



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM
MEXILHÕES *Perna perna* (LINNAEUS,
1758), COLETADAS EM
FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA,
BRASIL**

FRANCCIELLE VERONESE GRANJA

LAGES, 2018

Franccielli Veronese Granja

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Indianara Fernanda Barcarolli

LAGES
2018

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

Veronese Granja, Francielli Cristiane
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM MEXILHÕES Perna
perna (LINNAEUS, 1758), COLETADAS EM FLORIANÓPOLIS,
SANTA CATARINA, BRASIL / Francielli Cristiane
Veronese Granja. - Lages , 2018.
74 p.

Orientadora: Indianara Fernanda Barcarolli
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais, Lages, 2018.

1. Perna perna- mexilhão. 2. Atividade
Enzimática. 3. Metais. 4. Biomonitoramento. I.
Barcarolli, Indianara Fernanda . II. Universidade
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação. III. Título.

FRANCCIELLE VERONESE GRANJA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM MEXILHÕES *Perna perna*
(LINNAEUS, 1758), COLETADAS EM FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA,
BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Banca examinadora

Orientadora:

Prof. Dra. Indianara Fernanda Barcarolli
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:

Susete W. Christo

Profa. Dra. Susete Wambier Christo
Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG

Josiane Terezinha Cardoso

Profa. Dra. Josiane Terezinha Cardoso
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 13/03/2018

Dedico este trabalho a minha família,
marido, amigos e ao amor ao Meio Ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família pela compreensão de minha escolha e das minhas muitas ausências em momentos de união. Em especial agradeço meu marido Bruno por aceitar minha decisão e me ajudar por vezes em minhas coletas, me ouvindo em momentos decisivos para o bom andamento durante o mestrado e me dando o carinho que eu tanto necessitei.

À minha professora e orientadora Indianara Fernanda Barcarolli que aceitou a ideia do trabalho desde o princípio e me acompanhou até o fim, compreendendo minhas escolhas e me dando o devido apoio.

Áos meus colegas e amigos da UDESC Lages pela parceria, risadas, estudos e festas. O ano em que passamos juntos foi muito importante e jamais esquecerei os amigos verdadeiramente feitos.

Ás minhas colegas Darluci e Marina, ambas “estagiárias” dos dois laboratórios que utilizei durante o mestrado, sem vocês teria sido tudo mais difícil. Ao professor Afonso Celso Dias Bainy que permitiu que eu pudesse analisar meus parâmetros bioquímicos no laboratório LABCAI. Aos colegas do LABCAI pela ajuda com as análises enzimáticas em especial a Raphaela Paiva que além de me acompanhar no laboratório encheu meus dias de alegrias e muitas risadas. A Daína, Jacó e Barbara pela “coorientação” e ajuda técnica que necessitei desde o princípio.

Aos professores do Mestrado em Ciências Ambientais da UDESC Lages, que contribuiram para a ampliação dos conhecimentos e para meu crescimento profissional. As professoras Claudia, Josiane e minha querida Susete Christo por terem aceitado participarem da qualificação e a banca de defesa.

Á Fundação de Amparo a Pesquisas de Santa Catarina, FAPESC, pela bolsa concedida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais UDESC.

Resumo

Santa Catarina é um dos estados do Brasil que merecem destaque na aquicultura, principalmente a capital, cidade de Florianópolis que é um grande polo pesqueiro. Apesar de grande desenvolvimento econômico e turístico, a capital catarinense também se destaca pela falta de infraestrutura de saneamento básico em vários pontos da ilha, com falhas nos sistemas de esgotamento sanitário. Desta forma este trabalho tem como objetivo avaliação das atividades enzimáticas: catalase, glutationa-s-transferase e acetilcolinesterase, em mexilhões da espécie *Perna perna*, bem como a avaliação da concentração de metais, ferro, cobre, zinco e chumbo, monitoradas durante verão e inverno de 2017 nos pontos de coleta praias de Canasvieiras, Santinho e Joaquina, Florianópolis, Santa Catarina. As atividades enzimáticas foram determinadas por espectrofluorimetria utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5 e o software SoftMax. Já as concentrações de metais foram obtidas por espectrofotometria de absorção atômica de chama Grafphite Tube Atomizer, 200 series AA, Agilent Technologies. A estatística de todos os dados foi analisada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Como principais resultados em relação as atividades enzimáticas pode-se concluir que a maior expressividade da catalase foi no Santinho durante o verão, observadas nas glândulas digestivas. Já a atividade enzimática da glutationa-S-transferase foi superior na Joaquina tanto em glândulas digestivas quanto em brânquias e os maiores valores para acetilcolinesterase foram verificados na Joaquina e Santinho. Todas essas variações enzimáticas foram relacionadas às altas concentrações de metais como ferro e chumbo, bem como a localização dos mexilhões nos costões rochosos e a contaminação da água do mar através dos dados de balneabilidade dos pontos coletados. Os biomarcadores tiveram respostas diferentes nos três pontos de coleta bem como em cada tecido coletado. Da mesma forma que os metais tiveram concentrações diferentes nos pontos de coleta como também em cada tecido analisado.

Palavras-chave: *Perna perna*- mexilhão, Atividade Enzimática, Metais, Biomonitoramento.

Abstract

Santa Catarina is one of the states of Brazil that deserve prominence in aquaculture, mainly the capital city of Florianópolis that is a great fishing pole. Despite the great economic and tourist development, the capital of Santa Catarina is also notable for the lack of basic sanitation infrastructure in several parts of the island, with failures in sanitary sewage systems. The objective of this work is to evaluate the enzymatic activities catalase, glutathione-s-transferase and acetylcholinesterase in mussels of the *Perna perna* species, as well as the evaluation of the concentration of metals, iron, copper, zinc and lead, monitored during summer and winter of 2017 at the collection points beaches of Canasvieiras, Santinho and Joaquina, Florianópolis, Santa Catarina. Enzymatic activities were determined by spectrofluorimetry using the SpectraMax M5 microplate reader and SoftMax software. Already the metal concentrations were obtained by atomic absorption spectrophotometry of Graphite Tube Atomizer, 200 series AA, Agilent Technologies. The statistics of all the data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software. As main results in relation to the enzymatic activities it can be concluded that the greatest expressiveness of the catalase was in the Santinho during the summer, observed in the digestive glands. The enzymatic activity of glutathione-S-transferase was higher in Joaquina in both digestive glands and gills and the highest values for acetylcholinesterase were verified in Joaquina and Santinho. All these enzymatic variations were related to the high concentrations of metals such as iron and lead, as well as the location of the mussels in the rocky shores and the contamination of the sea water through the bathing data of the points collected. The biomarkers had different responses at the three collection points as well as in each tissue collected. In the same way that metals had different concentrations at the collection points as well as in each tissue analyzed.

Keywords: *Perna perna*- mussel, Enzymatic Activity, Metals, Biomonitoring.

LISTA DE TABELAS

<p>Tabela 1. Dados biométricos de mexilhões <i>Perna perna</i> (n=10) nos três pontos de coleta durante o verão. Os valores de comprimento (cm) referem-se à medida da maior largura dos animais e os valores de Largura (cm), referem-se à medida de menor largura. Os valores estão representados como média ± desvio padrão</p>	47
<p>Tabela 2. Dados biométricos de mexilhões <i>Perna perna</i> (n=10) nos três pontos de coleta durante o inverno. Os valores de comprimento (cm) referem-se à medida da maior largura dos animais e os valores de Largura (cm), referem-se à medida de menor largura. Os valores estão representados como média ± desvio padrão</p>	47
<p>Tabela 3. Demonstração dos Relatórios de Balneabilidade do litoral Catarinense da Fundação do Meio Ambiente- FATMA, Governo do Estado Santa Catarina. Relatórios completos nos ANEXOS deste trabalho</p>	48
<p>Tabela 4. Média e desvio padrão das concentrações (mg/kg⁻¹) de micronutrientes e metais tóxicos dos três tecidos (brânquias, glândula digestiva e músculo) do mexilhão <i>Perna perna</i> (n=10) coletados em três pontos da cidade de Florianópolis: Joaquina, Santinho e Canasvieiras, durante o verão de 2017 e limites permitidos pela legislação brasileira em vigor (Brasil, 2013)</p>	54
<p>Tabela 5. Média e desvio padrão das concentrações (mg kg⁻¹) de micronutrientes e metais tóxicos dos três tecidos (brânquias, glândula digestiva e músculo) do mexilhão <i>Perna perna</i> (n=10) coletados em três pontos da cidade de Florianópolis: Joaquina, Santinho e Canasvieiras, durante o inverno verão de 2017 e limites permitidos pela legislação brasileira em vigor (Brasil, 2013)</p>	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos locais em Florianópolis que possuem Sistemas de Tratamento de Esgoto em Atividade e os locais que possuem Sistemas de Tratamento de Esgotos não operantes	23
Figura 2: Mexilhão <i>Perna perna</i> coletado durante o verão, na praia do Santinho, Florianópolis, Santa Catarina	26
Figura 3. Pontos de coleta de mexilhão <i>Perna perna</i> na cidade de Florianópolis, Santa Catarina	41
Figura 4. Mensuração da concha dos mexilhões <i>Perna perna</i> (n=10) nos três pontos de coleta, (Canasvieiras, Santinho e Joaquina) em Florianópolis, SC. A: altura; C: comprimento	42
Figura 5. Homogeneização de tecidos de <i>Perna perna</i> coletados durante o inverno	43
Figura 6. Coleta de Verão. A mexilhões <i>Perna perna</i> coletados na praia da Joaquina, B indivíduos coletados na praia do Santinho e C organismos coletados em Canasvieiras	47
Figura 7. Gráfico da atividade da catalase nas glândulas digestivas de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises ANOVA (p<0,05)	49
Figura 8. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da catalase nas brânquias de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05)	50
Figura 9. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da GST nas glândulas digestivas de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05)	50
Figura10. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da GST nas brânquias de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05)	51
Figura 11. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase nas glândulas digestivas de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05)	52
Figura 12. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase	52
Figura 13. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase nos músculos de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de Krushall Wallis (p<0,05) nas brânquias de <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05)	53
Figura 14. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg ⁻¹ nas glândulas digestivas de mexilhões <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho)	55
Figura 15. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg ⁻¹ nas brânquias de mexilhões <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho)	56
Figura 16. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg ⁻¹ nos músculos de mexilhões <i>Perna perna</i> nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA (p<0,05). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho)	56

ABREVIATURAS

mg/L Micrograma por litro

µL Microlitros

ACh Acetilcolina

AChE Acetilcolinesterase

Ag Argônio

ANOVA Análise de Variância

ATP Adenosina Trifosfato

BSA Bovine Serum Albumin

CAT Catalase

Cd Cádmio

CDNB1 Chloro-2,4-dinitrobenzene

cm Centímetros

Co Cobalto

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

COOH Grupos Carboxila

Cr Cromo

Cu Cobre

DTNB (5,5 Dithio-bis(2-Nitrobenzoic acid))

ERO Espécie Reativa de Oxigênio

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

GST Glutationa- S- transferase

H2O2 Peróxido de hidrogênio

Hg Mercúrio

HPAs Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

i Inverno

M Molar

mg kg⁻¹ Miligrama por quilograma

mg/L Miligrama por litro

mL Mililitros

mM Milimolar

Mn Manganês

n Número de indivíduos por ponto de coleta

NH₂ radical amina

nm Nanômetro

O₂• Superóxido

°C Graus Célcius

OH Hidroxila

Pb Chumbo

PCBs Bifenilas policloradas

pH Potencial Hidrogeniônico

RO• Alcoxila

ROO• Peroxila

SH grupos tióis

v Verão

Zn Zinco

SUMÁRIO

1	
INTRODUÇÃO.....	19
1.1 FLORIANÓPOLIS E O SANEAMENTO BÁSICO.....	20
1.2 MOLUSCOS BIVALVES COMO BIOMONITORES MARINHOS.....	23
1.3 EXTRESSE OXIDATIVO.....	29
1.3.1 Metais e o Estresse Oxidativo.....	31
1.4 BIOMARCADORES.....	33
1.4.1 Catalase.....	34
1.4.2GST.....	34
1.4.3 Acetilcolinesterase.....	35
2 OBJETIVOS.....	37
3 METODOLOGIA.....	39
3.1 DISSECAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
3.2 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
3.3 ENSAIO CINÉTICO.....	41
3.3.1 Catalase.....	42
3.3.2GST.....	42
3.3.3 Acetilcolinesterase.....	42
3.3.4 Proteínas Totais.....	42
3.3.5 Cálculo da Cinética Enzimática.....	45
3.3.6 Análise das concentrações de metais.....	45
4 RESULTADOS.....	45
4.1 DADOS BIOMÉTRICOS.....	46

4.2 DADOS DE BALNEABILIDADE.....	47
4.3 DADOS BIOQUÍMICOS.....	48
4.4 ANÁLISE DE METAIS.....	51
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

1. Introdução

O Brasil possui 7.408 Km de costa litorânea (MENEZES, 2010) em que suas águas marinhas apresentam diversas funções para muitos seres vivos e para o homem sendo importante a manutenção da qualidade destas águas tanto para a balneabilidade e lazer como para as atividades de aquicultura.

O litoral catarinense possui 561,4 Km de extensão, delimitada ao norte pela latitude 25°58'36" e longitude 48°35'36", e ao sul por 29°42'57" de longitude (SOARES, 2012). O estado conta com atividades de aquicultura como a pesca artesanal e o cultivo de moluscos, tendo destaque nacional a produção de ostras e mexilhões. A produção total de moluscos bivalves em 2014 foi de 21.553,6 toneladas, representando um aumento de 12,95% em relação ao ano anterior (EPAGRI, 2014). Em Santa Catarina, o cultivo de mexilhões cresceu na maioria das enseadas e baías da costa centro-norte, devido às condições oceanográficas propícias, sendo destaque na América latina como maior produtor destes bivalves (MERENZI e BRANCO, 2006).

As atividades de aquicultura vêm se desenvolvendo ativamente nas últimas décadas do século XX na cidade de Florianópolis, a qual demonstra rentabilidade satisfatória, gerando empregos, produzindo alimentos com alto valor protéico e contribuindo para a diminuição da pesca predatória e da degradação ambiental (SILVA, 2007). Na capital catarinense, ostras e mexilhões são utilizados como iguarias na região, sendo vistas com grande apreciação na culinária, pela população residente e turística. Conforme Pereira e colaboradores (2010) afirmam que:

No Brasil o cultivo de moluscos marinhos se aproxima ao modelo de desenvolvimento familiar sustentável, e esta atividade tem apresentado um crescimento bastante significativo, sobretudo no estado de Santa Catarina. O cultivo destes moluscos no mar/estuários é uma atividade que se caracteriza pelo baixo custo de implantação e manutenção, e pelo rápido retorno de capital, tornando-a assim uma opção de trabalho e renda das populações de pescadores artesanais nas suas áreas de origem.

A capital catarinense necessita da qualidade das águas marinhas, pois sua economia é baseada principalmente no turismo e na aquicultura, necessitando de níveis seguros de qualidade de água tanto para a balneabilidade quanto para a saúde pública, pela ingestão de organismos marinhos. A aquicultura é movida tanto na pesca de peixes, camarões quanto no cultivo de bivalves, como ostras de cultivo e mexilhões naturais. O Estado lidera o ranking de cultivo de ostras e mexilhões, com cerca de um milhão de dúzias por ano (MENEZES, 2011).

Andrade (2016) afirma que após 30 anos de incentivo da Universidade Federal de Santa Catarina à miticultura, o estado de Santa Catarina se tornou o líder nacional na produção de moluscos bivalves e o segundo maior produtor da América Latina. Henriques (2004) comenta que os moluscos bivalves constituem estoques naturais de recursos renováveis os quais necessitam do ecossistema equilibrado para sua reprodução e desenvolvimento.

Esses animais são de suma importância para a qualidade alimentar de diversos organismos, já que possuem grandes quantidades de nutrientes como também importância ambiental, pois tem a capacidade de bioacumular metais em seus tecidos demonstrando as reais quantidades desses elementos que o ambiente possui.

