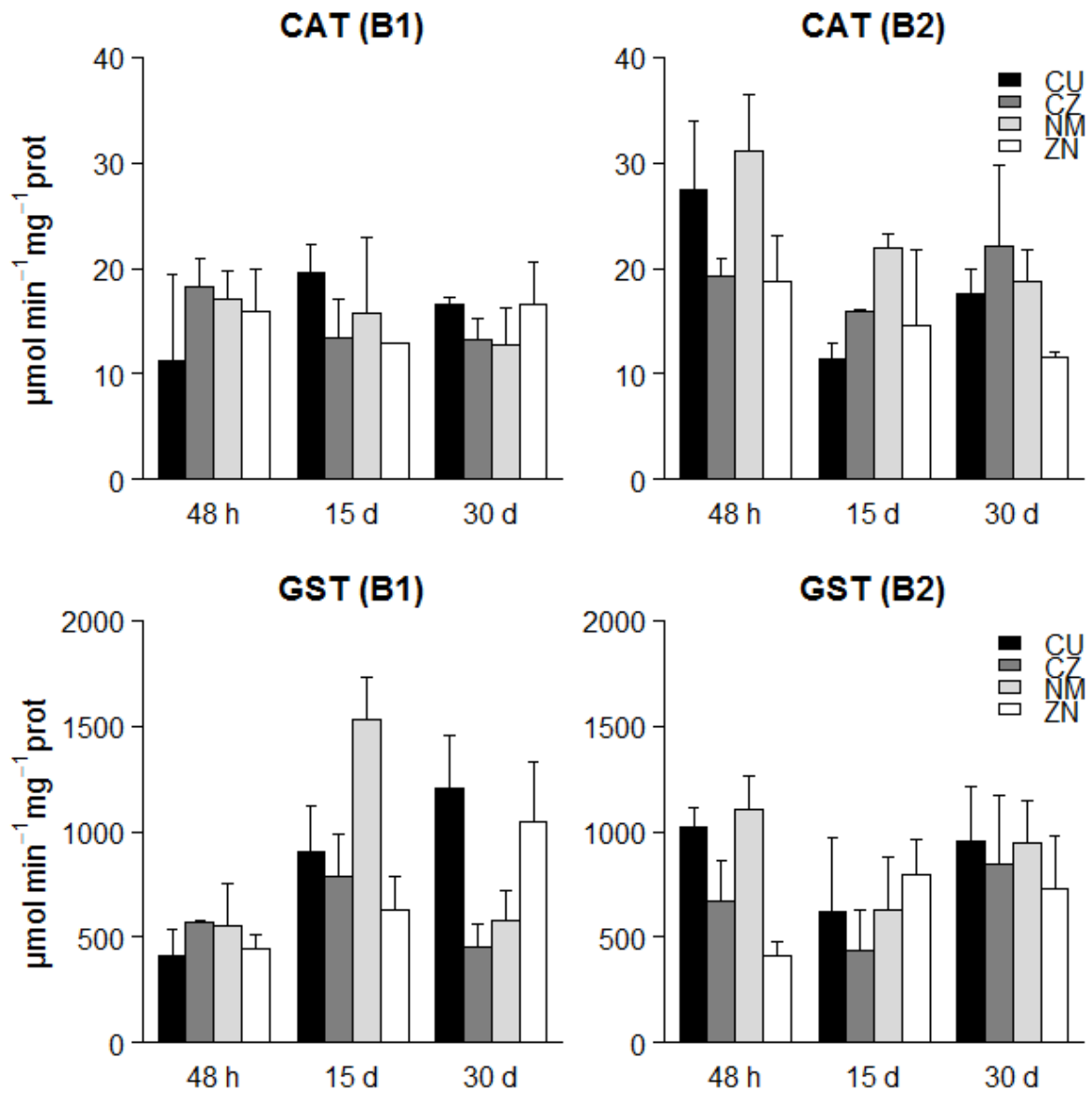
(CONTINUA)



<sup>1</sup> DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Atividade das enzimas (média ± E.P.; n= 3) superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e níveis de lipoperoxidação (LPO) no organismo *Anomalocardia brasiliensis* nos tempos 48 horas, 15 dias e 30 dias no baixo 1 e baixo 2. Tratamentos experimentais: CU (Cobre), ZN (Zinco), CZ (Cobre e Zinco) e NM (Não Manipulado).

