

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: ÊNFASE EM BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA

RENATA PIMENTEL JARDIM

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS PARÂMETROS
BIOLÓGICOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna*
(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE
DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

IMBÉ
2015

RENATA PIMENTEL JARDIM

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS PARÂMETROS
BIOLÓGICOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna*
(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE
DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

Co-orientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

IMBÉ

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Jardim, Renata Pimentel

Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em diferentes populações do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil / Renata Pimentel Jardim. -- 2015. 58 f.

Orientador: Emerson André Casali.

Coorientadora: Valesca Veiga Cardoso.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Perna perna*. 2. Estresse oxidativo. 3. Biomarcadores. 4. Biomonitoramento. I. Casali, Emerson André, orient. II. Cardoso, Valesca Veiga, coorient.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RENATA PIMENTEL JARDIM

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS PARÂMETROS
BIOLÓGICOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna*
(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE
DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

Co-orientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Klamt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ignácio Maria Benites Moreno

Coordenador da atividade de TCC 2

IMBÉ

2015

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao universo que me permite existir e fazer parte do ciclo da vida;

Gratidão a Deus que para mim é a energia vital, a vida em si;

Gratidão á minha família, minha mãe Jacira e meu pai Luiz, porque sem o total apoio deles não seria possível a realização do curso;

Gratidão aos meus queridos orientadores e amigos Emerson Casali e Valesca Cardoso pela oportunidade, dedicação e apoio;

Gratidão ao pessoal do Laboratório de Estresse oxidativo da UFRGS, principalmente ao Rafael pelo apoio, paciência e dedicação, sem ele este trabalho não seria possível, e às meninas Palominha, Amandinha e Sabrina por toda ajuda, paciência e carinho;

Gratidão ao pessoal da biblioteca do Ceclimar, Stellinha e Angelo, por toda a ajuda apoio e carinho;

Gratidão ao meu irmão Fabio, e à minha amiga Pamela, por conceberem o meu afilhado Miguel durante a conclusão do curso, uma das maiores alegrias da minha vida;

Gratidão aos demais familiares, avós, tios, primos e a todos, pela paciência;

Gratidão aos amigos, em especial as minhas duas segundas mães Ana Luiza e Eliana e ao meu irmão emprestado Caco pela paciência e apoio;

Gratidão aos amigos, principalmente à Ádila, sempre comigo, me dando apoio em todas as etapas da minha vida;

Gratidão aos colegas de curso e professores, em especial aos colegas Maíra, Louize, Aninha, João, Lisandro, Tawini, Gabi H, Gabi G, pelo carinho, atenção e amor dedicados a mim durante o curso;

Gratidão aos amores que existiram durante o curso, que sem dúvida influenciaram de alguma forma na minha caminhada;

RESUMO

A falta de saneamento básico aliada ao despejo de esgoto e efluentes diretamente nos corpos de água, ocorrem frequentemente no Litoral Norte do Rio Grande do Sul e acabam agindo como principais estressores contínuos dos organismos que ali vivem, causando diversos desequilíbrios fisiológicos nos organismos. Deste modo a utilização de biomarcadores é extremamente importante para avaliar possíveis impactos dos contaminantes presentes nestes ecossistemas costeiros. Os marcadores de estresse oxidativo constituem importante ferramenta na avaliação dos níveis de contaminação em ambientes aquáticos, podendo ser utilizados, inclusive, em programas de monitoramento ambiental. Este estudo foi realizado com a espécie de mexilhões *Perna perna* no Litoral Norte do Rio Grande do Sul em três pontos de coleta: as plataformas de pesca de Atlântida (p1), de Tramandaí (p2) e de Cidreira (p3). Foram realizadas duas coletas, (inverno/2014 e verão/2015) a fim de comparar os parâmetros oxidativos entre os diferentes pontos de coleta, nos períodos de Verão e Inverno, entre indivíduos macho e fêmea de mexilhões e entre os diferentes tecidos estudados. Foram determinadas as atividades das enzimas SOD e CAT, bem como a quantidade de dano oxidativo a lipídeos (TBARS) e a proteínas (resíduos sulfidril e carbonil) nos tecidos de manto e brânquias dos mexilhões. Foi observado neste estudo que os espécimes de mexilhões machos analisados provavelmente sofreram maiores danos oxidativos do que os mexilhões fêmeas analisados, principalmente no período do Inverno. Os mexilhões machos apresentaram menores níveis de atividade da CAT, maiores níveis de lipoperoxidação e também maiores níveis de grupamentos carbonil e sulfidril, principalmente durante o Inverno. A atividade da SOD foi maior em mexilhões machos durante o Verão e menor no período de Inverno, em comparação as fêmeas. A avaliação de parâmetros do estresse oxidativo em bivalves brasileiros é promissora e a sua continuidade é extremamente importante para se obter dados confiáveis e representativos dos padrões de defesas antioxidantes em *Perna perna*, e também para sermos capazes de reconhecer as mudanças que poderão vir a ocorrer nestes padrões.