1.1 Florianópolis e o Saneamento Básico

A partir do século XX o município de Florianópolis teve grandes investimentos em relação ao saneamento básico, à frente de muitas cidades importantes do Brasil, contando com abastecimento de água, coleta e tratamento de esgotos. Porém, em algumas décadas essa situação mudou drasticamente. Neste período a capital catarinense foi amplamente urbanizada e os investimentos em saneamento básico não acompanharam esse crescimento, resultando em grandes quantidades de rejeitos jogados ao mar (OUROFINO e PASSOS, 2015). Com a passagem dos anos a cidade continuou sua expansão em relação à economia e turismo, porém os problemas decorrentes a falta de saneamento básico continuaram, destacando-se no que se refere ao esgotamento sanitário. Nesse sentido Marengoni (2013) comenta que:

“Devido ao crescimento da população mundial, a rápida industrialização, a intensificação da aquicultura e a utilização indiscriminada dos recursos naturais têm gerado aumento nos níveis de poluição ambiental, causando sérios problemas para o ecossistema, principalmente devido à contaminação química.

Florianópolis apresenta intensa urbanização, adensamento muitas vezes registrado sem urbanidade, com grande fluxo de pessoas pelos atrativos que a cidade possui. Mas ainda não se tem capacidade de infraestrutura adequada para atender a população, tão pouco essa condição é satisfatória para os residentes. Ações concretas têm sido requeridas junto ao ministério público, destinadas a recuperação de áreas degradadas e a adequação das estações de tratamento de efluentes para providências legais. Contudo, ainda são poucas as ações implementadas em relação ao esgotamento sanitário produzido nas comunidades. Isso tem

contribuído para a perda da qualidade de vida dos moradores e das atividades desenvolvidas nos locais (LOPES, 2006).

Em toda a extensão territorial da capital catarinense, 436,5Km², existem apenas quatro sistemas de tratamento de esgotos operantes (Figura 1), os quais não conseguem atingir ao total produzido nas moradias.

Localização das Estações de Tratamento de Esgoto

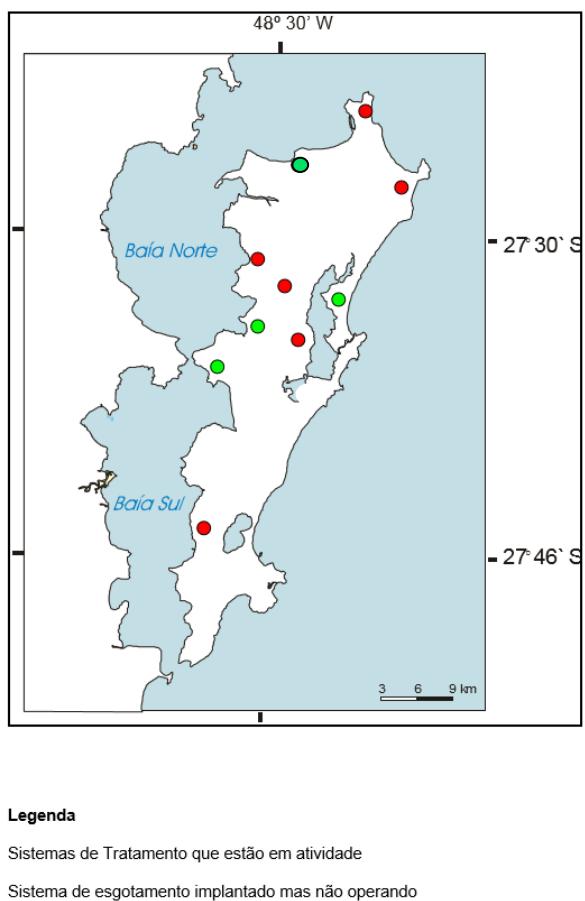


Figura 1. Representação dos locais em Florianópolis que possuem Sistemas de Tratamento de Esgoto em Atividade e os locais que possuem Sistemas de Tratamento de Esgotos não operantes (modificado de LOPES, 2006).

De acordo com Lopes (2006) os sistemas de tratamento de esgoto são:

1. Sistema de Esgoto Florianópolis/Insular, o qual recebe as localidades do Centro, Agronômica, Trindade, Santa Mônica, Saco dos Limões e Prainha, com nível de atendimento de 74,32%;
2. Sistema de Esgoto Florianópolis/Norte da Ilha/Canasvieiras, que acolhe o Balneário de Canasvieiras com nível de atendimento de 41,01%;

3. Sistema de esgoto Florianópolis/Lagoa da Conceição atende ao Centrinho da Lagoa da Conceição e Avenida das Rendeiras, com 45,65% de atendimento;

4. Sistema de Esgoto Parque Tecnológico Saco Grande, abrangendo o Centro Tecnológico Saco Grande e atende a 100% da área delimitada.

De acordo com a Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN, 2016) a capital do Estado conta atualmente com o total de 56% de cobertura de esgoto e estará com 74% até o final de 2018.

A palavra poluição deriva do latim *polluere* que significa sujar, sendo a poluição marinha a introdução, pelo homem, de substâncias ou energia no ambiente marinho, acarretando em efeitos deletérios, como danos aos seres vivos, a saúde humana e interferindo nas atividades marinhas que incluem a pesca e lazer e desta forma diminuindo a qualidade de vida (PEREIRA e GOMES, 2009). A poluição marinha na cidade de Florianópolis se dá principalmente pelo esgotamento sanitário, o qual é despejado em grandes quantidades em toda a ilha, afetando os ambientes costeiros.

Os efluentes urbanos e domésticos possuem altos teores de substâncias orgânicas, ricas em carbono, nitrogênio e fósforo. Com base na definição do CONAMA resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, os esgotos sanitários são a denominação genérica para despejos líquidos residenciais, comerciais, águas de infiltração na rede coletora, os quais podem conter parcela de efluentes industriais e efluentes não domésticos (BRASIL, 2011). Quando eles atingem o mar, são degradados por microrganismos e há a transformação em compostos orgânicos recebendo o nome de mineralização. Porém, como em qualquer outro ambiente, o mar tem seus limites e quando a capacidade de mineralização é excedida os compostos orgânicos são acumulados nos ambientes.

Um dos grandes problemas da elevada taxa de efluentes domésticos e industriais terem o destino final os mares, é a inserção de substâncias orgânicas nos ecossistemas marinhos que são alimento de algumas algas. Na presença destes organismos, como os dinoflagelados, há um grande aumento em sua população pela elevada taxa de reprodução em condições ambientais adequadas. Em curto período de tempo pode causar o fenômeno conhecido como maré vermelha ou *Harmful Algal Blooms* (BARBIERI, 2009). Esse fenômeno pode causar desde pequenas alterações no ecossistema ou até mesmo afetar grandemente os organismos aquáticos causando anoxia, produção de toxinas, ação mecânica da estrutura anatômica da sua parede celular nos tecidos delicados das brânquias (VALE, 2004). Vale (2004) também afirma que as marés vermelhas são importantes na Saúde Pública, pois, “as contaminações

com as biotoxinas, em moluscos bivalves que possuem alimentação filtradora, podem originar outras intoxicações nos seres humanos, mesmo que não afetem aparentemente os organismos contaminados”.

Como já foi dito, os esgotos sanitários domésticos são formados por grande quantidade de água, compostos orgânicos como: proteínas, carboidratos, gorduras e hormônios e compostos inorgânicos como: areia, sais e metais. Os metais correspondem ao micropoluente inorgânico, os quais se dissolvem na água, a exemplo tem-se o arsênio, cadmio, cromo, chumbo, mercúrio e prata (SPERLING, 1996).

Segundo Marengonie e colaboradores (2013), o aumento da poluição dos recursos aquáticos tem um efeito negativo sobre a produtividade aquícola, segurança e rentabilidade e a relação da poluição pode ser estabelecida como:

Aumento da concentração de elementos químicos oriundos de esgotos domésticos, lixos e escoamento de resíduos agrícolas e pecuários, levando as alterações no índice da qualidade da água, eutrofização e, possivelmente, à bioacumulação de metais, entre outros.

1.2 Moluscos Bivalves como Biomonitoradores Marinhos

O filo molusca possui aproximadamente 100 mil espécies atuais e 35 mil espécies extintas descritas, é o segundo filo animal de maior diversidade perdendo apenas dos artrópodes. Os mexilhões *Perna perna* são invertebrados, possuem corpo não articulado e mole, simetria bilateral. Esses organismos da classe Bivalvia vivem exclusivamente na água, com concha formada por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento, geralmente são de sexos separados, pode ocorrer o hermafroditismo, sua fecundação pode ocorrer livremente na água ou ser interna. (LUNETTA, 1969).

Os *Perna perna* são animais filtradores, o que lhes confere grande importância ecológica, podendo ser utilizados como biomonitoradores de ambientes aquáticos. Suas conchas possuem importância ecológica e econômica já que podem servir de abrigo para outros animais e participar da reciclagem de nutrientes, como o calcário, além de servirem como matéria prima de artesanatos pelas comunidades nativas. Sua respiração é realizada através de brânquias, habitam mares, estuários, água doce ou em áreas costeiras fixados em rochas ou no substrato. (MENEZES, 2010).

O maior mitilídeo brasileiro pertence à espécie *Perna perna* (KLAPPENBACH, 1965), sua valva podendo atingir até 140 mm de comprimento. Não há dimorfismo sexual externo, porém machos e fêmeas podem ser diferidos internamente quando estão sexualmente

maduros, pela coloração das gônadas que se apresentam branco leitosas nos machos, enquanto nas fêmeas a coloração é vermelho tijolo (HENRIQUES, 2004).

O cultivo de mexilhões, a miticultura, iniciou no estado de Santa Catarina em 1989, com o cultivo do mexilhão *Perna perna* (Figura 2), o qual vive fixado em costões rochosos, ambiente abundantemente encontrado no estado de Santa Catarina, destacando-se nas cidades de Palhoça, Penha, Bombinhas, Governador Celso Ramos e Florianópolis (SILVA, 2007). Em Canasvieiras, Santinho, norte de Florianópolis, bem como Joaquina, leste, há um grande número de mexilhões da espécie *Perna perna*, desenvolvendo-se naturalmente fixados em costões rochosos, em grande número e possuindo facilidade de coleta.



Figura 2. Mexilhão *Perna perna* coletado na praia do Santinho, Florianópolis, Santa Catarina.

As áreas costeiras, ambiente natural dos moluscos bivalves, são consideradas a interface terra, mar e ar, são altamente produtivas e possuem uma alta riqueza de espécies de grande importância ecológica e econômica. A grande variedade de organismos e o fácil acesso tornam os costões rochosos um dos mais populares e bem estudados ecossistemas marinhos. (PEREIRA e GOMES, 2009). Os mexilhões oriundos do ambiente natural, apesar de possuírem o mesmo potencial genético dos indivíduos cultivados, tem o seu crescimento limitado, devido a fatores de estresse ambiental que ocorrem continuamente no costão rochoso (HENRIQUES, 2004). Os costões rochosos, segundo Berchez *et.al* (2012) são:

Ecossistemas costeiros sujeitos a influencia dos processos marinhos e terrestres. São formados por rochas ígneas, como granito e o basalto, e metamórficas, como o gnaisse. Os costões rochosos graníticos e gnáissicos ocorrem desde o norte do estado do Rio Grande do Sul até o estado do Maranhão. Podem formar paredões contínuos ou blocos fragmentados. Quando fragmentados, oferecem uma grande variedade de ambientes que podem ser ocupados por organismos adaptados as diversas condições ambientais resultantes, levando a maior diversidade biológica.

Os bivalves constituem alimento muito nutritivo pelos seus altos teores proteico e vitamínico, porém possuem grande capacidade de bioacumulação, fazendo com que seu consumo tenha risco em ambientes poluídos por poderem transferir esses poluentes na cadeia trófica. Barreto e colaboradores (2008) afirmam que:

Moluscos bivalves oferecem um grande risco ao consumidor, porque dentre os animais marinhos capturados em ambientes contaminados por microrganismos, os moluscos bivalves são os que oferecem maiores riscos à Saúde Pública, por serem organismos filtradores e bioacumuladores. Por esta razão, as ostras e os mexilhões, são utilizados mundialmente como indicadores de poluição fecal.

Os metais tem grande importância nos ecossistemas marinhos, pois são o destino final de muitos resíduos os quais possuem essa classe química. Quando absorvidos pelos organismos de moluscos bivalves, como ostras e mexilhões, inicialmente são distribuídos para o requerimento de cada tecido. Após essa primeira via, se as quantidades de metais forem superiores a necessidade fisiológica, eles então podem ser bioacumulados, principalmente os micronutrientes, constituintes de proteínas e enzimas. Mesmo que as taxas de metal traço nos organismos dos bivalves sejam altas, por vezes, esses animais não demonstram sinal de toxicidade aparente. No entanto, intracelularmente, os sistemas de detoxificação e degradação destes compostos químicos são acionados assim que o organismo entra em contato com os tóxicos (GALVÃO, 2009).

Além de matéria orgânica os metais estão presentes nos ambientes marinhos ou por questões naturais, composição das rochas, ou por atividades antrópicas como a queima de combustíveis fósseis, atividades industriais, mineração e nos esgotos domésticos (PEREIRA e GOMES, 2009). Conforme Filho *et.al.*, (2012):

Uma vez que o metal se acumula nos tecidos do organismo, esta concentração expressa uma medida integrada do tempo ao qual o animal ficou efetivamente exposto ao elemento (Bryan et al., 1980). Determinar as concentrações dos contaminantes na biota significa monitorar os níveis da fração “biodisponível” destes nos ecossistemas.

Ou seja, quando há quantidades de metais superiores aos níveis em que os animais marinhos conseguem absorver e o seu excedente excretar, estes elementos químicos podem ser bioacumulados, interferindo nos processos orgânicos.

As águas oceânicas são consideradas como a última etapa do ciclo hidrológico de diversos tipos de contaminantes, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas, compostos nitroaromáticos, metais e pesticidas, aonde chegam por três vias: contribuição continental pelos rios, entrada atmosférica e fontes hidrotermais (GALVÃO *et.al.*, 2009). O ambiente que envolve os mares, oceanos e estuários é altamente complexo e diverso, compostos por interações entre os compostos bióticos e abióticos característicos, elementos químicos diversos, animais que habitam esses

ecossistemas, plantas, microorganismos, todos estão em contato na dinâmica marinha (COSTA *et.al.*, 2008).

As consequências das substâncias tóxicas dependem da sua concentração no organismo, independente do mecanismo de intoxicação. Apesar de que os organismos necessitam de elementos químicos variados como, por exemplo, os metais para seu funcionamento normal, sendo eles bioenergéticos e necessários para algumas rotas metabólicas, em grandes quantidades, podem ser venenosas e acumulativas nos organismos (AGUIAR e NOVAES, 2002). Existem diferentes estratégias que podem ser adotadas para se estudar o nível da poluição do ambiente marinho. Pode ser a análise e identificação dos poluentes, presentes na água, sedimento e nos organismos. Porém, apesar de estas técnicas serem muito precisas, elas apresentam um custo operacional muito alto e não indicam os efeitos tóxicos nos organismos. Outra forma de análise é através de biomarcadores (ALMEIDA, 2003).

Moreira e Moreira (2004) afirmam que os sistemas enzimáticos são altamente suscetíveis aos metais, o que demonstra alterações em suas atividades enzimáticas quando expostos a estes elementos químicos. Alumínio, arsênio, bário, berílio, cádmio, chumbo, mercúrio e níquel são os metais que tem maior taxa de intoxicação nos seres vivos, eles alteram as estruturas celulares das enzimas substituindo os seus cofatores. Já o cromo, cobre e zinco, micronutrientes essenciais do metabolismo, encontrados em abundância na natureza, possuem grande importância e quando suas taxas são alteradas, maiores ou menores quantidades, podem causar excesso ou carência, distúrbios e até a morte dos organismos (VIRGA *et.al.*, 2007)

Conforme Géret e colaboradores (2001) relatam, os moluscos bivalves podem bioacumular metais em seus tecidos, causando efeitos negativos em seus organismos. Esses animais são filtradores, característica de sua alimentação e podem biomonitorar ambientes aquáticos por possuir características importantes como (GALVÃO *et.al.*, 2009):

- a) Ocorrência em estuários e zonas costeiras;
- b) São sésseis, o que não lhes permitem escapar da poluição se deslocando para outras áreas;
- c) Tempo de vida é relativamente longo, permitindo estudos em longo prazo;
- d) Grande distribuição geográfica: aparecem frequentemente em alta densidade;
- e) São de fácil coleta;

f) Acumulam concentrações de contaminantes em seus tecidos acima do encontrado nos ambientes, sem que apresentem efeitos tóxicos;

Conforme Evangelista Barreto, Souza e Vieira (2008), pelas características fisiológicas dos bivalves como a filtração, estes podem trazer riscos também a saúde humana, pois:

Os moluscos bivalves são os que oferecem maiores riscos à Saúde Pública, por serem organismos filtradores e bioacumuladores. Por esta razão, as ostras e os mexilhões, são utilizados mundialmente como indicadores de poluição fecal dos ecossistemas marinhos.