GRÁFICO 2 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS<sup>1</sup>

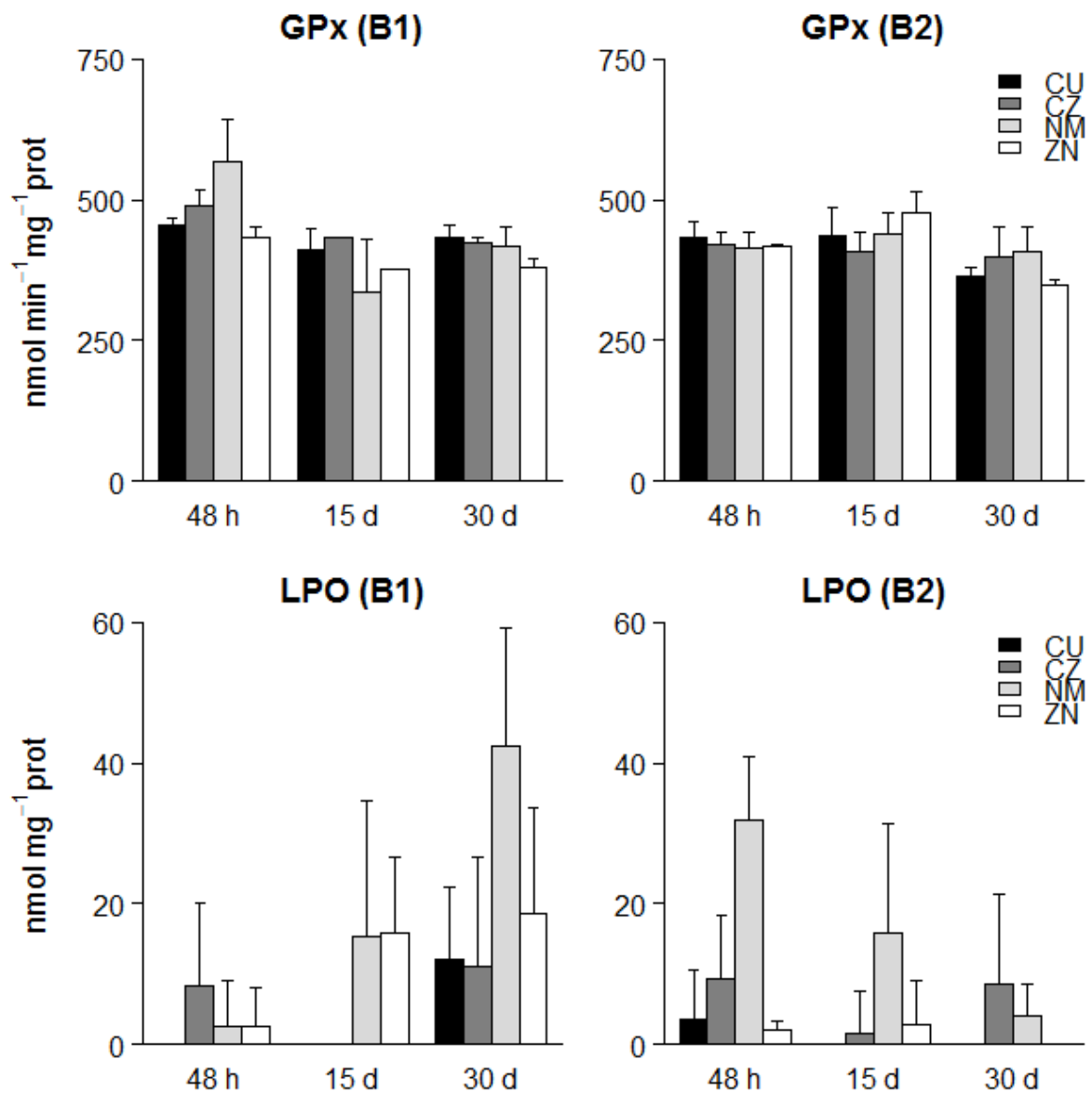
(CONTINUAÇÃO)



<sup>1</sup> DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Atividade das enzimas (média  $\pm$  E.P.; n= 3) superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e níveis de lipoperoxidação (LPO) no organismo *Anomalocardia brasiliana* nos tempos 48 horas, 15 dias e 30 dias no baio 1 e baio 2. Tratamentos experimentais: CU (Cobre), ZN (Zinco), CZ (Cobre e Zinco) e NM (Não Manipulado).

GRÁFICO 2 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS<sup>1</sup>

(CONCLUSÃO)



<sup>1</sup> DESCRIÇÃO DO GRÁFICO: Atividade das enzimas (média ± E.P.; n= 3) superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e níveis de lipoperoxidação (LPO) no organismo *Anomalocardia brasiliana* nos tempos 48 horas, 15 dias e 30 dias no baio 1 e baio 2. Tratamentos experimentais: CU (Cobre), ZN (Zinco), CZ (Cobre e Zinco) e NM (Não Manipulado).