Palavras-chave: *Perna perna*. Estresse Oxidativo. Bioindicadores. Biomarcadores.

ABSTRACT

The lack of basic sanitation coupled with the dumping of sewage and wastewater directly into water bodies, often occur on the north coast of Rio Grande do Sul and end up acting as major ongoing stressors of organisms living there, causing several physiological imbalances in organisms. Thus the use of biomarkers is extremely important to evaluate potential impact of contaminants in these coastal ecosystems. The oxidative stress markers are an important tool in the assessment of contamination levels in aquatic environments and can be used even in environmental monitoring programs. This study was conducted with the kind of *Perna perna* mussels, on the north coast of Rio Grande do Sul, three collection points: the Atlântida fishing platforms (P1), Tramandaí (p2) and Cidreira (p3). Two samples were taken, (winter/ 2014 and summer/ 2015) in order to compare the oxidative parameters between the different collection points, for the summer and winter, between male and female individuals of mussels and between different tissues studied. We determined the activity of enzymes SOD and CAT, as well as the amount of oxidative damage to lipids (TBARS) and proteins (carbonyl and sulfhydryl residues) in the mantle and gill tissues of the mussels. It was observed in this study that specimens of male mussels probably analyzed suffered greater oxidative damage than the mussels females analyzed, especially in the winter period. The mussels males had lower levels of CAT activity, higher levels of lipid peroxidation and also higher levels of carbonyl and sulfhydryl groups, especially during the winter. The SOD activity was higher in males mussels during the summer, except for the winter period, when the SOD activity was higher in females. Evaluation of oxidative stress parameters in Brazilian bivalve is promising and its continuity is extremely important to obtain reliable and representative data of antioxidant defenses patterns in *P. perna*, and also to be able to recognize changes that may occur these standards.

Key Words: *Perna perna*. Oxidative stress. Biomonitoring. Biomarkers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	JUSTIFICATIVA.....	10
1.2	OBJETIVOS.....	9
1.2.1	Objetivo geral	10
1.2.2	Objetivos específicos	11
2	REFERENCIALTEÓRICO	12
2.1	BIOMONITORAMENTO.....	13
2.2	BIOMARCADORES.....	13
2.3	A ESPÉCIE DE ESTUDO, MEXILHÃO <i>Perna perna</i>	13
2.3.1	Anatomia e fisiologia do mexilhão <i>perna perna</i>	14
2.3.2	<i>Perna perna</i> como biomarcador	16
2.4	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	17
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
2.5.1	Mecanismos de defesa antioxidante	19
2.5.1.1	<i>Biomarcadores enzimáticos</i>	19
2.5.1.1.1	<i>Superóxido Dismutase (SOD)</i>	20
2.5.1.1.2	<i>Catalase (CAT)</i>	20
2.5.1.2	<i>Biomarcadores não-enzimáticos</i>	20
2.5.1.2.1	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	21
2.5.1.2.2	Danos oxidativos protéicos.....	21
3	ÁREA DE ESTUDO	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	25
4.2	QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	26
4.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	26
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	27
5	RESULTADOS	27
5.1	ANÁLISES DA COLETA DE INVERNO (2014).....	27
5.2	ANÁLISES DA COLETA DE VERÃO (2015).....	36
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas costeiros são considerados as áreas sob maior estresse ambiental a nível mundial, e estão submetidos a uma forte pressão antrópica por diversos fatores como: as mais diversificadas formas de uso do solo (GRUBER; BARBOSA; NICOLODI, 2003), o crescimento da urbanização e exploração turística, a falta de saneamento básico (STROHAECKER, 2007), a presença de numerosos cursos de água resultantes da drenagem pluvial, denominados sangradouros, na zona costeira, e também a grande exploração e cultivo de organismos de grande importância comercial (NOGUEIRA; PEREIRA; SILVA FILHO, 2013).