Os bivalves marinhos entram em contato com metais em altas quantidades, os elementos são absorvidos pelos tecidos e transportados para suprir o requerimento dos diferentes tecidos. As brânquias, músculo e divertículo digestivo são os tecidos que entram em contato mais facilmente com os metais. Nas brânquias há o reflexo de exposições recentes (agudas), na glândula digestiva integra exposições crônicas e o músculo também é um tecido de estocagem de metais, em menores exposições do que os anteriormente citados (GALVÃO *et.al*, 2009).

Em altas concentrações os metais nos moluscos bivalves causam processos de bioacumulação a qual é compreendida como o processo em que substâncias químicas são assimiladas e retidas nos organismos vivos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Conforme a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 nº 053, de 18/03/2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011 (BRASIL, 2005):

Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

Nesta resolução, seção III, artigo 18, explicita as quantidades das concentrações máximas de metais permitidas para águas salgadas, ou seja, naquelas concentrações a maioria dos seres vivos vai permanecer com suas atividades funcionais normais e não haverá bioacumulação nos organismos. Caso contrário, os metais podem ser biomagnificados na cadeia trófica até chegar aos seres humanos, causando-lhes diversos problemas desde níveis celulares até ao organismo como um todo. Moraes e Jordão (2002) afirmam que:

Alguns metais são capazes de provocar efeitos tóxicos agudos e câncer em mamíferos devido a danos que causam no DNA. Até mesmo os elementos químicos essenciais à manutenção e a saúde, quando em excesso, tornam-se nocivos, podendo comprometer gravemente o bem-estar dos organismos.

Para cada espécie e indivíduo as características de bioacumulação e danos em seus tecidos e órgãos são bem específicas, porém esse acúmulo anormal é registrado e passível de ser observado via biomonitoramento marinho, conforme descrito por Filho e colaboradores (2012):

A toxicidade de metais em organismos aquáticos e seu equilíbrio são influenciados por alguns fatores limnológicos, tais como pH, alcalinidade, dureza, matéria orgânica, sólidos totais e cargas de sedimentação.

Os metais que os invertebrados marinhos podem concentrar são os metais tóxicos não-essenciais, aqueles que não participam das atividades orgânicas como cadmio (Cd), argônio (Ag), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cromo (Cr), ou metais essenciais, considerados nutricionalmente importantes, como cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e cobalto (Co) (FERNANDEZ et. al, 2008). Em moluscos bivalves a absorção de metais acontece quando estes estiverem ligados à fase particulada. Ferreira e colaboradores (2000) relatam como os diferentes metais atuam nos organismos de bivalves:

Elementos como cobre, ferro e zinco participam dos processos de compostos enzimáticos, fazendo parte do sistema aceptor/doador de elétrons em muitos organismos. Já os elementos não essenciais como o cadmio, mercúrio e chumbo, por não seres necessários às funções biológicas, podem apresentar efeitos tóxicos crônicos ou agudos, mesmo quando em baixas concentrações, principalmente por meio de competição por sítios de ligação com os metais essenciais.

Quando os organismos vivos, bioacumuladores, entram em contato com elementos tóxicos, estes causam um estresse, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), tal como o íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e oxigênio livre (O_1) (COGO *et.al*, 2009). Esses radicais podem ser formados pelo contato do organismo com as substâncias tóxicas, que são bioacumuladas e geram como consequência, o estresse oxidativo.

Cogo et. al (2009) também comentam que os radicais livres produzidos pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucléicos e resultam em diversos problemas metabólicos de origem bioquímica ou genética. A detoxificação das espécies reativas de oxigênio é indispensável para a vida o que proporciona o desenvolvimento de muitas defesas orgânicas a fim de prevenir, interceptar e reparar os danos no organismo. Quando os organismos são expostos a metais pode elevar a atividade das enzimas do estresse oxidativo, como a catalase (CAT) e a glutationa-s-transferase (GST), que utilizam esses compostos como seus substratos específicos (COGO *et.al*, 2009) além de interferir na atividade da acetilcolinesterase. Essas enzimas são biomarcadoras de

contaminação em diversos organismos, Lehninger (1977) afirma que elas são de extrema importância e especificidade única, pois são:

As células que podem operar como máquinas químicas porque possuem enzimas, catalizadores capazes de aumentar bastante à velocidade das reações químicas específicas. As enzimas são moléculas proteicas altamente especializadas, feitas pelas células a partir de aminoácidos. Cada tipo de enzima catalisa somente um tipo específico de reação química.

Desta forma, trabalhos de pesquisa sobre a análise de metais em bivalves marinhos em mexilhões coletados naturalmente são de suma importância, já que análises em *Perna perna* de cultivo já foram realizadas por outros autores. Estes organismos além se servirem para a alimentação humana e para outros animais, bioacumulando estes elementos, conseguem demonstrar o quanto o ambiente aquático está poluído.

1.3 Estresse Oxidativo

Os organismos vivos sofrem ações constantes de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de outros elementos químicos. Espécies reativas de oxigênio são aquelas substâncias que não possuem elétrons emparelhados na última camada eletrônica, causando alta reatividade e alta capacidade em participar de reações químicas (LUSHCHAK, 2011). As EROs são formadas em organismos aeróbios, os quais são dependentes da absorção de oxigênio para que haja a obtenção de energia através da adenosina trifosfato (ATP), participando do metabolismo celular e das vias de biotransformação. Quando há um desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio, alguns sistemas antioxidantes são ativados para sanar esses problemas, esses sistemas são formados por enzimas biomarcadoras.

Dentro das vias da respiração celular algumas alterações podem ser geradas em resposta a exposição a contaminantes, reações inflamatórias ou por disfunções biológicas, originando os radicais livres. Existem muitas reações de degradação dos aminoácidos e gorduras, ocasionadas pelo estresse oxidativo, as quais produzem as espécies reativas de oxigênio capazes de lesar os diversos organismos. Para uma resposta eficaz contra lesões à célula, formam-se estruturas denominadas de peroxissomos, que as defendem desses produtos. Os peroxissomos são pequenas vesículas envoltas por membrana, onde ocorrem as reações devido a grande quantidade de catalase (LEHNINGER et al, 1995).

Ferreira e Matsubara (1997) comentam que os agentes oxidantes (EROs) são gerados endogenamente como resultado direto do metabolismo do oxigênio e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de oxigênio. Nas vias de biotransformação, esses xenobióticos mais lipofílicos, ou seja, aquelas que possuem alto coeficiente de partição lipídio:água, tendem a serem acumuladas no organismo, sendo em que os meios usuais de eliminação são fundamentalmente aquosos. Então existe meios de transformar esses compostos lipofílicos em hidrossolúveis, nas vias de biotransformação e assim esses metabólitos gerados serem eliminados facilmente pelos organismos (ROCHA, 2004).

Na maioria dos casos as biotransformações resultam em diminuição de um efeito tóxico dos xenobióticos, porém essa não é uma regra, podendo existir xenobióticos com maior toxicidade após a biotransformação (ROCHA, 2004). As reações de biotransformação podem ser divididas em fase I, fase II e fase III.

Durante a fase I, ocorrem às reações de hidrólise, redução e oxidação, estas reações adicionam grupos funcionais como hidroxila (OH), radical amina (NH₂), grupos tióis (SH) ou grupos carboxila (COOH), na molécula do xenobióticos, normalmente gerando compostos mais hidrossolúveis e menos tóxicos quando comparados à molécula original, assim muitas vezes sendo mais fácil de serem excretados (ALMEIDA, 2003). As principais enzimas catalizadoras da fase I são as mono-oxigenases como o citocromo P450, citocromo B5, NADPH citocromo e P450 redutase (FERNANDES, 2005).

Quando a eliminação do xenobiótico precisa de mais transformações, estas ocorrem na fase II, pois os grupos funcionais para que ela ocorra já foram inseridos e a molécula ainda está presente no organismo. Fernandes (2005), afirma que na fase II, os metabólitos são conjugados a determinadas substâncias como o glutamato, sulfato e glutationa a fim de haver maior solubilização e sua posterior eliminação.

Na fase III, os metabólitos, agora conjugados, que ainda não foram eliminados dos organismos e precisam aumentar sua solubilidade, são catalisados novamente para resultar em produtos excretáveis.

São vários os fatores externos que podem causar o estresse oxidativo em animais marinhos. Conforme Lushchak (2011) afirma que não apenas xenobióticos podem levar a produção de EROS, pois eles são produzidos continuamente durante a vida do animal, como

também, as mudanças nos ambientes em que esses indivíduos estão sendo expostos como a temperatura, por exemplo.

O aumento de temperatura pode causar maior absorção de oxigênio, podendo haver acréscimo também na produção de EROs. Quando a temperatura é unida a maior disponibilidade de oxigênio, pode novamente haver um aumento significativo na produção de EROs, ou seja, os níveis de oxigênio são extremamente importantes no ambiente aquático. O aumento da salinidade também pode ser tóxico devido à indução do estresse oxidativo. Outros fatores como íons metálicos, herbicidas e pesticidas também podem alterar o metabolismo dos organismos e as taxas oxidativas.

1.3.1 Metais e o Estresse Oxidativo

Além dos fatores ambientais, os metais em sua forma iônica podem causar alterações metabólicas nos organismos pela indução do estresse oxidativo. Os metais podem manter-se em solução na água, serem adsorvidos no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos (GALVÃO et al., 2009). Ferreira e Matusubara (1999) comentam que os estudos acerca das lesões oxidativas vem demonstrado que as ações catalíticas dos metais nas reações levam ao estresse oxidativo, demonstrando a importância em estudar os organismos e não apenas a água e o sedimento.

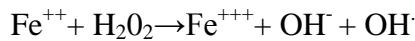
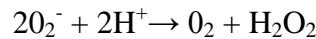
Albuquerque (2007) comenta que mesmo sendo importantes as análises de água e sedimento para a avaliação da contaminação ambiental por metais, elas não fornecem os dados reais sobre a disponibilidade e os efeitos dos metais nos organismos. Assim sendo, a análise de biomarcadores na biota constitui uma importante ferramenta em programas de monitoramento ambiental, pois avalia o efeito real da contaminação. O estímulo na produção de EROs pode acontecer de duas maneiras diferentes, a primeira quando há interferência de processos relacionados ao metal e a segunda na geração de radicais livre pelos íons metálicos com valências mutáveis (LUSHCHAK, 2011).

Dentre os metais que mais agridem o metabolismo oxidativo dos animais pode-se citar: ferro, cobre, cromo, arsênio e mercúrio como os potencialmente mais tóxicos. Dentre os metais o ferro é um dos mais importantes, compondo 30% da massa total do planeta. Também constitui 80% do núcleo e é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre depois do oxigênio, silício e do alumínio (SEMMLER, 2007).

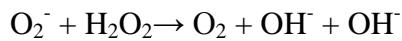
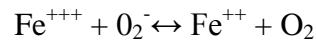
Todos os organismos precisam de ferro para sobreviver, porém suas quantidades exacerbadas ou diminutas causam problemas sérios aos seres vivos. Em animais que dependem de oxigênio para sobreviver, como os mexilhões, em presença de ferro pode haver produção de espécies reativas de oxigênio como hidroxila (HO^\cdot), superóxido (O_2^\cdot), peroxila (ROO^\cdot) e alcoxila (RO^\cdot); e os não radicais: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso através das reações de Fenton e Haber- Weiss (Equações 1 e 2 respectivamente).

Mesmo o cobre sendo também um catalizador das reações de Haber-Weiss, o metal mais abundante nos organismos é o ferro, estando portanto mais capacitado a catalisar as reações das biomoléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Por o ferro sofrer um ciclo redox, ele também está envolvido na iniciação e propagação dos processos que incluem os radicais livres (LUSHCHAK, 2011). Abaixo estão descritas as reações de Fenton e de Haber-Weiss e sua relação com o íon ferro:

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



Quanto ao cobre, organismos marinhos respondem a regulação, transporte e excreção como os mamíferos, porém quando expostos a uma quantidade grande deste elemento químico através da dieta ou por absorção, ele pode se tornar tóxico e participar de reações oxidativas, como descrito acima. Normalmente a primeira via de acesso ao elemento é através das brânquias, nela sendo identificadas as maiores exposições (KAMUNDE; CLAYTON e WOOD, 2002).

Curtius e colaboradores (2003) analisaram metais em *Perna perna* e *Cassotrea gigas* da região do Sambaqui, Florianópolis, tais como: arsenio, argonio, cromo, manganes, zinco,

níquel, cádmio, cobre, chumbo e selenio, em ostras e mexilhões *Perna perna*, demonstrando naquele momento não haver contaminação nos organismos testados. Porém o mar é altamente dinâmico e na capital catarinense é notória a importancia em analisar os metais e biomarcadores enzimáticos em regiões com grande concentração de habitações e turistas, considerando as variações sazonais.

1.4 Biomarcadores

Biomarcadores podem ser definidos como alterações a nível celular, bioquímico ou fisiológico que expressem a exposição e/ou efeito tóxico causado pelos xenobióticos presentes no ambiente (WALKER et al., 1996). Com essas alterações a nível molecular existem informações dos efeitos destas substâncias sobre os organismos. Linde-Arias e colaboradores (2005) definem biomarcadores como sendo:

...Medidas de fluidos corporais, células e tecidos, ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos a presença de poluentes ou a magnitude da resposta do animal exposto.

Os biomarcadores de exposição indicam a exposição dos organismos aos contaminantes, já os biomarcadores de efeito são aqueles que demonstram como a magnitude da perturbação é causada em resposta a poluentes (CAJARAVILLE et al., 2000; ZANETTE, 2009). Como biomarcadores de exposição, existem as enzimas de biotransformação de xenobióticos, as metalotioneínas e as defesas antioxidantes podendo ser enzimáticas e não enzimáticas, já no que confere os biomarcadores de efeito estão os níveis de dano ao DNA e de oxidação de lipídios e proteínas (RAND et al., 1995; CAJARAVILLE et al., 2000; ZANETTE, 2009).

Existem muitas enzimas que são compreendidas como biomarcadores moleculares e respondem aos tóxicos existentes devido à poluição das águas. Segundo Fernandes (2005), os biomarcadores mais sensíveis são as alterações das enzimas de biotransformação. Essas enzimas que apresentam estrutura tridimensional individual com um sítio ativo que se liga ao substrato específico, ditada pela ordem dos aminoácidos na sua cadeia, porém quando os compostos tóxicos se ligam à sua estrutura, ela pode ser desenovelada, ou desnaturada, sendo convertida em uma cadeia polipeptídica flexível que perdeu a sua conformação original, que pode torná-la inativa (LEHNINGER et al. 1995).

Quando há contaminação marinha por xenobióticos, EROs são formadas no processo de estresse oxidativo e algumas enzimas respondem aumentando, diminuindo ou cessando suas

atividades. As respostas das enzimas são capturadas por diferentes protocolos analíticos, sendo as enzimas: Glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GR) (FRANCO *et.al*, 2006) umas das mais analisadas, pelo fato de responderem a uma variedade de contaminantes presentes no meio. Neste estudo serão analisadas catalase, glutatina-s-transferase e acetilcolinesterase, está última que não necessariamente participa do estresse oxidativo, porém responde muito bem a presença de xenobióticos e metais.

1.4.1 Catalase

Segundo Christo (2014), a catalase é uma hemeproteína que catalisa a degradação do peróxido. Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida a água. Está localizada, principalmente, no peroxissoma, entretanto, outras organelas, como as mitocôndrias, podem conter alguma atividade da catalase. A catálise do peróxido de hidrogênio é extremamente importante, pois quando há ferro, leva a formação de radical hidroxil que é altamente reativo e danoso as biomoléculas.