FONTE: O autor (2017)

TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA TRIFATORIAL DAS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES EM *A. BRASILIANA*.

Fonte	gl	SOD		CAT		GST (log)	
		F	P	F	P	F	p
Tratamento=Tr	3	1.4634	0.3809	1.0040	0.49873	18.5506	0.01933 *
Tempo=Te	2	4.3236	0.1878	1.2790	0.43879	0.3652	0.73250
Baixio=Ba	1	2.1359	0.1569	5.2015	0.03174*	0.0299	0.86415
Tr x Te	6	1.0526	0.4760	0.2561	0.93904	0.4923	0.79520
Tr x Ba	3	0.5222	0.6711	1.1529	0.34814	0.0886	0.96559
Te x Ba	2	0.3133	0.7339	1.9205	0.16839	4.8433	0.01710 *
Tr x Te x Ba	6	0.7719	0.5995	1.3182	0.28733	2.1178	0.08851
Resíduo	24						

Fonte	gl	GPx		LPO	
		F	P	F	P
Tratamento=Tr	3	0.8685	0.54478	8.4694	0.05638
Tempo=Te	2	0.9355	0.51666	0.1456	0.87288
Baixio=Ba	1	1.1030	0.30407	1.2467	0.27525
Tr x Te	6	0.7071	0.65770	0.2485	0.94281
Tr x Ba	3	0.6537	0.58845	0.4281	0.73470
Te x Ba	2	5.4439	0.01123 *	4.4577	0.02258 *
Tr x Te x Ba	6	1.2518	0.31597	0.9783	0.46124
Resíduo	24				

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

NOTA: transformação utilizada está indicada entre parênteses.

FONTE: O autor (2017)

TABELA 4 - TESTES SNK PARA A INTERAÇÃO TE X BA APÓS ANOVA DA ATIVIDADE DA GPX EM *A. BRASILIANA*.

GPx	Te: Ba
B1	T3 = T2 < T1
B2	T3 = T2 = T1

NOTA: T1: 48 h; T2: 15 d; T3: 30 d. Nas comparações *a posteriori* "<" indica diferença significativa a P < 0.05 e "=" indica P > 0.05.

FONTE: O autor (2017)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 BIOACUMULAÇÃO

A hipótese de um aumento gradativo na concentração de metais e na resposta das defesas antioxidantes em *A. brasiliiana* nos tratamentos manipulados de acordo com o tempo de exposição foi rejeitada. Padrões de resposta na bioacumulação e nas defesas antioxidantes não puderam ser inequivocamente atribuídas à manipulação experimental de cobre e zinco nos baixios de maré. Apesar disso, a bioacumulação de cobre e zinco exibiu padrões distintos. Para o contaminante Cu, diferenças significativas foram encontradas apenas entre os baixios. Essa diferença espacial pode estar relacionada a diferenças hidrodinâmicas dos locais, pois os indivíduos *A. brasiliiana* foram tratados do mesmo modo, desde a coleta para marcação com cianoacrilato aos procedimentos de campo e laboratório. Variações nas concentrações de zinco foram mais complexas e dependeram da interação entre tratamentos, tempos e baixios. Curiosamente, a concentração de Zn foi significativamente maior no tratamento com adição de Cu após 48h. Cobre e zinco além de serem metais essenciais, a sua detoxificação pode ocorrer por defesas antioxidantes, o que explicaria sua diminuição nos tempos posteriores (AMIARD, 2006).

Estas respostas nos níveis de bioacumulação estão potencialmente relacionadas a ação de defesas antioxidantes analisadas. É possível que a ativação destas defesas tenha sido suficiente para prevenir o acúmulo dos metais Cu e Zn no tecido de *A. brasiliiana*, justificando assim a ausência de efeitos consistentes dos tratamentos experimentais e tempos de exposição utilizados neste trabalho.

### 5.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos de estresse oxidativo não são necessariamente causados pelo enriquecimento de contaminantes no ambiente, mas qualquer situação que cause estresse num organismo. Entretanto, a ação combinada das enzimas antioxidantes e moléculas não enzimáticas é capaz de mitigar os efeitos de contaminantes (PREGO-FARALDO, 2017). No sistema de defesa enzimático, a indução da SOD é uma das primeiras respostas como defesa antioxidante (LIMA et al., 2007; LÜCHMAN et al.,

2011). A SOD age convertendo radicais superóxido ( $O^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) o qual é reduzido pelas enzimas CAT e GPx, pois ambas utilizam o mesmo substrato, convertendo-o em água e oxigênio molecular (VINCENT, 2007). Nesse estudo, SOD não teve variação entre os diferentes tratamentos e tempos. A concentração de Cu pode ter sido elevada para esse organismo e, esse aumento pode ter inibido e reduzido a atividade da SOD como reportado por Jing et al. (2006). Resultados similares foram observados em outros estudos em que não houve variação na superóxido dismutase (TORRES, 2002; DOYOTTE et al., 1997). Elevadas concentrações de Cu podem ter inibido a regulação da atividade enzimática, em contrapartida, o organismo usaria da energia necessária para a produção de SOD em outras atividades (MAIN, 2010).