Dentre os fatores citados, a falta de saneamento básico aliada ao despejo de esgoto tanto doméstico quanto industrial (muitas vezes não tratado) diretamente nos corpos de água ocorrem no Litoral Norte do Rio Grande do Sul e acabam agindo como os principais estressores contínuos dos organismos que ali vivem, causando desequilíbrios fisiológicos que podem chegar a afetar uma população inteira, dependendo da sua distribuição (NOGUEIRA; PEREIRA; SILVA FILHO, 2013). O crescimento das atividades humanas junto às áreas costeiras acarreta no despejo de uma grande variedade de agentes químicos e físicos que acabam alterando a dinâmica desses ecossistemas (SOUZA, 2010). Por isso, além das análises químicas da água, a utilização de biomarcadores é extremamente importante para avaliar possíveis impactos dos contaminantes presentes nestes ecossistemas costeiros.

De acordo com Souza (2010), os biomarcadores de estresse oxidativo constituem importante ferramenta para avaliar níveis de contaminação em ambientes aquáticos. O estresse oxidativo ocorre por causa de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante de um organismo. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (EROs) se dá pela redução univalente do oxigênio, sendo a mitocôndria uma das principais fontes geradoras de EROs, através da cadeia transportadora de elétrons. Essa produção contínua de radicais livres, envolvidos nos processos metabólicos, acarretou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres. Esse sistema de defesa é usualmente dividido em enzimáticos (e.g. catalase) e não-enzimáticos (e.g. glutathione) (BARBOSA, *et al.* 2010).

Foi demonstrado em muitos estudos (LUSHCHAK, 2010; SOUZA, 2010; TREVISAN, 2008) que a geração de EROs pode ser causada por fatores como mudanças de temperatura, oxigênio, concentração de nutrientes presentes na água, competição, predação, estresses físicos além da presença de contaminantes nos ecossistemas aquáticos. Sendo assim pode-se avaliar a qualidade dos ambientes realizando análises de estresse/dano oxidativo em organismos bioindicadores como moluscos *Perna perna*. Este organismo é amplamente utilizado no biomonitoramento de ambientes aquáticos devido à sua ampla distribuição, ser abundante e por possuir atributos necessários aos bioindicadores, como ter hábito sésil e filtrador acumulando os poluentes presentes no ambiente estudado (MANDUZIO *et al.* 2005; NOGUEIRA; PEREIRA; SILVA FILHO, 2013).

1.1 JUSTIFICATIVA

O Rio Grande do Sul é um Estado com crescente atividade industrial e populacional, especialmente na região do litoral norte. Diversos estudos comprovam a toxicidade em organismos aquáticos por ação de subprodutos oriundos de efluentes industriais, domésticos, petroquímicos (hidrocarbonetos de petróleo) e da utilização de agrotóxicos tornando o uso de biomarcadores cada vez mais importante. Estes organismos reagem às alterações ambientais modificando suas funções vitais e com isso fornecem informações sobre a situação ambiental. As respostas destes, a determinados níveis de poluição, nos dá subsídio para uma eficácia na fiscalização dos despejos, além de ser de vital importância para diagnosticar, planejar e controlar a qualidade da bacia hidrográfica e do seu ecossistema. Este trabalho dá continuidade aos estudos dos parâmetros do balanço REDOX em populações de *Perna perna* do litoral norte do Rio Grande do Sul realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Emerson André Casali e que compuseram o TCC do bacharel em Ciências Biológicas Guilherme Soares Christo no período de setembro de 2013 a março de 2014.