Dentro dos sistemas enzimáticos de defesas a antioxidantes, a catalase é uma das mais importantes, juntamente com a superóxido dismutase e glutationa peroxidase (FERNANDES, 2005).

1.4.2 GST

A glutationa-S-Transferase pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais (COGO *et.al*, 2009). É um tripeptídeo largamente utilizado como biomarcador, isso significa que ela responde em diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos. Em alguns casos a atividade enzimática pode ser inibida por ação de compostos intoxicantes, ou pode ser elevada em outras espécies de organismos expostos a um mesmo grupo de contaminantes, pois isso depende da quantidade de exposição a um metal, por exemplo, saúde do animal e condições ambientais (COGO *et.al*, 2009). As glutationas S-transferases (GSTs) são conhecidas como sendo as principais enzimas de biotransformação de fase-II e representam uma família de enzimas relacionadas com a conjugação de uma variedade de metabólitos eletrofílicos endógenos e exógenos (xenobióticos) com o tripeptídio glutationa (GSH) (ZANETTE, 2009).

1.4.3 Acetilcolinesterase

Já a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por quebrar a acetilcolina, neurotransmissor, que atua nas sinapses colinérgicas. Araújo e colaboradores (2016) explicam que é nas sinapses que a acetilcolina (ACh) atua transmitindo as mensagens entre os neurônios. Essas sinapses colinérgicas estão distribuídas no sistema nervoso central e periférico, sendo indispensável para a manutenção dos organismos dos seres vivos. Quando ela é exposta a metais e xenobióticos pode ser inibida, desta forma sendo mais uma enzima sensível e, portanto utilizada como biomarcadora da presença de ecossistemas contaminados (JESUS e CARVALHO, 2008). Embora os metais sejam conhecidos por causar inibição de AChE, existem alguns estudos que relatam efeitos opostos para metais específicos durante a exposição aguda de diferentes organismos (BAINY *et.al*, 2006).

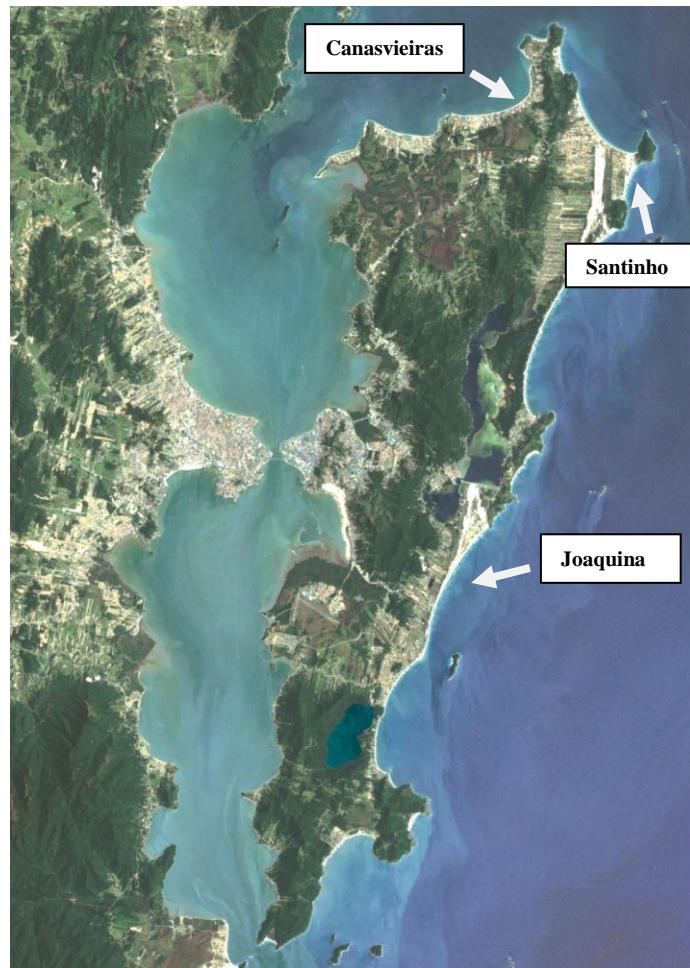
Dessa forma, fica evidente a importância de se verificar as possíveis alterações fisiológicas e bioquímicas em moluscos bivalves, mais especificamente no mexilhão *Perna perna*, coletados em diferentes locais de Florianópolis-SC, que se encontram em processo de contaminação e/ou poluição.

2 Objetivos:

- Analisar os metais cobre (Cu), Chumbo (Pb), zinco (Zn) e ferro (Fe), presentes nos tecidos: brânquias, glândula digestiva e músculo de mexilhões da espécie *Perna perna*, coletados durante verão e inverno, em um período de um ano, em: Canasvieiras, Santinho e Joaquina, na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.
- Determinar a atividade enzimática da Catalase (CAT), Glutationa-S-Transferase (GST) e Acetylcolinesterase (AChE), em brânquias, glândula digestiva e músculo de mexilhões da espécie *Perna perna*, coletados durante verão e inverno nos pontos de coleta acima citados.
- Comparar as quantidades de metais encontrados nos organismos com as quantidades permitidas nos mesmos pela ANVISA.

3. Metodologia

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas duas coletas, durante verão e inverno de 2017, onde foram coletados mexilhões da espécie *Perna perna* em três pontos específicos na Ilha de Santa Catarina: Canasvieiras, Santinho e Joaquina (Figura 6). Foram coletados dez indivíduos por local em cada estação do ano. Os pontos foram escolhidos por possuírem os indivíduos naturalmente no ambiente e também por apresentarem características diferentes entre si. Canasvieiras possui características de baia, com mar calmo e alta densidade turística nos meses de verão. Santinho e Joaquina já possuem alta dinâmica marinha e mar aberto, sendo a mais visitada turisticamente a praia da Joaquina. Tentou-se coletar indivíduos em outros locais, porém a espécie em questão foi encontrada em abundância e com maior facilidade de coleta apenas nos pontos citados.



Fonte: Secretaria de Estado do Planejamento

Figura 3. Pontos de coleta de mexilhão *Perna perna* na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.

As coletas foram manuais, com auxílio de espátula, nos costões rochosos dos pontos já citados. Tanto no verão como no inverno foram coletados 10 indivíduos por local, sendo que se tentou coletar animais com tamanhos parecidos, conforme mostrado na Figura 7. A biometria dos mexilhões foi realizada a partir da mensuração do comprimento (C) e altura (A) dos indivíduos bem como a biomassa a partir do peso bruto (PB) e peso úmido da carne (PUCa) (Figura 4), segundo descrições de CHRISTO *et.al* (2016).

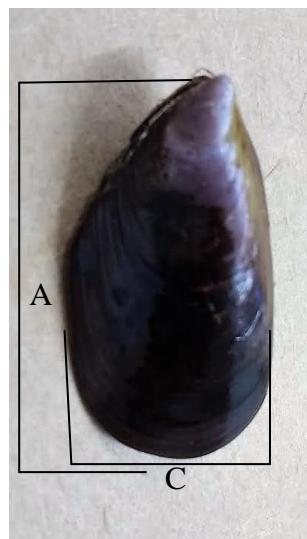


Figura 4. Mensuração da concha dos mexilhões *Perna perna* (n=10) nos três pontos de coleta, (Canasvieiras, Santinho e Joaquina) em Florianópolis, SC. A: altura; C: comprimento;.

Os costões rochosos sempre foram os mesmos de todas as coletas, tanto no verão, quanto no inverno para os diferentes locais amostrados.

Após a captura dos indivíduos, eles foram acondicionados em gelo dentro de isopor térmico, até serem dissecados em laboratório, nas primeiras horas após as coletas.

3.1 Dissecção das amostras

Durante a dissecção foram separados três tecidos: brânquias, músculo e glândula digestiva. Para tal, foram utilizadas pinças cirúrgicas, balança de precisão e tubos tipo “eppendorf”, devidamente etiquetados, para acondicionar cada tecido. Este processo foi feito em duplicata já que uma porção seria para determinação de metais. Os tecidos observados garantem a análise de exposições agudas, como no caso das brânquias e exposições crônicas como no músculo e glândula digestiva.

3.2 Homogeneização das Amostras

As homogeneizações foram realizadas com tampão para moluscos: Tris HCl 50 mM, EDTA 1mM, sacarose 0,5mM, KCl 0,15Mm com pH de 7,6. Adicionou-se aproximadamente 0,05 µg de amostra para 300 µL de tampão (10x1), todas as amostras em duplicata, e posteriormente agitou-se em homogeneizador até que os tecidos fossem dissolvidos (Figura 4). As amostras já homogeneizadas foram levadas até a centrífuga a 9.000 giros por 30 minutos, à 4º C. Em seguida retirou-se o sobrenadante e recolocou o homogeneizado em novos eppendorfs, em duplicata. Depois deste processo, todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer -80°C.

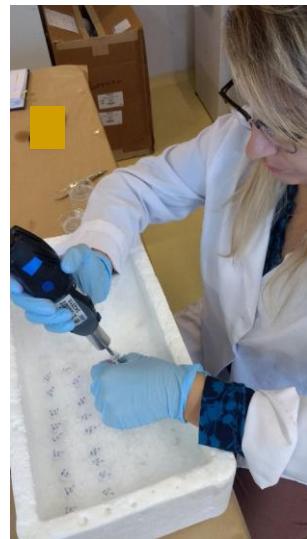


Figura 5. Homogeneização de tecidos de *Perna perna* coletados durante o inverno.

3.3 Ensaio Cinético

Para a análise da cinética enzimática as amostras foram devidamente separadas e depois as atividades enzimáticas da catalase, glutationa-s-transferase e acetilcolinesterase foram obtidas utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5 e o software SoftMax.

3.3.1 *Catalase*

Para o tampão da catalase foram utilizados TRIS 1mM, EDTA 5mM. O meio da reação foi preparado em um Becker contendo o tampão da catalase (acima citado), 95ml de água MilliQ, 12 µL de Triton e 108 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para o ensaio foram adicionados 10 µL de amostra e em seguida 250 µL de meio da reação, em microplacas de 96 poços. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 240nm por um minuto a 25°C.

3.3.2 Glutationa-S-transferase

O tampão utilizado foi o fosfato de potássio (KPO4) 0,1M pH 7,0 e adição de 10Mm de CDBN. O CDBN foi diluído em etanol, em proporções de 0,000304g/ 1,5 ml respectivamente. Para o meio da reação foram adicionados em Becker 5,2ml de tampão fosfato (KPO4) em 0,0036g de GSH. Para o ensaio, foi pipetado 10 μ L de amostra, 50 μ L de solução GSH/tampão. As leituras iniciaram depois de agitação inicial de 10 segundos, com comprimento de onda de 340nm, totalizando 10 ciclos de 30 segundos compreendendo o total de reação de 5 minutos.

3.3.3. Acetilcolinesterase

O princípio do método é a medição da taxa de produção de tio-colina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada (ELLMAN *et.al* 1960). Para as reações é necessário tampão fosfato de potássio 0,1M em pH 8,0 que se dá a partir de 5,44 gramas de fosfato monobásico de potássio anidro 0,05M e de 6,96 gramas de fosfato dibásico de potássio anidro 0,05M diluidos em 200 ml de água MiliQ. Para a preparação da solução de DTNB (5,5 Dithio-bis(2-Nitrobenzoic acid)) é necessário dissolver 0,00325g de DTNB em 20 ml de tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) anteriormente preparado. O tampão final é obtido a partir da dissolução de 0,0036g de acetitiocolina (substrato Iodeto de Acetitiocolina) em 5 ml de tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) com DTNB anteriormente preparado. A reação na microplaca é realizada com 10 μ L de amostra para 200 μ L de Tampão Final. A agitação inicial é de dez segundos, em comprimento de onda de 415 nm com 30 ciclos de 10 segundos.

3.3.4 Proteínas Totais

Para a quantificação de proteínas totais é usado o ensaio de Brandford (BRANDFORD, 1976), o qual consiste na determinação de proteínas solúveis. Os padrões de proteínas utilizados são o BSA (Bovine Serum Albumin) 40mg/g, os quais irão compor a linha de tendência para os valores de proteínas.

- Para o padrão 0,4 mg/ml adicionou-se 10 μ L de BSA em 990 μ L de água MilliQ, misturando em seguida.
- Para o padrão 0,3 mg/ml adicionou-se 75 μ L do padrão de 0,4mg/ml e 25 μ L de água MilliQ.
- Para o padrão 0,2 mg/ml adicionou-se 50 μ L do padrão de 0,4mg/ml e 50 μ L de água MilliQ.

- Para o padrão 0,1mg/ml adicionou-se 25 μL do padrão 0,4mg/ml e 75 μL de água MilliQ.

Para a diluição de Bradford 20% foi diluído o reagente de Bradford Bio-Rad Dye Concentrate em 400 ml de água MilliQ (diluição de cinco vezes). Depois foram diluídas as amostras em água MilliQ, na proporções de 10 vezes. Na microplaca foram aplicadas em duplicata, em diferentes poços, 10 μL de agua MilliQ e 10 μL dos quatro padrões de proteínas e 5 μL das diluições de 10 vezes das amostras. Após esse momento adicionou-se 200 μL do BradFord 20% em cada poço com a espera de 5 minutos até serem iniciadas as leituras.

Ao serem feitas as leituras das proteínas foram analisadas as equações de cada reta utilizada a partir dos quatro padrões relatados acima para a determinação das proteínas. Após encontrar o valor de Y (proteína) de cada amostra multiplicou-se esses valores pelo fator de diluição (1:10) e pelo volume das amostras (10).

Para a realização do cálculo da cinética enzimática foram necessárias as análises de proteínas totais de cada amostra.

3.3.5. Cálculo da Cinética Enzimática

O cálculo da cinética enzimática foi realizado a partir do coeficiente de extinção molar que são baseados na fórmula abaixo:

$$\text{Atividade} = \left(\frac{\text{Abs por } \frac{\min}{\epsilon} \times V \text{ total}}{[\text{prt}] \times V \text{ amostra}} \right)$$

Onde: Abs por min= Δ absorbância da amostra

ϵ = coeficiente de extinção molar

Vtotal= volume final da reação

Vamostras= volume de amostra

[prot] = concentração de proteínas da amostra

Diluição= diluição da amostra

3.3.6 Análise das concentrações de metais

Para a determinação das concentrações dos metais: cobre, chumbo, zinco e ferro dos diferentes tecidos (brânquias, glândulas digestivas e músculos), as amostras foram descongeladas, secas em estufas a 65°C, durante 24 horas, pesadas (peso seco), digeridas com

250 μ L de ácido nítrico 65% (Suprapur[®], Merck) e por fim diluídas com água tipo MilliQ, até completar o volume a 5 mL.

A determinação das concentrações de metais nas amostras biológicas foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica de chama (Grafphite Tube Atomizer, 200 series AA, Agilent Technologies). Para calibração do equipamento foram utilizadas soluções padrões dos diferentes metais, preparados a partir de solução multielementos. As soluções padrões foram acidificadas conforme descrito para as amostras. Os resultados foram expressos em μ g/L de peso seco.

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5 para cálculo das médias estatísticas das atividades enzimáticas e das concentrações de metais obtidas durante verão e inverno nos três pontos de coleta através da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni ($\alpha= 0,05$). Previamente, foram testadas a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias.

4. Resultados

4.1 Dados Biométricos

Para análise dos resultados primeiramente formam calculados os valores das médias e os respectivos desvios padrões dos dados biométricos dos diferentes pontos de coleta, que estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1.Caracterização dos dados biométricos , médias da biometria da concha (A–altura; C–comprimento; e biomassa (PB-peso bruto; PUCA-peso úmido da carne) dos mexilhões *Perna perna* (n=10) nos três pontos de coleta durante o verão. DP – Desvio padrão.

Ponto de Coleta	A (cm) (\pm DP)	C (cm) (\pm DP)	PB (g) (\pm DP)	PUCa (g) (\pm DP)
Joaquina	$4,90 \pm 0,8422$	$2,69 \pm 0,2131$	$8,70 \pm 2,1930$	$4,34 \pm 1,5260$
Santinho	$2,82 \pm 0,3293$	$1,78 \pm 0,4516$	$1,28 \pm 0,3636$	$0,92 \pm 0,3320$
Canasvieiras	$2,25 \pm 0,3340$	$1,40 \pm 0,2108$	$0,86 \pm 0,2070$	$0,45 \pm 0,0880$

Tabela 2.Caracterização dos dados biométricos , médias da biometria da concha (A–altura; C–comprimento; e biomassa (PB-peso bruto; PUCA-peso úmido da carne) dos mexilhões *Perna perna* (n=10) nos três pontos de coleta durante o inverno. DP – Desvio padrão.