CAT apresentou variação espacial que pode estar relacionada a diferenças hidrodinâmicas e granulométricas dos locais, pois fontes naturais influenciam fortemente a atividade desta enzima como variações na salinidade, temperatura, ciclo reprodutivo e disponibilidade de alimento (VIDAL-LIÑÁN, 2010; 2014). Não houve diferença entre os tempos e tratamentos, provavelmente devido a inibição da SOD, pois a atividade da CAT é induzida pela presença de  $H_2O_2$  (TURJA, 2013).

A atividade da GST apresentou valores menores somente em B1 após 48h, seguido de uma indução nos tempos seguintes. No baixio 1, GST apresentou maior atividade, enquanto CAT a menor. Esse padrão concorda com Seonok et al. (2013), que sugeriram que a redução na atividade da CAT poderia implicar num desequilíbrio redox que resultaria em um aumento da atividade da GST em mexilhões. Neste trabalho, a falta de  $H_2O_2$  pela inibição da SOD pode ter impedido a indução de outras enzimas, mas beneficiado a atividade da GST, biotransformando compostos tóxicos. Barata et al. (2005) sugere que a atividade peroxidase da GST poderia compensar valores baixos da CAT.

A reação de metais com glutathione pode resultar na formação de complexos ou a oxidação da GSH. Cobre é um metal que promove essa oxidação, enquanto zinco reage na formação de complexos mais estáveis (CHRISTIE; COSTA, 1984). Estudos sugerem diminuição da GSH em moluscos pela afinidade do metal zinco com a molécula GSH (XIONG et al., 2011; ALI et al., 2012; FAHMY et al., 2014). Essa afinidade do zinco com a GSH pode ser responsável pela menor atividade da GST nos tratamentos Zn e CZ, assim como a presença de Cu pode ter induzido a atividade da GST.

GPx e GST são enzimas dependentes da GSH (HERMES-LIMA, 2004) e a indução destas pode causar depleção na GSH como observado em mexilhões expostos a contaminantes (JENA et al., 2009; TORRES ET et al., 2002). A GPx teve maior atividade após 48h de exposição, seguido de uma queda na concentração dos tempos seguintes, sendo essas diferenças observadas somente no baio 1. Com esses resultados podemos deduzir que essa queda na atividade da GPx nos tempos seguintes está relacionada ao aumento da GST, pois ambas apresentaram padrões inversamente proporcionais. Contudo, há ressalvas quanto ao uso desse biomarcador para detectar efeito de contaminantes, pois, tanto a atividade da GPx, quanto da CAT, apresentam muita variação por fontes naturais (VIDAL-LIÑÁN et al., 2010, 2014).

Os resultados observados não mostraram níveis de LPO suficiente para indicar dano celular. LPO é considerado o primeiro mecanismo pelo qual os radicais óxidos podem causar dano celular (LIVINGSTONE, 2001). Em alguns estudos não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de LPO devido a ação de antioxidantes (LÜCHMANN, 2011; SARDI, 2016). No trabalho de Prego-Faraldo (2017) verificou-se uma rápida redução nos níveis de LPO em *Mytilus galloprovincialis*, sugerindo algum nível de resiliência de bivalves frente a compostos xenobióticos. A ausência de danos lipídicos e também de mortalidade no presente trabalho pode indicar uma resposta adaptativa de *A. brasiliiana*, em regiões contaminadas, o suficiente para evitar o dano oxidativo, pelo menos em termos de lipoperoxidação. Alternativamente, a ação combinada das defesas antioxidantes na escala temporal do experimento pode ter sido suficiente para prevenir danos ou permitir a recuperação dos organismos.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram a importância de estudos experimentais *in situ*, uma vez que estudos em laboratório não incluem todas as variáveis bióticas e abióticas que ocorrem naturalmente, o que pode alterar a absorção do contaminante ou a resposta do indicador (GOODSELL, 2009). Além de não refletir as condições complexas com o qual o organismo está naturalmente sujeito, assim como a interação entre espécies e a dinâmica do ambiente (MAYER-PINTO, 2010).