1.2 OBJETIVOS

Abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos do estudo.

1.2.1 Objetivo geral

Realizar uma avaliação de parâmetros do balanço REDOX em indivíduos de diferentes populações do mexilhão *Perna perna* no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT) e dos danos oxidativos a lipídios (TBARS) e a proteínas (resíduos Carbonil e Sulfidril) em tecidos de mantos e brânquias de mexilhões *Perna perna* coletados nas plataformas de pesca de Cidreira, de Tramandaí e de Atlântida, no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil;
- b) Observar a influência da sazonalidade sobre os parâmetros citados acima;
- c) Verificar se existem diferenças nas defesas antioxidantes e marcadores de danos entre os diferentes tecidos (manto e brânquia) e entre indivíduos machos e fêmeas das populações de mexilhões estudadas;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido drasticamente alterados em função de diversos impactos ambientais advindos de atividades antrópicas, tais como lançamento de efluentes não tratados em cursos d'água; construção de barragens e represas; desmatamento; erosão da faixa de praia; uso e ocupação irregular do solo, dentre outras. Como consequência destas atividades está ocorrendo uma expressiva queda da qualidade da água e diminuição da biodiversidade aquática, em função da desestruturação do ambiente físico, químico e alteração da dinâmica natural das comunidades biológicas (GOULART; CALLISTO, 2003).

Usualmente, a avaliação da qualidade da água vem sendo realizada através da medição de parâmetros físico-químicos da água como pH, condutividade, turbidez, acidez, alcalinidade, cloreto e salinidade, juntamente com a avaliação de caracteres microbiológicos (e.g coliformes fecais). Apesar de permitir a identificação imediata nas propriedades alteradas e a identificação da variável alterada, esta avaliação da qualidade da água é de caráter pontual, apresentando descontinuidade temporal e espacial das amostragens, fornecendo somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (WHITFIELD, 2001).

Além disso, somente a avaliação físico-química da água é ineficiente para detectar alterações ecológicas nos ecossistemas, como alterações na biodiversidade de habitats, e as consequências das alterações nos parâmetros analisados sobre as comunidades biológicas. Portanto, analisando as comunidades biológicas podemos avaliar a qualidade do habitat aquático porque essas comunidades refletem a integridade ecológica total dos ecossistemas (GOULART; CALLISTO, 2003).

Os organismos das comunidades biológicas aquáticas apresentam diferentes adaptações evolutivas e limites de tolerância à determinadas condições ambientais (TERCEDOR, 1996), fazendo com que o biomonitoramento se torne uma importante ferramenta na avaliação da qualidade dos ecossistemas aquáticos e das respostas destas comunidades biológicas a modificações nas suas condições.

2.1 BIOMONITORAMENTO

Biomonitoramento pode ser definido como o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as modificações ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas (BUSS; BAPTISTA; NESSIMIAN, 2003). Métodos como o levantamento de riqueza e abundância de espécies, medidas de produtividade primária e secundária, ensaios bioquímicos e análises de metais pesados em tecidos celulares já são utilizados por diversos autores (ALMEIDA; BAINY, 2006; ALVES, *et al.* 2002; SHULKIN, PRESLEY; KAVUN, 2003) em estudos de monitoramento de ecossistemas aquáticos. Desta forma, devem ser incluídas no biomonitoramento ferramentas biológicas que tragam respostas sobre o estresse e os efeitos que os poluentes advindos de atividades antrópicas vem causando, possibilitando inclusive o estabelecimento de relações de causa-efeito. Estas ferramentas podem ser chamadas de biomarcadores (FREIRE, *et al.* 2008).