Ponto de Coleta	A (cm) (\pm DP)	C (cm) (\pm DP)	PB (g) (\pm DP)	PUCa (g) (\pm DP)
Joaquina	$4,48 \pm 0,4289$	$2,35 \pm 0,2915$	$4,40 \pm 1,2750$	$3,10 \pm 0,9930$
Santinho	$4,24 \pm 0,3020$	$2,06 \pm 0,1770$	$2,97 \pm 0,4360$	$3,65 \pm 1,1290$
Canasvieiras	$2,66 \pm 0,422$	$1,52 \pm 0,2440$	$1,32 \pm 0,7750$	$0,90 \pm 0,3990$

Na Joaquina os mexilhões demonstraram os maiores tamanhos em ambas às coletas, tanto verão quanto inverno (Figura 6).

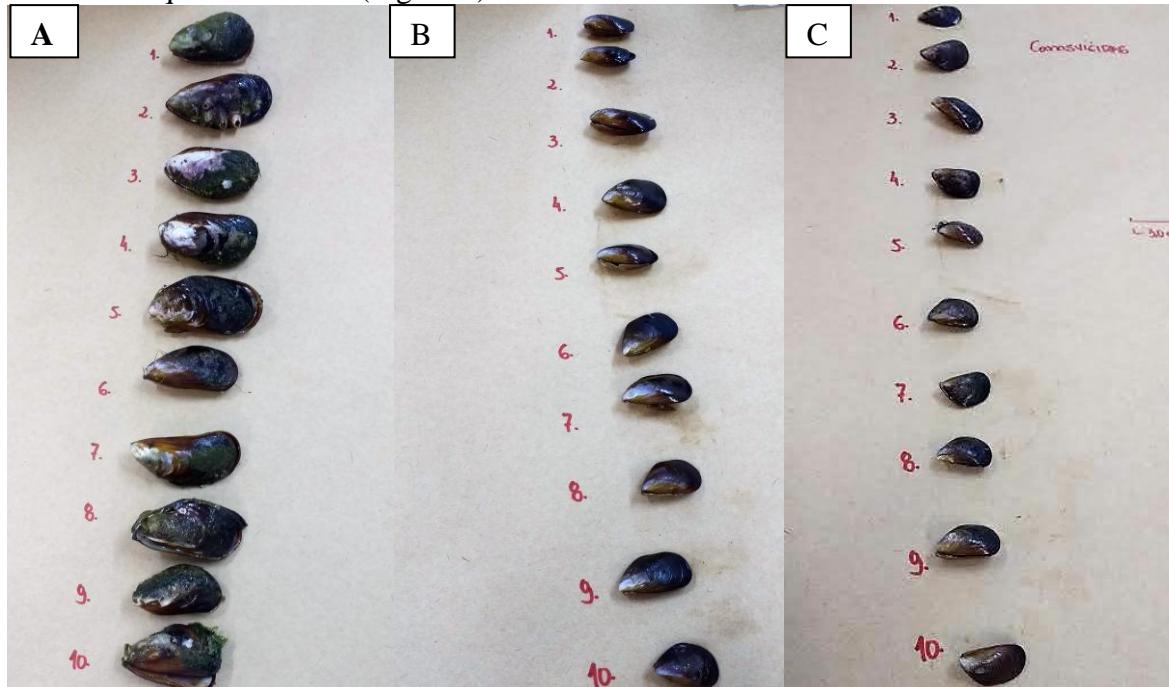


Figura 6. Coleta de Verão. A mexilhões *Perna perna* coletados na praia da Joaquina, B indivíduos coletados na praia do Santinho e C organismos coletados em Canasvieiras.

4.2 Dados de Balneabilidade

Os animais foram coletados durante o período da manhã até próximo às 12:00h. Os dias de coleta (20/03 e 24/07) foram respeitados por serem próximos aos escolhidos pela FATMA (Relatório de Balneabilidade) para análise da balneabilidade do litoral de Florianópolis. Desta forma os relatórios adicionam as observações das chuvas, temperatura da água do mar e atmosférica, *Escherichia Coli* por 100 ml e a condição de balneabilidade entre outros parâmetros os quais não foram utilizados neste trabalho. O único ponto de coleta a ser considerado impróprio foi em Canasvieiras durante o verão (Tabela 3).

Tabela 3. Demonstração dos Relatórios de Balneabilidade do litoral Catarinense da Fundação do Meio Ambiente- FATMA, Governo do Estado Santa Catarina. Relatórios completos nos ANEXOS.

Data	Ponto de Coleta	Chuvas nas últimas 24h	Temp°C		E. Coli NMP/100 ml	Condição
			Ar	Água		
21/03	Joaquina	Moderada	26	25	1266	Própria
20/03	Santinho	Moderada	24	24	10	Própria
20/03	Canasvieiras	Moderada	28	25	10	Imprópria
26/07	Joaquina	Ausente	20	18	10	Própria
24/07	Santinho	Ausente	20	18	10	Própria
24/07	Canasvieiras	Ausente	24	20	20	Própria

A partir destes relatórios emitidos e conforme a Resolução do CONAMA nº 274/2000 pode-se dizer se os ambientes são próprios ou impróprios relacionando vários parâmetros entre os quais a quantidade de *Escherichia coli* é essencial. Para serem próprios 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas nas cinco semanas anteriores, no mesmo local houver no máximo 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros. Ambientes impróprios quando em mais de 20% de um conjunto de amostras coletadas nas últimas cinco semanas, no mesmo local, for superior a 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros ou quando, na última coleta, o resultado for superior a 2000 *Escherichia coli* por 100 mililitros (FATMA, 2017).

4.3 Dados Bioquímicos

Foram analisadas as atividades enzimáticas dos biomarcadores: CAT (brânquias e glândula digestiva), GST (brânquias e glândula digestiva) e AChE (brânquias, glândula digestiva e músculo), nas estações do ano verão e inverno em cada ponto de coleta (Joaquina, Santinho e Canasvieiras).

A atividade da catalase na glândula digestiva dos mexilhões foi estatisticamente significativa maior no verão, em todos os pontos de coleta em relação ao inverno, sendo representado por uma variância de 31,70%. Os resultados seguem um padrão de atividade,

sendo no Santinho as maiores atividades, em relação à Joaquina e Canasvieiras, tanto no verão quanto no inverno. Fica evidente também que no inverno há uma menor atividade da enzima nos organismos coletados em todos os pontos amostrados.

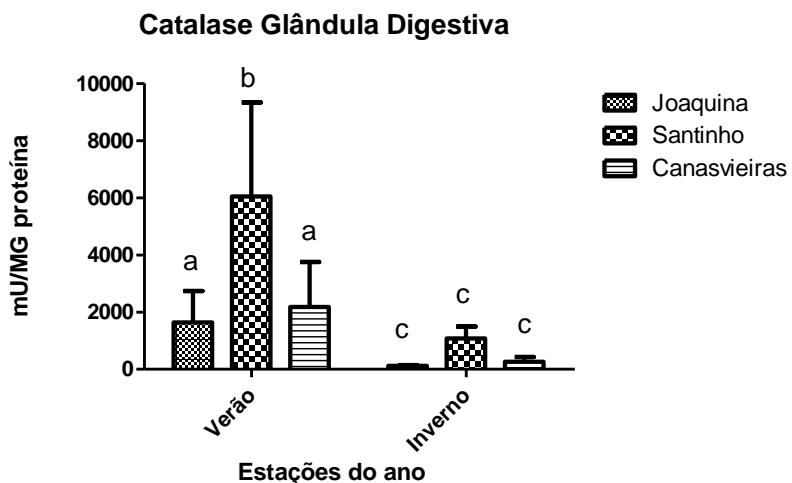


Figura 7. Gráfico da atividade da catalase nas glândulas digestivas de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises ANOVA ($p<0,05$).

Pôde-se observar que não houve variação estatisticamente significativa na atividade da enzima, nos diferentes pontos de coleta tanto para o verão quanto para o inverno, pois a interação entre as atividades da catalase representa cerca de 1,53% da variância total sendo uma interação estatisticamente não significativa. Entretanto, podemos observar que houve uma menor atividade significativa da catalase no inverno em relação ao verão em todos os pontos de coleta. Em relação às estações do ano, houve uma diminuição significativa da atividade da enzima nos organismos coletados em todos os pontos de coleta, durante o inverno.

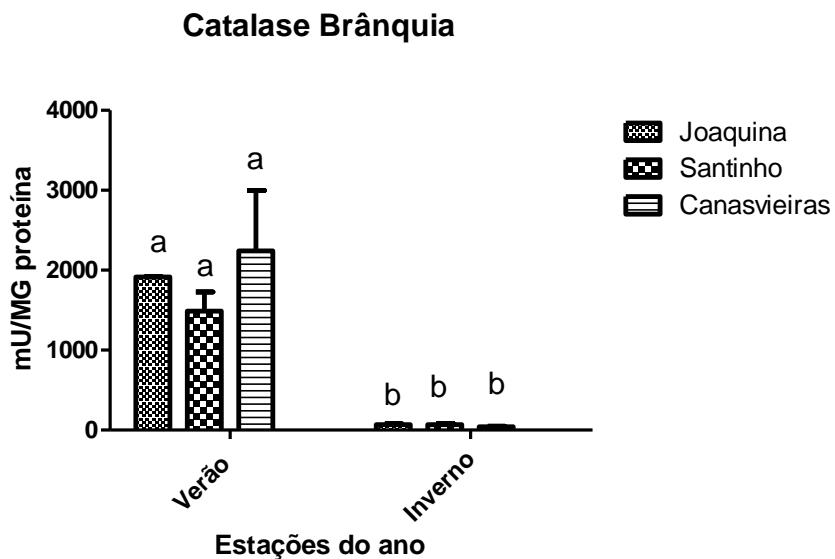


Figura 8. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da catalase nas brânquias de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$).

Observando os resultados da atividade da GST na glândula digestiva, nos diferentes pontos de coleta, durante o verão, observa-se que não houve alteração significativa. Entretanto, quando observamos os resultados do inverno nos mesmos pontos de coleta, houve uma maior expressão da atividade da GST na Joaquina, sendo estatisticamente significativa, e uma menor atividade enzimática no Santinho e Canasvieiras.

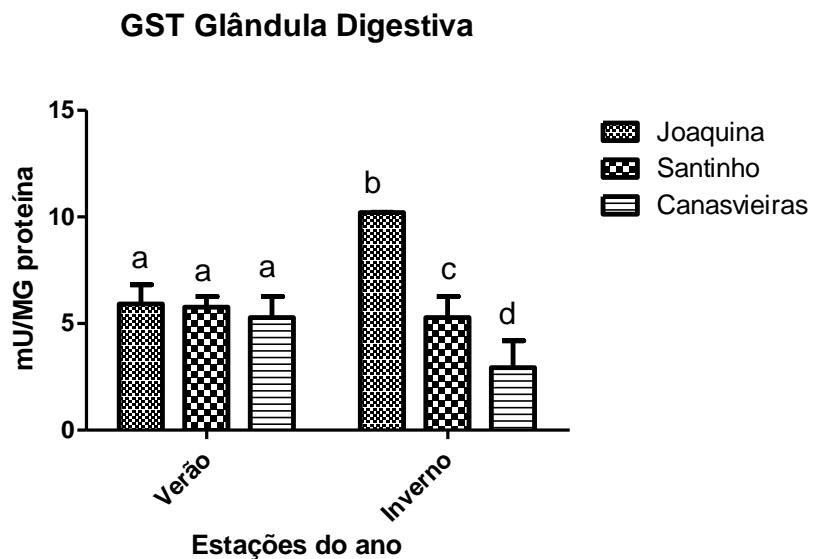


Figura 9. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da GST nas glândulas digestivas de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$).

Já a atividade da GST nas brânquias mostrou uma maior atividade da enzima na Joaquina durante o inverno. Para os organismos coletados no verão não houve variação significativa da atividade da enzima em todos os peontos de coleta.

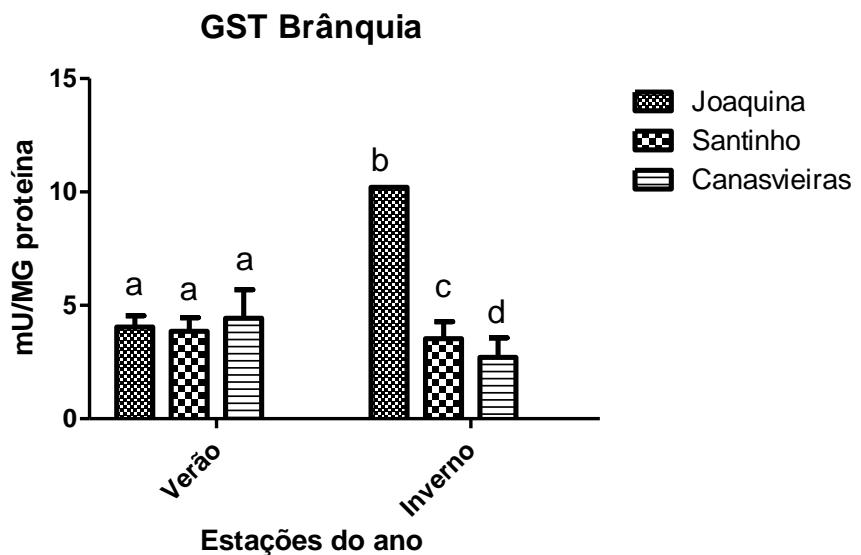


Figura 10. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da GST nas brânquias de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$).

Os resultados obtidos para a atividade da acetilcolinesterase na glândula digestiva mostram uma variação significativa da enzima no verão, sendo que no Santinho e na Joaquina há uma alta atividade da Acetil e em Canasvieiras uma redução significativa. Já para o inverno não houve diferença estatisticamente significativa da atividade da enzima entre os pontos de coleta. Porém, houve uma menor atividade da acetil no Santinho e Joaquina e uma maior atividade em Canasvieiras se compararmos as estações do ano.

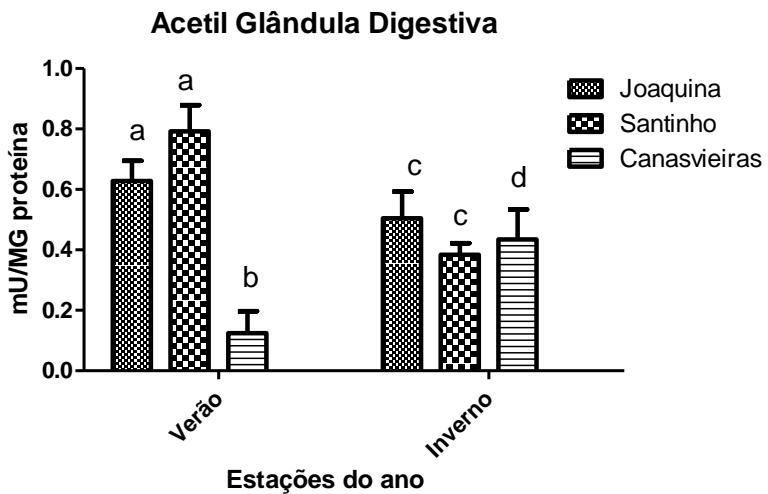


Figura 11. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase nas glândulas digestivas de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p < 0,05$).

A atividade da acetilcolinesterase nas brânquias se mostrou bastante variável, entre os pontos de coleta e entre as estações do ano. No verão houve uma menor atividade da enzima em Canasvieiras. Já no inverno embora se observe uma variação da atividade nas brânquias, esta não foi significativa. Se compararmos a atividade da enzima entre as estações, podemos notar que houve uma maior atividade nos organismos coletados em Canasvieiras e Joaquina no inverno.