A técnica utilizada neste trabalho foi baseada nos trabalhos de Lindgarth e Underwood (1999), que testou um método de concentração de metais mediante um experimento manipulativo. Os nossos valores obtidos de bioacumulação e níveis de estresse oxidativo não aumentaram concomitante ao tempo de exposição. Apesar deste experimento ter um bom delineamento amostral, o resultado das análises foi distinto sem poder relacionar com o tempo de exposição, nem com as unidades experimentais.

Contudo, esses resultados não devem ser atribuídos somente a resistência dos organismo e capacidade fisiológica do organismo como ativação de defesas enzimáticas, mas associar esses valores distintos ao próprio método aplicado. Deve-se levar em conta desde fatores abióticos, como a localização de uma UE em relação a praia até fatores bióticos, como interação com outros organismos, para minimizar ao máximo os erros.

Um dos fatores abióticos que pode ter interferido nos resultados é a dispersão dos blocos de gesso usado. Talvez essa dispersão tenha agido ter agido ineficazmente em campo devido a proporção gesso/metal utilizado, embora tenha-se notado durante o experimento que o gesso estava pastoso e parcialmente dissolvido. Ou as propriedades físicas do sedimento pode ter impedido o espalhamento do contaminante por todo o interior do círculo, uma vez que a área do delineamento é constituída de areias finas e médias. Esta quantidade de contaminante pode ter sido insuficiente ou a maré pode ter afetado essa proporção, pois quando imerso, o delineamento estava sujeito a ação de ondas e correntes carregando contaminantes para outra UE ou para fora do delineamento. Em nosso



experimento as UE não manipuladas também apresentaram valores dos metais utilizados.

O CEP é um ambiente bastante hidrodinâmico com constantes variações nas propriedades físico-químicas (LANA, 2001). A toxicidade de um contaminante varia de acordo com a condição ambiental, como mudanças de salinidade, pH e temperatura, e também depende das especificidades de cada organismo. Propriedades como a salinidade e temperatura afetam na disposição de metais na coluna d'água e, quanto maior a disponibilidade de metais maior o transporte desses elementos. Não sabemos quão forte foi a influência dessas variações do início ao fim do experimento. Por essas razões, padrões de resposta reportados em experimentos de laboratório são muito diferentes daqueles obtidos em campo. Sabemos que metais são tóxicos aos organismos, como mostram estudos em laboratórios, porém, não se sabe como os mecanismos de toxicidade dos metais atuam no ambiente.

Os valores do trabalho também podem ter sido afetados por outros fatores além dos abióticos. O bivalve *A. brasiliana* é um organismo com hábito alimentar cavador superficial que se alimenta, via filtração, de substâncias em suspensão através das brânquias (POLI et al. 2004). Esta alimentação ocorre através de um sifão exalante por onde as partículas, juntamente com a água, são levadas para dentro da cavidade do manto do organismo (NARCHI, 1974). A dieta de organismos filtradores com base em fitoplanctons pode interagir com o organismo de diversas formas. Quando se alimenta de algas nocivas, o acúmulo de toxinas pode causar desde alteração genética no organismo até a sua morte (Romero Geraldo, 2016). Petes et al (2008) em seu trabalho, mostrou como uma dieta fitoplanctonica rica em carotenoides agiu como antioxidantes no mexilhão *M. californianus*. E não somente a alimentação, mas como mostrou Osterling (2001), a presença de algas verdes filamentosas pode afetar a abundância macrofaunal, incluindo espécies filtradoras, assim como a mortalidade (LANDSBERG, 2000). E, o CEP contém grande diversidade de algas e, dentre estas, algas nocivas e tóxicas (MAFRA JR., 2006).

Poucos estudos envolvendo a exposição de organismos a metais em condições naturais mostram evidências conclusivas de relação causa-efeito. Em alguns estudos com bom delineamento amostral não foi observado o metal como único responsável pelas diferenças nas comunidades. A realização de experimentos