2.2. BIOMARCADORES

Os Biomarcadores podem ser definidos por alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM; GRAY, 2003). Biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar a exposição e o efeito gerados por diversos contaminantes presentes no ecossistema aquático, através de diferentes metodologias, constituindo uma importante ferramenta em estudos de impacto ambiental, visto que possibilitam a detecção precoce dos efeitos causados nos seres vivos expostos à ambientes poluídos. Portanto, o uso de biomarcadores é fundamental para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção a estes ambientes (FREIRE, *et al.* 2008). Os organismos mais comumente utilizados no biomonitoramento, como biomarcadores em ecossistemas aquáticos são os macroinvertebrados bentônicos, peixes e comunidade perifítica (GOULART; CALLISTO, 2003). Macroinvertebrados bentônicos têm sido frequentemente utilizados na avaliação de impactos ambientais por causa de seu hábito bentônico, sésil e por se alimentar por filtração, podendo assim acumular diversos poluentes presentes em seu hábitat em seus tecidos e trato

digestivo. Neste trabalho utilizamos o macroinvertebrado mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) como biomarcador, para realizar o biomonitoramento de diferentes pontos de estudo, ao longo do litoral norte do Rio Grande do Sul.

2.3. A ESPÉCIE DE ESTUDO: MEXILHÃO *Perna perna*

Mexilhão é o termo utilizado na língua portuguesa para denominar as diversas espécies de moluscos bivalves pertencentes à família Mytilidae na qual existem diversas espécies comestíveis e de importância comercial, sendo os gêneros mais comuns o *Perna*, *Mytilus* e *Mytela* (VALENTE, 2004). A espécie utilizada nesse estudo é a *Perna perna*, descrita por Linnaeus em 1758, pertencente a Classe Bivalvia, Ordem Mytiloidea e Família Mytilidae. Estudos aprofundados desta espécie de mexilhão são recentes, dada a importância econômica da espécie como recurso alimentar (SIDDALL, 1980).

No Brasil, acreditava-se que o mexilhão *P. perna* era nativo, devido há sua introdução ter se dado há muito tempo, porém, segundo estudos (FERNANDES, *et al*, 2008), o mexilhão *Perna perna* seria nativo da África, onde os registros fósseis são abundantes e teria se propagado para outras regiões através da bioincrustação de navios, que transportavam escravos do continente africano, ocupando atualmente uma grande área de distribuição geográfica, ocorrendo no Mar Mediterrâneo, na costa da África, da Namíbia até o Estreito de Gibraltar, no sul da Índia, no Sri Lanka, na costa atlântica da América do Sul, na América do Norte e também em algumas ilhas do caribe.

2.3.1 Anatomia e fisiologia do mexilhão *Perna perna*

O mexilhão *P. perna* possui uma fase larval livre-natante, que após se desenvolver, irá se aderir a substratos consolidados por meio de uma estrutura proteica filamentosa, denominada de bisso, originando o indivíduo juvenil que possui hábito bentônico. Os mexilhões, em sua fase bentônica, podem ser encontrados em profundidades de até 10 metros e habitam costões rochosos da região de entre-marés, porém podem vir a se aderir a outros substratos consolidados naturais ou artificiais como pilastras de plataformas de pesca, bóias, cascos de embarcações. Como habitam a região entre-marés, possuem alta capacidade de adaptação às

diversas condições ambientais, podendo permanecer grande parte do tempo expostos ao ar sem grandes danos, a não ser a ausência de alimentação e baixa do metabolismo durante a exposição (MARQUES, 1997).

O indivíduos de *P. perna* tem um tamanho médio de 5 a 8cm de comprimento por 3 a 4cm de largura e 2 a 3cm de espessura, sendo considerado o maior dos mitilídeos brasileiros, podendo atingir até 14cm de comprimento, segundo Klappenbach (1964). Os mexilhões são constituídos externamente por duas conchas calcáreas ou valvas, equivalves e inequilaterais, mitiliformes, com um ângulo suave no lado dorsal, borda posterior arredondada e lado ventral côncavo. As linhas concêntricas de crescimento centram-se no ápice da valva, já que o umbo é apical, quase não existindo lúnula, que é muito reduzida, e a espécie estudada não possui músculo adutor anterior, decorrente do ligamento bissal mais firme. *P. perna* vive em regiões desprotegidas com incidência de ondas, e não apresentam sífões verdadeiros, mas formações da dobra interna do manto, que é somente muscular, sendo a borda do manto lisa, sem fusões, totalmente livre ao longo da abertura pediosa (MARQUES, 1997).