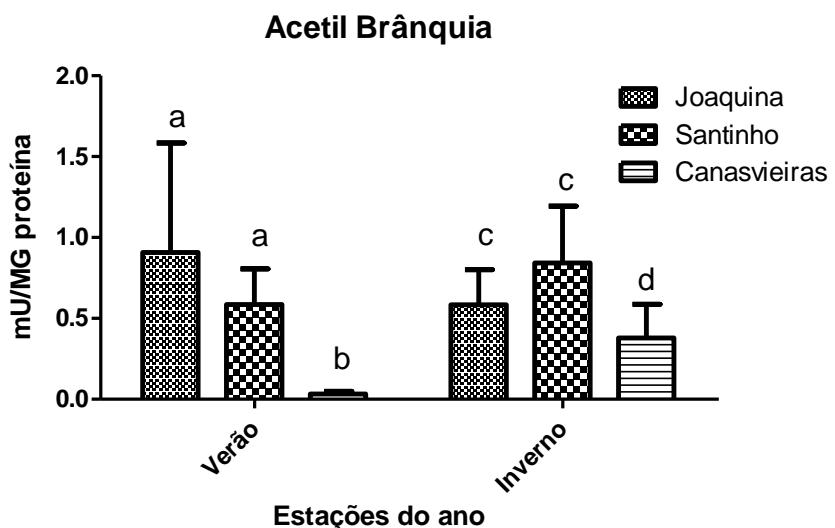


Figura 12. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase nas brânquias de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$).

Com relação a atividade da acetilcolinesterase no músculo dos mexilhões coletados no verão, podemos observar uma maior atividade na Joaquina e Santinho. Já em canasvieiras houve uma menor atividade. Para o inverno a atividade da enzima se mostrou semelhante em todos os pontos de coleta, não apresentando variação significativa. Entretanto, se compararmos a atividade da acetilcolinesterase em relação às estações do ano, notamos que houve uma redução na atividade enzimática na Joaquina e Santinho, e uma maior atividade em Canasvieiras no inverno em relação ao verão.

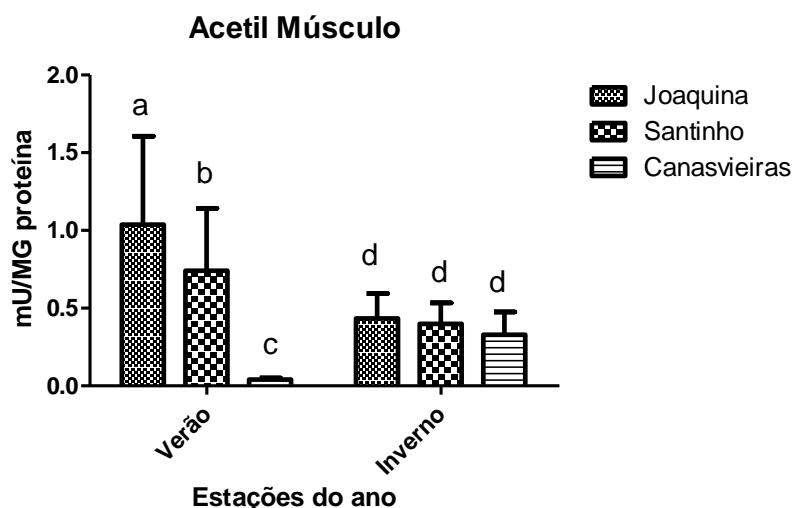


Figura 13. Gráfico demonstrando a análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase nos músculos de *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de Krushall Wallis ($p<0,05$).

4.4 Análise de Metais

Para a comparação com as quantidades de metais em mg/kg^{-1} encontradas nos mexilhões foram somadas todos os valores observados nas brânquias, glândulas digestivas e músculos de cada metal respeitando os pontos de coleta. Foram apresentadas as médias e desvios padrões dos metais já que a legislação brasileira apresentada pela ANVISA demonstra os valores em relação ao animal e não aos seus tecidos separados.

Durante o verão os valores para o ferro encontrados em maior quantidade foi no Santinho, porém seus valores não estão expressos na legislação brasileira. Para o cobre e zinco todos os valores estão bem abaixo do estabelecido como quantidade máxima permitida nas águas brasileiras. Em relação ao chumbo foram observados valores acima da legislação brasileira em Canasvieiras e Santinho, Joaquina tendo valores bem abaixo dos demais. Em Canasvieiras as médias para o chumbo foram 4,315, ou seja, o dobro do que estabelecido pela ANVISA, já no Santinho as médias foram 2,591, sendo 0,591 acima do permitido (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão das concentrações (mg/kg^{-1}) de micronutrientes e metais tóxicos dos três tecidos (brânquias, glândula digestiva e músculo) do mexilhão *Perna perna* ($n=10$) coletados em três pontos da cidade de Florianópolis: Joaquina, Santinho e Canasvieiras, durante o verão de 2017 e limites permitidos pela legislação brasileira em vigor (Brasil, 2013)

	Joaquina	Santinho	Canasvieiras	Legislação
Ferro	$2,510 \pm 5,649$	$3,521 \pm 6,110$	$1,732 \pm 1,794$	NC
Cobre	$0,070 \pm 0,027$	$0,083 \pm 0,084$	$0,607 \pm 1,274$	30
Zinco	$0,387 \pm 0,537$	$0,585 \pm 0,448$	$0,971 \pm 0,855$	50
Chumbo	$0,461 \pm 0,771$	$2,591 \pm 2,653$	$4,315 \pm 4,008$	2

NC = não constam valores máximos permitidos nesta legislação

Durante o inverno todos os valores de metais analisados foram abaixo do estabelecido pela legislação brasileira. Não foi detectada a presença de chumbo nas amostras coletadas (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão das concentrações (mg kg^{-1}) de micronutrientes e metais tóxicos dos três tecidos (brânquias, glândula digestiva e músculo) do mexilhão *Perna perna* ($n=10$) coletados em três pontos da cidade de Florianópolis: Joaquina, Santinho e Canasvieiras, durante o inverno verão de 2017 e limites permitidos pela legislação brasileira em vigor (Brasil, 2013)

	Joaquina	Santinho	Canasvieiras	Legislação
Ferro	$2,510 \pm 5,649$	$0,292 \pm 0,126$	$0,594 \pm 0,557$	NC
Cobre	$0,000 \pm 0,000$	$0,112 \pm 0,040$	$0,546 \pm 0,484$	30
Zinco	$0,053 \pm 0,053$	$0,204 \pm 0,091$	$0,697 \pm 0,344$	50
Chumbo	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	2

NC = não constam valores máximos permitidos nesta legislação

Para a análise das quantidades de metais em cada tecido foi realizado a análise estatística ANOVA de duas vias para que fossem observadas as quantidades de metais nos pontos de coleta durante as duas estações do ano (verão e inverno) em que os organismos foram coletados. Novamente foi utilizado o software GraphPad Prism 5 e os dados foram submetidos post teste de Bonferroni .Para cada metal foi adotado (v) quando analisados durante o verão e (i) as análises correspondentes ao inverno.

A Figura 13 mostra a bioacumulação de metais na glândula digestiva. O resultado que chama a atenção são as altas concentrações de ferro acumuladas em mexilhões coletados no

Santinho. Já as concentrações dos demais metais como zinco, cobre e chumbo não tiveram diferenças significativas nas estações do ano nos três pontos de coleta.

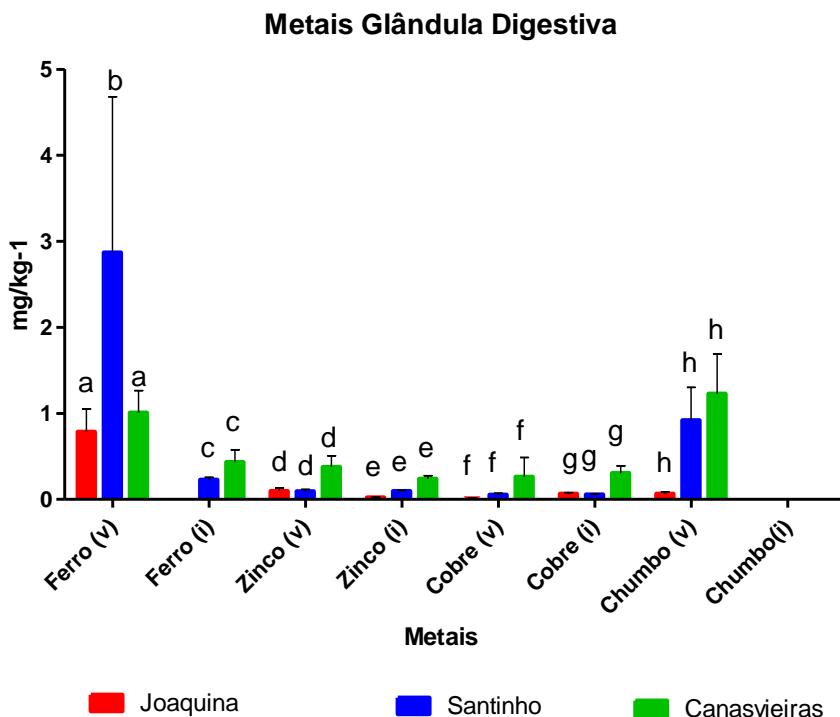


Figura 14. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg^{-1} nas glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho).

Assim como os resultados observados para a glândula digestiva, as brânquias dos organismos coletados em Canasvieiras também apresentaram altas concentrações de metais analisados em ambas as estações do ano. As diferenças significativas foram observadas nas concentrações de ferro em Canasvieiras durante o verão e as concentrações de chumbo nos três pontos de coleta também no verão.

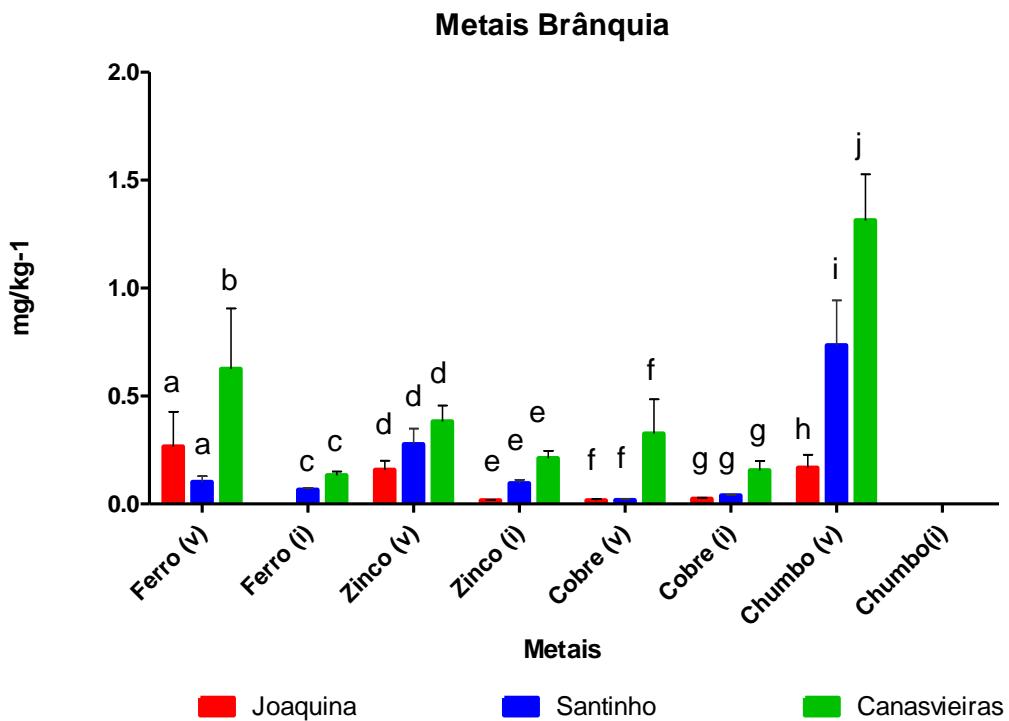


Figura 15. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg^{-1} nas brânquias de mexilhões *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho).

Houve uma maior acúmulo de ferro nos mexilhões coletados na Joaquina no verão e as concentrações de chumbo durante verão foi estatisticamente diferente nos três pontos de coleta, sendo em Canasvieiras os valores mais expressivos.

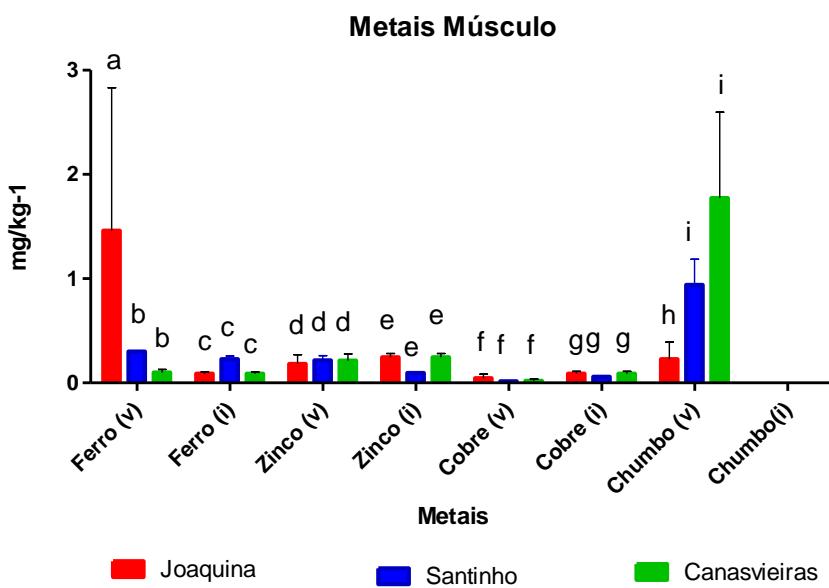


Figura 16. Gráfico demonstrando a análise da quantidade de metais em mg/kg^{-1} nos músculos de mexilhões *Perna perna* nas estações do ano verão e inverno. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Os dados foram resultados de análises de ANOVA ($p<0,05$). Cada metal foi comparado dentro de cada estação do ano nos três pontos de coleta (Canasvieiras, Joaquina e Santinho).

5. Discussão

Com as análises biométricas pode-se observar que os maiores comprimentos (cm), larguras (cm) e pesos totais (g) foram na Joaquina, seguido de Santinho e por último Canasvieiras. Essas diferenças podem ser explicadas pelo tipo de costão rochoso em que os indivíduos foram coletados. Na Joaquina sendo caracterizado como protegido diferentemente de Canasvieiras e do Santinho, onde os animais coletados estavam em costões rochosos expostos.

Almeida (2008) comenta que as diferenças entre os costões estão nos impactos das ondas, onde no exposto se dá frequentemente dando-lhe um padrão liso, menor variabilidade de espécies, maior mortalidade e menor tamanho dos indivíduos. Já em locais como a Joaquina com costões protegidos, possuem hidrodinamismo menor, riqueza de espécies associadas e organismos maiores (BREHAUT, 1982).

Esse mesmo padrão de tamanho de indivíduos ocorre durante o inverno demonstrado na Tabela 2 em que os maiores indivíduos encontram-se na Joaquina seguido de Santinho e por último novamente Canasvieiras.

Foram testadas as correlações entre o peso total dos animais e suas atividades enzimáticas e entre as atividades enzimáticas e a concentração de metais através do teste de Pearson ($\alpha = 0.05$) no software GraphPad Prism 5, ambas resultando em não significativas. Desta forma mesmo os animais terem tamanhos diferentes nos três pontos de coleta isso não tem relação direta com os valores de atividades enzimáticas e concentrações de metais nos bivalves coletados.

Foi analisada a atividade enzimática da catalase a qual faz parte da defesa antioxidante dos animais. Ela remove o peróxido de hidrogênio das células durante o metabolismo aeróbico basal ou após uma geração de oxigênios livres associadas ao aumento da contaminação ambiental que pode estar dentro do limite de tolerância do organismo. Além disso, a atividade da catalase é induzida por exposição dos organismos aos metais por alguns parâmetros ambientais e poluição química (BOUDJEMA *et.al*, 2014). Os resultados obtidos a partir da análise da catalase nos diferentes tecidos, brânquias e glândula digestiva, mostraram que a exposição ao ambiente, nos diferentes pontos de coleta, resultaram em algumas alterações na atividade da enzima, sendo por vezes um aumento e em outros uma diminuição da atividade desta enzima. Esse fato pode estar relacionado a vários fatores e uma delas é correspondente às condições ambientais do período coletado.