manipulativos de campo é imprescindível no teste de hipóteses sobre efeitos da poluição em condições ambientais relevantes e permite entender como os efeitos dos contaminantes variam espacial e temporalmente. Este trabalho teve um delineamento balanceado e bem replicado e mesmo assim não houve a detecção clara dos efeitos de contaminação por metais. Os resultados mostram uma possível interação desses fatores bióticos e/ou abióticos não observados. Sobretudo, diferente dos estudos em laboratório, o presente trabalho mostra que no ambiente natural, os efeitos nos organismos não seguem relações claras de causalidade e que outras variáveis devem ser levadas em conta quando se estuda contaminação.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121–126, 1984.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 138, p. 405–415, 2004.
- ALI, D.; ALARIFI, S.; KUMAR, S.; AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. A. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola*. **Aquatic Toxicology**. v. 124-125, p. 83-90, 2012.
- AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallthioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxication and their use of biomarkers. **Aquatic Toxicology**. v, 76, p. 160-202, 2006.
- BARATA, C.; LUKEMBERRI, L.; VILA-ESCALÉ, M.; PRAT, N.; PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the *tricoptera larvae Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**. v. 74, p. 3-19, 2005.
- BERGE, J. A. A soft-bottom sublittoral mesocosm by the Oslofjord: description, performance and examples of application. **Ophelia**. v. 26, p. 37–54, 1986.
- BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**. v. 88, p. 1549–1559, 2006.
- BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. **Environmental Pollution**. v. 151, p. 631-40. 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248–254, 1976.
- BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791)(BIVALVIA, VENERIDAE) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 34, p. 259-270, 2008
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene** 329,147–157, 2004
- BUFFET, P. E.; ZALOUK-VERGNOUX, A.; CHÂTEL, A.; BERTHET, B.; MÉTAIS, L.; PERREIN-ETTAJANI, H.; POIRIER, L.; LUNA-ACOSTA, A.; THOMAS-GUYON, H.; RISSO-DE FAVERNEY, C.; GUIBBOLINI, M.; GILLILAND, D.; VALSAMI-JONES, E.; MOUNEYRAC, C. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste*

diversicolor and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**. v. 470-471, p. 1151–1159, 2014.

BURUAEM, L. M.; CASTRO, I. B.; HORTELLANI, M. A.; TANIGUCHI, S.; FILLMANN, G.; SASAKI, S. T.; PETTI, M. A. V.; SARKIS, J. E. S.; BÍCEGO, M. C.; MARANHO, L. A.; DAVANSO, M. B.; NONATO, E. F.; CESAR, A.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ABESSA, D. M. S. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 130, p. 79–189, 2013.

CANBEK, M.; DEMIR, T. A.; UYANOGLU, M.; BAYRAMOGLU, G.; EMIROGLU, O.; ARSLAN, N.; KOYONCU, O. Preliminary assessment of heavy metals in water and some cyprinidae species from the Porsuk River. **Turkey Journal of Applied Biological Sciences**. v. 1, p. 91–95, 2007.

CHASAPIS, C. T.; LOUTSIDOU, A. C. Zinc and human health: an update. **Archives of Toxicology**. v. 86, p. 521–534, 2012.

CHRISTIE, N.T.; COSTA, M. Review: In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA. **Biological Trace Element Research**. v. 6, 139-158, 1984.

CHOUERI, R.B.; CESAR, A.; TORRES, R. J.; ABESSA, D. M. S.; MORAIS, R. D.; PEREIRA, C. D. S.; NASCIMENTO, M. R. L.; MOZETO, A. A.; RIBA, L.; DELVALLS, T. A. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 1824–1831, 2009.

DOYOTTE, A.; COSSU, C.; JACQUIN, M.C.; BABUT, M.; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**. v. 39, p. 93–110, 1997.

FAHMY, S. R.; ABDEL-GHAFFAR, F.; BAKRY, F. A. Ecotoxicological effect of sublethal exposure to zinc oxide nanoparticles on freshwater snail *Biomphalaria alexandrina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 67(2), p. 192–202, 2014.

FORSTNER, U. Inorganic pollutants, particularly heavy metals in estuaries. In: Olausson, E., Cato, I. (Eds.). **Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries**. In: John Wiley & Sons, 1980. p. 452.

GAO, R.; YUANA, Z.; ZHAOB, Z.; GAOB, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**. V. 45, p. 41–45, 1998.

GERACITANO, L. A.; MOSERRAT, J. M.; BIANCHINNI, A. Oxidative stress responses in two populations of *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after

acute and chronic exposure to copper. **Marine Environmental Research**. v. 58, p. 1–17, 2004.

GOODSELL, P.J., UNDERWOOD, A.J., CHAPMAN, M.G. Evidence necessary for taxato be reliable indicators of environmental conditions or impacts. *Mar. Pollut.Bull.* 58, 323–331, 2009.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**. v. 104, p. 580–587, 1974.

HATJE, V.; BARROS, F.; FIGUEIREDO, D. G.; SANTOS, V. L. C. S.; PESO-AGUIAR, M. C. Trace metal contamination and benthic assemblages in Subaé estuarine system, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v.52, p. 978–982, 2006.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey., K.B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken: John Wiley & Sons, p. 319–368, 2004.