O pé é um órgão cilíndrico que tem inserção anterior no corpo do animal, densamente musculoso e achatado na região ventral, podendo possuir de 1 a 3 cm de comprimento, onde apresenta uma série de dobras rasas, paralelas entre si e de disposição transversal. Nessa face localiza-se longitudinalmente o sulco do bisso, que termina numa pequena cavidade próxima ao ápice do pé. O sulco tem início na abertura da glândula bissogênica, que secreta o bisso, e está situada na porção proximal do pé, sendo ainda ladeado por um par de dobras (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997).

O bisso é o órgão de fixação dos mexilhões no substrato, e consiste em um conjunto de fibras proteicas de alta resistência que são secretadas por glândulas bissogênicas localizadas na base do pé, em estado líquido, solidificando-se ao entrar em contato com a água (JORGE *et al.*, 2002; MARQUES, 1997). Quanto aos ctenídios, *P. perna* não apresenta cílios de guarda nos sulcos marginais, enquanto os cílios látero-frontais grandes estão associados ao tamanho das partículas a serem selecionadas para a alimentação, bem como os cílios laterais que também são longos (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997).

O sistema muscular de *P. perna* é formado pelos seguintes grupos de músculos: músculo adutor posterior, responsável por fechar e abrir as valvas;

músculo retrator do pé; músculo retrator do bisso; músculo paleal, responsável por unir as bordas do manto às valvas e músculo anal, responsável por auxiliar no processo de eliminação das fezes. Esses músculos estão aderidos à superfície interna das valvas, deixando assim cicatrizes denominadas impressões paliais utilizadas como caráter taxonômico na diferenciação das espécies de mexilhões (MARQUES, 1997).

Mexilhões *P. perna* possuem hábito alimentar filtrador, ou seja, retiram seu alimento da água, utilizada no processo de respiração realizado pelas lâminas brânquiais, que além de absorver oxigênio, também atuam na seleção de partículas alimentares em suspensão, constituídas principalmente de algas microscópicas, bactérias e detritos orgânicos (SCHMITT, 2002; MARQUES, 1997).

Com relação à reprodução, nos mexilhões *P. perna* a unissexualidade é predominante, ocorrendo ocasionalmente o hermafroditismo, sendo que a sua reprodução ocorre praticamente durante o ano todo, tendo picos na primavera e no verão (COE, 1943). As glândulas sexuais dos mexilhões, denominadas de folículos, estão presentes em todo o manto e durante a maturação, vão sendo preenchidas pelos gametas (óvulos e espermatozóides) produzidos pelas gônadas, conferindo ao manto uma coloração típica creme nos machos e salmão nas fêmeas, que é o principal caráter de dimorfismo sexual da espécie (MARQUES, 1997).

2.3.2 *Perna perna* como biomarcador

Os organismos mais comumente utilizados no biomonitoramento, como biomarcadores em ecossistemas aquáticos são os macroinvertebrados bentônicos, peixes e comunidade perifítica (GOULART; CALLISTO, 2003).

O mexilhão *Perna perna* foi escolhido como monitor biológico neste trabalho, por ser um animal abundante nos pontos de coleta, por ser de fácil coleta e por possuir vasta distribuição geográfica. O *Perna perna* possui ainda hábito sedentário e filtrador, podendo acumular poluentes em seus tecidos, e seu ciclo de vida é relativamente curto, podendo refletir mais rapidamente as modificações do ambiente através de mudanças na estrutura das populações e comunidades (JORGE, *et al*, 2002).