De acordo com o Relatório de Balneabilidade proposto pela FATMA às temperaturas ambientais e das águas estiveram mais altas durante o verão quando comparadas ao inverno. Barcarolli (2009) afirma que o aumento da temperatura das águas traz como consequências não apenas mudanças dos parâmetros físicos, mas também alterações de componentes biológicos, tendo efeito direto sobre a cinética das reações químicas, desta forma podendo haver maiores atividades enzimáticas durante os períodos mais quentes.

Além da temperatura, a quantidade de oxigênio é outro fator que deve ser levado em conta. Percebeu-se durante as coletas que no Santinho os animais estavam em hipóxia, ou seja, acima do nível do mar onde recebem água e alimentos durante as ondulações marinhas. Nogueira (2013) afirma que o ambiente marinho sujeita seus habitantes a uma ampla variação nas concentrações de oxigênio, assim como flutuações na disponibilidade de oxigênio ao longo do tempo. Assim, animais podem ir do estado de anoxia, privação das taxas de oxigênio, para hipóxia, reduzidas taxas de oxigênio. Durante a hipóxia, apesar da baixa concentração de oxigênio molecular, a produção de EROs pode aumentar nas mitocôndrias, servindo como moléculas sinalizadoras que podem ativar fatores de resposta à hipóxia e consequentemente aumentando as atividades enzimáticas da catalase (CHANDEL et al., 2000).

Neste mesmo sentido Almeida e colaboradores (2003) apud Storey e Churchill (2005) afirmam que mexilhões de costa estão sujeitos a periódicas oscilações ambientais como: batimento de ondas e as oscilações de maré, o que pode ocasionar variações nos níveis de oxigênio dissolvido, alimento, pH e temperatura da água. Outros fatores igualmente importantes são descritos por Jones (1986) demonstrando que os períodos de exposição dos mexilhões ao ar e posteriores re-submersões na água do mar podem ser responsáveis por um grande aumento na produção de EROS, devido ao re-fluxo de oxigênio nos tecidos e a consequente oxidação de produtos ácidos do metabolismo fermentativo acumulados durante o período de exposição ao ar. Tal comportamento pode ser visto durante verão e inverno no Santinho e durante o inverno em Canasvieiras, tanto nas brânquias quanto na glândula digestiva já na Joaquina, como dito anteriormente, os animais ficam submersos na maior parte do tempo.

Ao se falar em catalase e outras enzimas atuantes no estresse oxidativo, deve-se levar em consideração as concentrações de metais no ambiente, pois esses podem desencadear a produção de radicais livres. Sabe-se que um radical livre ou uma espécie reativa de oxigênio é qualquer átomo, molécula ou íons que possuem um desemparelhamento de elétrons na sua última camada de valência sendo totalmente instável e altamente reativo e tóxico. Isso ocorre

naturalmente em organismos animais ou quando os organismos são expostos a componentes que causem o estresse oxidativo, como relatado anteriormente. O elétron desemparelhado pode se associar com átomos isolados, hidrogênio ou íons metálicos, ou com moléculas de açúcares, proteínas, lipídeos e até mesmo de DNA, resultando em um processo de relevância biológica (SLATER, 1984).

Galvão e colaboradores (2009) comentam que a variabilidade da concentração dos metais podem alterar tanto as atividades das enzimas que atuam no estresse oxidativo como a CAT e a GST quanto às enzimas do sistema nervoso como a AChE, caracterizando-as como eficazes biomarcadoras de contaminação ambiental e utilizadas em monitoramento de ecossistemas marinhos. As alterações de metais podem explicar as alterações verificadas na atividade das enzimas catalase, relacionada com a proteção contra radicais. Já na AChE os metais podem modificar a manutenção da atividade do sistema nervoso.

Percebendo a importância dos metais durante o estresse oxidativo foram analisadas as concentrações de ferro, zinco, cobre e chumbo, nas duas estações observadas, nos organismos coletados.

Em relação às concentrações dos metais nas glândulas digestivas dos mexilhões pode-se observar que o ponto de coleta com maior relevância em relação às concentrações mais altas foi no ponto Santinho durante o verão onde se verificou quantidades superiores de ferro quando comparados aos demais. Esse fato corrobora com as altas taxas de atividade da catalase nas glândulas digestivas durante o mesmo período no Santinho, pois em momentos onde há produção excessiva de EROs, existem biomoléculas como a catalase que tentam conter essas reações e assim devolver ao organismo sua forma mais saudável.

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (BARBOSA *et.al* 2010). Durante o verão a quantidade de turistas em Florianópolis aumenta e com isso a descarga, esgotamento doméstico, descarte de materiais de forma irregular que contem ferro podem aumentar grandemente, concentrando os metais nos ambientes e auxiliando para que as reações de Fenton e Habber Weiss ocorram (LOPES, 2001).

A alta concentração de ferro no Santinho pode ter favorecido as reações de óxido-redução, em que os íons ferro e também do cobre são muito ativos, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. O cobre por sua vez não demonstrou valores expressivos quando comparado aos demais metais. Quando analisadas as concentrações de cobre com o proposto pela legislação brasileira pode ser observado valores

menores que 0,6 mg kg⁻¹ sendo que o máximo permitido em bivalves é 30 mg kg⁻¹. Portanto o ferro participa de forma eficaz nas reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de OH⁻, por meio da reação do H₂O₂ com os íons em questão, já na segunda, estes íons catalisam a reação entre H₂O₂ e o radical superóxido O₂⁻, a fim de gerar, da mesma forma OH⁻ (KOURY *et.al*, 2003). Ambas as reações podem formar peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio que também é o substrato da enzima catalase resultando em sua grande expressão no Santinho.

Os metais zinco e cobre obtiveram valores semelhantes nas glândulas digestivas em todos os pontos de coleta. Silva (2010) submeteu mexilhões *Perna perna* a diferentes concentrações de cobre e analisou as respostas ao estresse oxidativo das enzimas catalase e GST e não percebeu diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle. No presente estudo as quantidades de zinco e cobre foram extremamente baixas, quando comparadas a ANVISA, fato este que pode não ter influenciado nas atividades grupo de enzimas analisados. O chumbo, por sua vez, teve os maiores valores durante o verão no Santinho e em Canasvieiras sendo que durante o inverno seus valores não foram determinados ou por não existirem concentrações ou por elas serem tão baixas ao ponto do aparelho de absorção atômica não ter conseguido realizar as leituras. Gabe (2014) ao analisar a atividade da enzima catalase em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Perna perna* expostos a concentrações de chumbo concluiu que houve diminuição de atividade enzimática provocadas pelo metal. Pode ter acontecido o mesmo no presente trabalho já que as maiores concentrações de chumbo que foram encontradas em Canasvieiras durante o verão, sendo que o aumento da atividade enzimática da catalase foram menores que o Santinho nas glândulas digestivas.

Ao se observar a atividade enzimática da catalase em brânquias observou-se homogeneidade entre os pontos de coleta tanto no verão quanto no inverno, tendo seus valores aumentados no verão e um pequeno aumento em Canasvieiras quando relacionado aos demais. Esse fato pode estar relacionado com a concentração de ferro nas brânquias de mexilhões coletados em Canasvieiras durante o verão e ter novamente as reações de Fenton e Haber Weiss como princípio ocasionando o aumento da catalase nas brânquias. Outro metal com altas concentrações foi o chumbo o qual se caracteriza por ser um poluente acumulável e mesmo em concentrações relativamente baixas está associado a alterações no desempenho das enzimas, transferência de energia e outros processos bioquímicos (RAND *et. al*, 1995). Apesar de vários autores afirmarem que o chumbo tem efeito inibitório na ação da catalase, Vilela (2007) observou que os efeitos do chumbo nas atividades enzimáticas da catalase em

peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, elevou a atividade da enzima após algumas horas de exposição. Desta forma o chumbo pode ter contribuído para o aumento da atividade da catalase em brânquias dos indivíduos coletados em Canasvieiras.

A diferença entre as atividades enzimáticas e concentração dos metais verificadas nas glândulas digestivas e brânquias são explicadas por Alves e colaboradores (2001) que descreveram que as diferenças entre as atividades enzimáticas da catalase em brânquias, manto e glândula digestiva em *Perna perna* como significativas, havendo alterações contrastantes entre elas, a glândula apresentando os maiores valores, bem como no presente estudo.

Ao se estudar locais com possíveis contaminações ambientais outra enzima importante em estudos com biomarcadores é a enzima glutationa-S-transferase (GST) a qual desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos encontrados nos xenobióticos em ambientes contaminados. Desta forma, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a compostos os quais sofrem detoxificação mediada pela glutationa na sua forma reduzida, catalisada pela enzima GST (ALMEIDA, 2008). O ponto de coleta com os maiores valores para a enzima foi em Canasvieiras.

Ao se observar o Relatório de Balneabilidade de Florianópolis durante o verão no dia da coleta a água de Canasvieiras estava imprópria, tendo em mais de 20% de amostras coletadas nas últimas cinco semanas superiores a 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros demonstrando contaminação e possível causa de estresse oxidativo. Wong e Lau (2003) observaram o mesmo padrão de aumento de GST quando observaram a enzima em *Perna viridis* provenientes de locais extremamente contaminados por poluição associados a grande ocupação urbana e ao aumento de fluxo de embarcações quando relacionados a lugares pouco povoados. Bainy e colaboradores (2000) também observaram aumento da atividade da enzima na glândula digestiva de mexilhões *Perna perna* em sítios de poluição industrial em Santa Catarina.

Nos mexilhões analisados as concentrações de chumbo em brânquias e glândulas digestivas durante o verão foram mais altas em Canasvieiras do que nos outros pontos de coleta. O chumbo pode ser relacionado por danos teciduais em ratos expostos a este metal devido ao estresse oxidativo que eles causam (CONTERATO, 2007). Já que os pontos de coleta possuem fluxo de embarcações provavelmente o chumbo seja proveniente das pinturas navais as quais tem adição do metal com a finalidade de inibir a incrustação nos cascos, agentes biocidas contra as bactérias gram-positivas, proteção da madeira contra o ataque das

brocas e fungos marinhos (ZANELLA, 2016). Os maiores fluxos de embarcações quando se refere aos três pontos de coleta é Canasvieiras seguido de Santinho e por último Joaquina.

Como já comentado, em Canasvieiras e Santinho as concentrações de chumbo apresentaram valores acima do permitido, em Canasvieiras estando o dobro do proposto pela legislação durante o verão. Gonçalves Jr (2013) verificou concentrações de cromo, cádmio e chumbo em mexilhões dourados superior aos propostos pela Anvisa e comentou que tais valores podem ser prejudiciais à cadeia alimentar, pois níveis elevados destes metais pesados causam a contaminação do meio hídrico e, consequentemente, a intoxicação das espécies neste habitat, podendo, indiretamente, atingir o ser humano por meio da translocação dos metais entre os diferentes níveis tróficos.

Assim como as enzimas catalase e glutationa-S-transferase a acetilcolinesterase atua como importante biomarcador de contaminação ambiental. A AChE atua como biomarcadora para análise da neurotoxicidade. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor sintetizado nos terminais axonais a partir de colina e acetilcoenzima A, que permite a transmissão de impulsos nervosos através das fendas sinápticas. AChE é uma enzima fundamental do sistema nervoso cuja função é promover a hidrólise da ACh em acetato e colina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares (BAINY *et.al*, 2005). Diversos compostos como inseticidas do tipo carbamatos e compostos organosforados e metais pesados em especial o chumbo tem sido a causa da inibição ou ativação de AChE em moluscos bivalves (ALMEIDA, 2003).

As análises estatísticas da atividade da AChE em glândulas digestivas demonstraram maior expressão enzimática no Santinho e na Joaquina durante o verão. Já no inverno os valores foram próximos, menores que no verão, tendo maiores valores na Joaquina.

De acordo com as análises de metais nas glândulas digestivas pode-se observar que as maiores concentrações se encontram no Santinho para o ferro e em Canasvieiras para o chumbo. Já na Joaquina, em geral, não houve grandes concentrações de metais quando comparados aos demais pontos de coleta, tendo seus valores bem reduzidos e nenhum acima do permitido pela legislação brasileira. Desta forma pode se relacionar os resultados com a ideia de Saint-Denis e colaboradores (2001), os quais relatam que os metais podem diminuir a eficiência da ligação entre AChE ao substrato, causando em um primeiro momento maior produção da enzima pelo organismo, de forma a hidrolisar mais eficientemente a acetilcolina. Porém quando estes animais ficam expostos cronicamente a metais esta estratégia pode não ser eficiente e causar declínio da enzima.

A mesma relação ocorreu quando analisadas as brânquias, em Canasvieiras os resultados sendo bem inferiores ao Santinho e Joaquina e no inverno existindo poucas diferenças entre os pontos de coleta. Como já mencionado anteriormente não foram detectadas as concentrações de chumbo durante o inverno em nenhum tecido de *Perna perna*.

Muitos pesquisadores descrevem que elementos como o chumbo se ligam ao sítio catalítico da enzima AChE, evitando inativação fisiológica da acetilcolina levando a um prolongamento anômalo da neurotransmissão, que ao longo prazo pode deteriorar o equiparato da enzima inativando sua expressão (GAITONDE *et al.* 2006).

Muitos contaminantes ambientais incluindo os inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem afetar a atividade da AChE (SILVA, 2016). O mecanismo de toxicidade traduz-se na inibição da enzima, resultando na acumulação de acetilcolina nas fendas sinápticas e a alterações da funcionalidade do Sistema Nervoso Central, levando a alterações de comportamento e mesmo à morte do organismo.

Como a AChE é uma enzima atuante diretamente nos estímulos nervosos a sua expressão no músculo é de grande importância neste tecido e novamente pode-se observar maiores médias estatísticas para Joaquina seguida de Santinho e quantidades muito pequenas em Canasvieiras durante o verão. No inverno as médias das atividades enzimáticas foram menores que dos demonstrados nos demais tecidos.

Para a comparação com as concentrações de metais encontrados nos tecidos com o proposto pela legislação brasileira (ANVISA) somaram-se os valores dos três tecidos de cada ponto de coleta nas respectivas estações do ano e foi possível perceber que apenas o chumbo está acima do recomendado tanto no ponto do Santinho como em Canasvieiras, com concentrações maiores que o dobro do estabelecido, durante o verão. Os demais metais estão bem abaixo da legislação brasileira. O chumbo durante o inverno não teve seus valores identificados ou detectados ou não haviam quantidades acumulados nos mexilhões nesta estação.

Dessa forma, diante dos resultados apresentados, podemos notar a importância de se realizar um monitoramento ambiental, e ao discutir os dados obtidos, temos que levar em conta todos os parâmetros físicos e químicos aos que os organismos estão expostos. Além disso, devemos procurar respostas também nos compostos e substâncias potencialmente tóxicos que podem estar presentes no meio em que estes organismos vivem, como é o caso dos mexilhões. As interações entre estes fatores, sua sinergia, potenciação, inibição, são processos fundamentais e importantes que devemos tentar compreender, pois no meio

ambiente não temos apenas os efeitos de uma substância, mas sim de uma mistura complexa, que pode levar aos danos em organismos vivos.

6. Conclusão

No presente trabalho foram verificados que os biomarcadores tiveram respostas diferentes nos três pontos de coleta, Joaquina, Santinho e Canasvieiras, mostrando que cada ambiente reflete condições diferentes aos organismos;

Aliar os testes bioquímicos com as análises de metais demonstrou uma boa alternativa para biomonitoramento de ecossistemas marinhos já que se pode relacionar as concentrações de metais as variações das atividades enzimáticas em mexilhões *Perna perna*.

Outra necessidade se dá perante a análise de metais por tecido analisado e suas possíveis causas, pois neste estudo foi verificado que os metais são acumulados diferentemente pelos tecidos e tais mecanismos não estão amplamente entendidos e estudados.

O metal que demonstrou concentração acima do proposto pela Anvisa foi o chumbo o qual apresentou o dobro da quantidade permitida durante o verão na praia de Canasvieiras, a qual é extremamente visitada principalmente nos meses de verão por turistas de vários lugares do mundo podendo ser tóxicos a eles e outros seres vivos.

REFERENCIAS

ALMEIDA, W.P; HUBER.C.P. Glutatona e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. **Quimica Nova**, Rio de Janeiro, vol. 31, nº 5, 1170-1179, 2008.

ALBUQUERQUE, C. **Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação na Baía de Guanabara.** Dissertação de mestrado apresentada a Fundação Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 2007.