JENA, K. B.; VERLECAR, X. N.; CHAINY, G. B. N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. **Marine Pollution Bulletin**. v. 58, p. 107–113, 2009.

JIANG, Z. Y; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. v. 202, p. 384-389, 1992.

JING, G.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology**. v. 144, p. 184–190, 2006.

JOHNSTON, E.L., KEOUGH, M.J. Competition modifies the response of organisms to toxic disturbance. **Marine Ecology Progress Series**. v. 251, p. 15–26, 2003.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KENNISH, M. J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**. v. 29, p. 78–107, 2002.

KLERKS, P.L.; LEVINTON, J.S. Evolution of resistance and changes in community composition in metal-polluted environments: a case study on Foundry Cove. In: Dallinger, R.; Rainbow, P.S. (Eds.). **Ecotoxicology of Metals in Invertebrates**. Lewis Publishers Inc, Boca Raton, 1993.

LANA, P. C.; MARONE, E.; LOPES, R. M.; MACHADO, E. C. The Subtropical Estuarine Complex of Paranagua Bay, Brazil, in: SEELIGER, U.; KJERFVE, B.

(Eds.), **Coastal Marine Ecosystems of Latin America**. Springer-Verlag, Berlin, 2001, pp. 131–145.

LANDSBERG, J. H., 2000. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science**. 10, 113e390, 2000.

LIMA I.; MOREIRA, S; M.; OSTEN, J. R.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the north-western coast of Portugal. **Chemosphere**. v. 66, p. 1230– 1242, 2007.

LINDEGARTH, M.; HOSKIN, M. Patterns of distribution of macro-fauna in different types of estuarine, soft sediment habitats adjacent to urban and non-urban areas. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v.52, p. 237–247, 2001.

LINDEGARTH, M.; UNDERWOOD, A. J. Using an Experimental Manipulation of Contaminants in Intertidal Sediments. **Ecotoxicology**. v. 8, p. 495–401, 1999.

LINDEGARTH, M.; UNDERWOOD, A. J. A manipulative experiment to evaluate predicted changes in intertidal, macro-faunal assemblages after contamination by heavy metals. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 274, p. 41 – 64, 2002.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminated stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organism. *Marine Pollution Bulletin*. v, 42, p. 656-666, 2001.

LÜCHMANN, K. H.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T. S.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUSHI, S.; SASAKI, S. T.; DAURAJORGE, F. G.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**. v. 105, p. 652–660, 2011.

MAFRA, L. L.; FERNANDES, L. F.; PROENÇA, L. A. O. Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107-121, 2006.

MAIN, W. P. L.; ROSS, C.; BIELMYER, G.K. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**. v. 151, p. 216-221, 2010.

MAYER-PINTO, M.; UNDERWOOD, A. J.; TOLHURST, T.; COLEMAN, R. A. Effects of metals on aquatic assemblages: What do we really know? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 391, p. 1–9, 2010.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G.; PINHO, G. L. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals:

Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 221–234, 2007.

MORRISEY, D.; UNDERWOOD, A.; HOWITT, L. Effects of copper on the faunas of marine soft-sediments: an experimental field study. **Marine Biology**. v.125, p. 199–213, 1996.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 27, p. 235-262, 1974.

ÖSTERLING, M.; L. PIHI. Effects of filamentous green algal mats on benthic macrofaunal functional feeding groups. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 263, p. 159–183, 2001.

PAIXÃO, J. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; DOMINGUEZ, J. M. L.; COELHO, A. C. D.; GARCIA, K. S.; CARVALHO, G. C.; MAGALHÃES, W. F. Relationship of metal content and bioavailability with benthic macrofauna in Camamu Bay (Bahia, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**. v. 60, p. 474–481, 2010.

PETES, L. E., MENGE, B. A.; HARRIS, A. L. Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. **Ecological Monographs**. v. 78, p. 387-402, 2008.

POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. A. (orgs.). **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa. 456 p., 2004.

PREGO-FARALDO, M. V.; VIEIRA, L. R.; EIRIN-LOPEZ, L. R.; MÉNDEZ, J.; GUILHERMINO, R. Transcriptional and biochemical analysis of antioxidant enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* during experimental exposures to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Marine Environmental Research**. v. 129, p. 304-315, 2017.

R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <https://www.R-project.org/>.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments, **Australasian Journal of Ecotoxicology**. v. 12, p. 107–122, 2006.

RAJOTTE, J.; PYLE, G.; COUTURE, P. Indicators of chronic metal stress in wild yellow perch from metal-contaminated environments. In: **Conference Presentations, Mining and Environment**, 28th Annual Meeting, 2003.

RINGWOOD, A. H.; CONNER, D. E.; DINOVOB, A. The Effects of Copper Exposures on Cellular Responses in Oysters. **Marine Environmental Research**. v. 46, p. 591–595, 1998.

SANDRINI, J. Z.; LIMA, J. V.; REGOLI, F.; FATTORINI, D.; NOTTI, A.; MARINS, L. F. F.; MONSERRAT, J. M. Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 70, p. 115–120, 2008.

SANDRINI-NETO, L., CAMARGO, M. G. GAD: na R package for ANOVA Designs from General Principles R Package Version 1. 1. 1. <http://CRAN.R-project.org/package=GAD>.

SANDRINI-NETO, L.; PEREIRA, L.; MARTINS, C. C.; ASSIS, H. C. S.; CAMUS, L.; LANA, L. C. Antioxidant responses in estuarine invertebrates exposed to repeated oil spills: Effects of frequency and dosage in a field manipulative experiment. **Aquatic Toxicology**. v. 177, p. 237-249, 2016.

SANNI, S.; BJÖRKBLOM, C.; JONSSON, H.; GODAL, B. F.; LIEWENBORG, B.; LYNG, E.; PAMPANIN, D. M. Biomarker quantification in fish exposed to crude oil as input to species sensitivity distributions and threshold values for environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 125, p. 10–24, 2017.

SANTOS, N. M.; LANA, P. C. Present and past uses of mangrove wood in the subtropical Bay of Paranaguá (Paraná, Brazil). **Ocean and Coastal Management**, 148, 97 – 103, 2017

SARDI, A. E.; RENAUD, P. E.; LANA, P. C.; CAMUS, L. Baseline levels of oxidative stress biomarkers in species from a subtropical estuarine system (Paranaguá Bay, southern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**. v. 113, 2016.

SARDI, A. E.; SANDRINI-NETO, L.; PEREIRA, L. S.; ASSIS, H. S.; MARTINS, C. C.; LANA, P. C.; CAMUS, L. Oxidative stress in two tropical species after exposure to diesel oil. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, p. 20952-20962, 2016

SEEBAUGH, D. R.; GOTO, D.; WALLACE, W. G. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. **Marine Environmental Research**. v. 59, p. 473–91, 2005.

SEONOCK, W.; VIANNEY, D.; HYOKYUNG, W. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. **Zoological Studies**. v. 52, p. 15, 2013.

STARK, J. S. Heavy metal pollution and macrobenthic assemblages in soft sediments in two Sydney estuaries, Australia. v. 49, p. 533–540, 1998.

SW-846 EPA Method 3052, Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices, in: Test Methods for Evaluating Solid Waste, 3rd Edition, 3rd Update, **US Environmental Protection Agency**, Washington DC, 1995.

TORRES, M.A.; TESTA, C. P.; GÁSPARI, C.; MASUTTI, M. B.; PANITZ, C. M. N.; CURI-PEDROSA, R.; ALMEIDA, E. A.; MASCIO, P.; FILHO, D. W. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44, p. 923–932, 2002.

TURJA, R.; HÖHER, N.; SNOEIJIS, P.; BARSJENE, J.; BUTRIMAVICIENE, L.; KUZNETSOVA, T.; KHOLODKEVICH, S. V.; DEVIER, M. H.; BUDZINSKI, H.;



LEHTONEN, K. K. A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). **Science of the total Environment**. v. 474, p. 398–409, 2014.

TURJA, R.; SOIRINSUO, A.; BUDZINSKI, H.; DEVIER, M. H.; LEHTONEN, K. K. Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 157, p. 80–92, 2013.

UNDERWOOD, A.J., PETERSON, C.H. Towards an ecological framework for investigating pollution. **Marine Ecology Progress Series**. v. 46, p. 227–234, 1988.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57–149, 2003.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J.; CAMPILLO, J. A.; BEIRAS, R. Chemosphere Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). **Chemosphere**. v. 78, p. 265–272, 2010.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J.; ETXEBARRIA, N.; NIETO, O.; BEIRAS, R. Glutathione S-Transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbor areas. **Science Of the Total Environment**. v. 470-471, p. 107-106, 2014.

VINCENT, H. K., INNES, K. E., VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesity and Metabolism**. 2007; v. 9, p. 813-39, 2007

XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Science of the Total Environment**. V. 409, p. 1444-1452, 2001.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: Pollution and seasonal effects. **Marine Environmental Research**. v. 103, p. 74–79, 2015.

ZUYKOV, M.; PELLETIER, E.; HARPER, D. A. T Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. **Chemosphere**, 93, 201 – 208, 2013