ALMEIDA, E.A. **Avaliação de Variações Bioquímicas em Moluscos Bivalves em Resposta ao Estresse Ambiental.** Tese de doutorado apresentado a Universidade de São Paulo, Instituto de Química, USP, São Paulo. 2003.

ALMEIDA, V.F. A Importância dos Costões Rochosos nos Ecossistemas Costeiros. **Cadernos da Ecologia Aquática**, [S.I.], vol 3, 2, p. 19-32, agosto. 2008.

ALMEIDA, E.A; GOMES, O.F; BAINY, A.C.D; MEDEIROS,M.H.G ; DI MASCIO, P. Lesões oxidativas no DNA de glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* como indicadoras de estresse ambiental. **Biotemas**, [S.I.], v 17, n 1. UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 2004.

ALVES,P.H; CRAPEZ, M.A.C; MORAES, R.B.C; BAINY.A.C.D; PEREIRA, A.C. **Análise da Atividade da Catalase em Diferentes Órgãos do Mexilhão *Perna perna*:** Efeito de Poluente em Organismos Marinhos, São Paulo, Arte e Ciência. 2001.

AGUIAR, M.R.M.P; NOVAES,A.C. Remoção de Metais de Efluentes Industriais por Aluminossilicatos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, nº 6B. Scielo, 2002.

ANDRADE, G.J.P.O. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Extensão UFSC: Revista Eletrônica de Extensão**, Florianópolis, v. 13, n. 24, p.204-217, 2016.

ARAÚJO, C.R.M; SANTOS, V.L dos A; GONSALVES, A.A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, [S.I.], v.8, n.6. 2016.

BAINY, A.C.D; DE MEDEIROS, M.H.G; DI MASCIO. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Biotemas**, [S.I.], v 19, nº 1. 2006.

BAINY ACD; ALMEIDA EA, MÜLLER IC, VENTURA ED; MEDEIROS ID. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, [S.I.], 2000

BARBIERI, E. **O Perigo das Biotoxinas Marinhas.** Instituto da Pesca. São Paulo. 2009.

BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O; MINIM, V.P.R; BRESSAN.J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Campinas. 629-643, jul./ago. 2010.

BARCAROLLI, I.F. **Influência de Parâmetros Físico-Químicos na Acumulação e Mecanismo de Toxicidade do Cobre no Isópodo *Excirolana armata*.** Tese de Doutorado apresentado a Pós graduação em Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

BARNES.R.D. **Zoologia dos Invertebrados.** 4º Edição. Rocca, São Paulo, p. 419. 1990.

BARRETO.N.S.E; SOUZA,V.O;VIEIRA,R.H.S.F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [S.I.], 2008.

BERCHEZ,F;GHILARDI-LOPES,N.P;HADEL,V.F. **Guia para Educação Ambiental em Costões Rochosos.** Editora Artmed, Porto Alegre. 2012.

BOUDJEMA, K; KOURDALI, S; BOUNAKOUS,N; MEKNACHI,A; BADIS,A. Catalase Activity in Brown Mussels (*Perna perna*) under Acute Cadmium, Lead, and Copper Exposure and Depuration Tests. **Journal of Marine Biology**, Blida, v 3. 2014.

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre procedimentos relativos à Tratamento de Efluentes. **Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.**

BREHAUT, R.N. **Ecology of rocky shores. The Institute of Biology Studies London.** Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, nº139, p 58. 1982.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Dispõe sobre Qualidade das águas. **Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.**

Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (**CASAN**). Índice de Atendimento Urbano de Esgoto.

Site:<http://www.casan.com.br/noticia/index/url/casan-esclarece-sobre-saneamento-de-florianopolis-2#0>

Acesso em: 21/10/2016 às 15:46h.

CAVALCANTI, A.D. Monitoramento da contaminação por elementos traço em ostras comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 2003.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, [S.I.], v 247, n. 2-3, p. 295-311. 2000.

COGO, J.D.A; SIQUEIRA, A.F; RAMOS, C.A; CRUZ, Z.A; SILVA, A.G. Utilização de Enzimas do Extresse Oxidativo como Biomarcadoras de Impactos Ambientais. **Natureza on Line**, [S.I.], 2009.

CONTERATO, G.M.M. Efeitos do Chumbo sobre a Atividade da Tioredoxina Redutase Citosólica e Parâmetros de Estresse Oxidativo em Rins de Ratos. **Manancial Repositório Digital da Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria. 2007.

COSTA, C.R; OLIVI, P; BOTTA, C.M.R; ESPÍNDOLA, E.L.G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v 31, n° 7. 2008.

CHRISTO, S.G. **Análise de Parâmetros do Balanço REDOX em Populações do Mexilhão Perna perna no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Conclusão de Curso. Porto Alegre. 2014

CHRISTO, S.G; FERREIRA-JR, A.L; ABSHER, T.M. Aspectos Reprodutivos de Mexilhões (bivalvia, mollusca) no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. Boletim Instituto da Pesca, São Paulo, v 42, n°4: 924-936, 2016

CHRISTO, S.G; IVACHUK, C.S; VERONESE, F.C; FERREIRA, J.R; ABSCHER, T.M. Descrição Alimentar e Estágio de Maturação de *Crassostrea brasiliiana* Comercializadas no Mercado Municipal de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic and Technologic- BJAST**, Itajaí, 2015.

CORDEIRO, A.L. **A OSTREICULTURA: Uma das Alternativas Econômicas para o Município de Florianópolis**. Monografia. UFSC. Florianópolis. 1997.

COSTA da S.S.W; SANTOS dos, A.A. **Síntese Informativa da Maricultura 2014**. Governo do Estado de Santa Catarina - Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.

CURTIES, A.J. et al. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: resultados parciais de um estudo de caso realizado na ilha de Santa Catarina, Brasil. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.26, n°1, p.44-52, 2003.

ELLMAN,G.L; COURTNEY, K.D; ANDRES, V.J; FEATHERSTONE, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, Great Britain, v.7, p 88-95. 1960.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014. Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012.

FERNANDES, F.A. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v 12, número 001. Portugal. 2005.

FERNANDEZ,L.G; JESUS,T.B; QUEIROZ,A.F.DE S. Avaliação da Concentração de Cádmio, Cobre, Ferro, Manganês, Níquel e Zinco em Anomalocardia brasiliiana (Gmelin, 1791) Provenientes de Zonas de Manguezal da Região de São Francisco do Conde e Madre de Deus, Recôncavo Baiano, BA. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, Itajaí, v. 3, n. 1, 2008.

FERREIRA,A.G, MACHADO, A.L.S, ZALMONI,I.R. **Ecotoxicologia Perspectivas para o Século XXI- Metais em Moluscos Bivalves no Litoral Norte do Estado do Rio de Janeiro**. Editora Rima. p 167, São Carlos. 2000.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L,S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo. 1997.

FERREIRA, M.S; MÁRSICO. E.T; JUNIOR, C.A.C; JUNIOR. A.M.N; MANO, S.B; CLEMENTE, S.C.S. Contaminação por metais em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. **Ciência Rural, Santa Maria, Online**, Santa Maria. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Yearbooks of Fishery Statistics Summary tables**. 2007. Disponível em: www.fao.org/fishery/statistics . Acesso em: 03 Novembro de 2016.

FRANCO, L.G; TRIVELLA, D.B.B; TREVISAN, R; DISNSLAKEN, D.F; MARQUES, M.R.F; BAINY, AC.D; DAFRE, A.L. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico- Biological Interactions**, [S.I.], v 160, nº3. 2006.

GABE, H. B; ROLA, R. C; SANDRINI, Z.J. Efeitos do Chumbo na Atividade da Catalase em Mexilhões *Perna perna*. **Congresso de Iniciação Científica: 14º Mostra da Produção Universitária**. FURG, Rio Grande, 2014.

GALVÃO,P.M.A;REBELO,M.F;GUIMARÃES,J.R.D;TORRES,J.P.M e MALM,O. Bioacumulação de Metais em Moluscos Bivalves: Aspectos Evolutivos e Ecológicos a serem Considerados para a Biomonitorização de Ambientes Marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic and Technologic- BJAST**, Itajaí, 2009.

GAITONDE, D.; SARKAR, A.; KAIZARY, S.; SILVA, C.D.; DIAS, C.; RAO, D. P.; RAY, D.; NAGARAJAN, R.; DE SOUZA, S. N.; SARKER, S.; PATILL, D. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. **Ecotoxicology**, [S.I.], v. 15, n° 4, p. 353 -358, 2006.

GÉRET, F; JOUAN, A; TURPIN, V ; BEBIANNO, M.J; COSSON, R.P. Influence of Metal Exposure on Metallothionein Synthesis and Lipid Peroxidation in Two Bivalve Mollusks: the Oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). **Revista Elsevier, Nova Iorque**, 2001.

GONÇALVES JR.A.C. Bioaccumulation of Heavy Metals and Nutrients in the Golden Mussel of the Reservoir of the Itaipu Binational Htdroelectric. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, 359-363. 2013.

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. Fundação do Meio Ambiente – (FATMA). Balneabilidade do litoral Catarinense. Município de Florianópolis. Local Canasvieiras, Joaquina e Santinho. 2017

JESUS, T.B; CARVALHO, C.E.V. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para a Avaliação da Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n° 4, 2008.

JONES, D. P. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. **Annual Reviews in Physiology**, [S.I.], v 48: 33- 50.1986.

HENRIQUES, M.B. **Resistência do Mexilhão *Perna perna* (linnaeus, 1758) Proveniente de Bancos Naturais da Baixada Santista, a Variações de Temperatura, Salinidade, Tempo de Exposição ao ar e Determinação da Incidência de Parasitismo.** Tese (doutorado em Ciências Biologicas com ênfase em Zoologia) -Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro (in press), 2004.

KOURY JC, DONANGELO CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 4, n. 16, 2003.

KAMUNDE,C; CLAYTON,C; WOOD,C.M. Waterborne vs. Dietary Copper Uptake in Rainbow Trout and the Effects of Previous Waterborne Copper Exposure. **American Journal of Physiology**, [S.I.], v. 283, n° 1. 2002.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para determinación y notas sobre su distribución. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 37: 32752, 1965.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica: Replicação, Transcrição e Tradução da Informação Genética**. Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, v.4 , p. 10.1977.

LEHNINGER AL, NELSON DL & COX MM. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Savier. 1995.

LINDE-ARIAS, A.R, INÁCIO, A.F, NOVO, L.A, VIANA, T.A.P, ALBUQUERQUE, C. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. **Mundo e Vida**, [S.I.], 2005.

LOPES, A.R.B.C. **O Princípio do Poluidor- Pagador aplicado ao Sistema de Esgotamento Sanitário- Ilha de Santa Catarina- SC**. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Políticas Públicas da Universidade do Estado de Santa Catarina. Florianópolis. 2006.

LOPES, F.R.A.S. Análise Temporal da Resposta de Biomarcadores Bioquímicas e do Nível de Metais Traço na Ostra Nativa *Cassostrea rhizophorae* Cultivadas no Complexo Estuarino de Laguna, SC. **Repositório Institucional UFSC**, Florianópolis, 2001.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* - Mollusca Lamellibranchia) : **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**. Zoologia e Biologia Marinha, São Paulo, 26: 33-111, 1969.

LUSHCHAK.V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, [S.I.],v. 101, 2011.

MARENGONI, N.G; KLOSOWSKI,E.S; PIMENTA de OLIVEIRA, K; CHAMBO, S.A.P;GONÇALVES JUNIOR,A.C. Bioacumulação de Metais Pesados e Nutrientes no Mexilhão Dourado do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36. Scielo. 2013.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. O cultivo do mexilhão *Perna perna* no município de Penha, SC. **Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC**. Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. p. 227-244. 2006.

MORAES, D.S. de LIMA; JORDÃO, B.Q. Degradação dos Recursos Hídricos e seus Efeitos sobre a Saúde Humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, 2002.

MOREIRA F.R, MOREIRA J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panam Salud Publica**, [S.I.], 2004.

NOGUEIRA, L. Influência da hipóxia em respostas bioquímicas de mexilhões *Perna perna* expostos ao biodiesel B5. **Repositório Institucional UNESP**, São Paulo, 2013.

OUROFINO, F.V.G; PASSOS, E.B. **A História do Saneamento Básico na Ilha.** Secretaria Municipal Habitação e Saneamento Ambiental de Florianópolis. 2015.

PEREIRA, R.P; GOMES.A.S. **Biologia Marinha.** 2º edição. Editora Interciencia. Rio de Janeiro. 2009.

PEREIRA,A.M.L; SOUZA,A.R;LEGAT,J.F.A. **Avaliação de Duas Unidades de Cultivo de Ostras do Delta do Paranaíba, município de Araioses, Maranhão.** III Congresso Brasileiro de Oceanografia. Rio Grande do Sul. 2010.

RAND, G. M. **Effects, environmental fate, and risk assessment.** Washington: Taylor & Francis. Londres, 1125 p. 1995.

RAND, G. M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. **Introduction to aquatic toxicology.** In: Rand, G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. 2º ed. Ed. Taylor & Francis, Londres, 1995.

ROCHA, A. **Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina.** Dissertação Apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz para Obtenção do Grau de Mestre em Saúde Pública – Área de Concentração em Toxicologia. Repositório Institucional da Fiocruz, Rio de Janeiro. Site: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/5034>. Acesso em: 16/05/2017 as 15:28h.

ROONEY, J.P.K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, [S.I.], v 234, n.3, 2007.

SAINT-DENIS.M; NARBONE, J.F; ARNAUD.C; RIBERA.D. Biochemical Responses of the Earthworm Eisenia fetida andrei Exposed to Contaminated Artificial Soil: Effects of Lead Acetate. **Soil Biol. Biochemical**, [S.I.], v. 33, 2001.

SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO. Governo de Santa Catarina. Site: <http://www.spg.sc.gov.br/acoes/56-cartografia> Acesso em 05/07/2017 às 15:54h

SILVA, A.C.A. Biomarcadores de Contaminação Ambiental. **Repositório Institucional Universidade Fernando Pessoa**, Porto. 2016.

SILVA, G. **Projeto de Viabilidade para uma Fazenda Marinha de Cultivo de Ostras do Pacífico na Cidade de Florianópolis- SC.** UFSC. Florianópolis. 2007.

SOARES, M.C. **Ostreicultura no Ribeirão da Ilha – Florianópolis (SC), Dinâmicas e Conflitos.** Trabalho de Conclusão de Curso. UFSC. Florianópolis. 2012.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Journal of Biochemical**, [S.I.], v. 222, p.1-15, 1984.

SPERLING,M.V. **Introdução a Qualidade das águas e ao Tratamento de Esgotos.** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, v. 1, 3º ed. 1996.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, [S.I.], v 12, n. 10, 2005.

VALE, P. Biotoxinas marinhas. **Revista Portuguesa de Veterinária**, Lisboa. 2004

VAN DER OOST, R; BEYER, J;VERMEULEN,N.P.E. Fish bioaccumulation and Biomakers in Environmental Risk Assessment: A Review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S.I.], 2003.

VILÉLA. M.B.F.A. **Estresse Oxidativo em *Prochilodus lineatus* Expostos ao Chumbo.** Monografia apresentada em Ciencias Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2007.

VIRGA, R.H.P; GERALDO, L.P; SANTOS, F.H. Avaliação de contaminação por metais em amostras de siris azuis. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. 2007

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

VILÉLA. M.B.F.A. **Estresse Oxidativo em *Prochilodus lineatus* Expostos ao Chumbo.** Monografia apresentada em Ciencias Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2007

WANG, L.; SCHEFFLER, B. E.; WILLETT, K. L. CYP1C1 Messenger RNA Expression is Inducible by Benzo[a]pyrene in Fundulus Heteroclitus Embryos and Adults. **Toxicological Sciences**, [S.I.], v. 93, n° 2, p. 331-340. 2006.

ZAGATTO,P.A; BERTOLETTI,E. **Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações.** 2º ed. Rima. 2008.

ZANELLA, M.R.B. Avaliação das Propriedades Antincrustantes de Partículas de tio2 Dispersas em Tinta. **Repositório Institucional UFSC**. 2016.

ZANETTE, J. Identificação e Caracterização de Marcadores Moleculares para Estudos Ecotoxicológicos em Moluscos Bivalves e Peixes. **Repositório Institucional UFSC**. 2009.