Este estudo irá utilizar o mexilhão *P. perna* como um biomarcador de estresse oxidativo. Existem atualmente diversos estudos (ALMEIDA, *et al*. 2005; DAFRE, *et*

al. 2004; FILHO, *et al.* 2001; TREVISAN, 2008) utilizando esta mesma espécie em estudos de balanço REDOX, em diferentes locais do Brasil.

2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, sendo utilizado tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria em organismos eucariotos, quanto na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras outras vias metabólicas fundamentais (TREVISAN, 2008). Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar algumas substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, enquanto os 10% a 15% do oxigênio (O_2) restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta. Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, sendo a citocromo oxidase a enzima catalisadora dessa reação. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a mesma enzima oxida quatro moléculas de citocromo, removendo um elétron de cada uma delas que são adicionados ao O_2 para formar água.

Portanto, é a ação da enzima citocromo oxidase que controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (BARBOSA, *et al.* 2010). No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem às espécies reativas de oxigênio (EROs) superóxido ($O_2\bullet$), hidroxila ($OH\bullet$) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BRASILEIRO, 1997).

Esse processo se dá mediante reações específicas, enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, possui alto potencial reativo por participar da reação de geração de $OH\bullet$ possui ação

deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres tendo em vista que tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares, diferentemente dos radicais livres, podendo assim alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima (BARBOSA, *et al.* 2010; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Halliwell (1993), radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente, e que contenha em sua estrutura elétrons desemparelhados. Algumas dessas EROs geradas são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares que reagem rapidamente apenas com algumas substâncias, como é o caso do peróxido de hidrogênio.

2.5. ESTRESSE OXIDATIVO

O estado de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses radicais.

Tal estado conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencialmente danoso contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O aumento da produção de compostos oxidantes nos organismos aquáticos pode ser causado por diferentes fatores que comumente se originam do meio, agindo como estressores, como a variação na temperatura da água, mudanças nas taxas de oxigênio dissolvido, salinidade e nível do mar em função das variações das marés, bem como a disponibilidade de recursos como espaço e alimento. Porém este aumento também pode ser ocasionado por fontes endógenas, como diversas enzimas oxidativas (e.g. a xantina oxidase, a triptofanodioxigenase e a citocromo P450 redutase que geram $O_2^{\bullet-}$) que atuam como fontes internas constantes de compostos oxidantes (ALMEIDA, *et al.*, 2007; VIGO-PELFREY, 1990).

O crescimento da atividade humana e o desenvolvimento dos centros urbanos e industriais em regiões litorâneas aumentaram criticamente os níveis de poluentes liberados nestes ambientes (COGO, *et al.*, 2009; LIMA, *et al.*, 2007; SILVA, *et al.*, 2009). A exposição a compostos xenobióticos bioacumuláveis (e.g. metais pesados)

pode causar diversas alterações fisiológicas nos organismos (LIVINGSTONE, 1998), podendo gerar inclusive o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e uma conseqüente redução das defesas antioxidantes, gerando assim uma condição de estresse oxidativo (COGO, *et al.*, 2009; DAFRE, *et al.*; 2004; LUSHCHAK, 2011; VALAVANIDIS, *et al.*, 2006).

A presença e acúmulo de metais de transição (e.g. cobre e ferro), nos tecidos dos organismos pode aumentar a produção da espécie reativa de oxigênio de maior potencial oxidativo, a HO•. A hidroxila (HO•) é produzida quando os metais reagem com o peróxido de hidrogênio, através da Reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}\cdot$) (CHAMPE; HARVEY, 1996; HALLIWELL, 1992).

A constante produção de radicais livres durante os processos metabólicos ocasionou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que tem por objetivo limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. Estas defesas podem ser produzidas endógenamente ou adquiridas pela dieta, e as estratégias de defesa incluem três formas principais de atuação: evitar a formação de EROs, neutralizar espécies reativas e reparar danos ocasionados por elas. Assim, pode-se denominar como antioxidante qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.5.1 Mecanismos de defesa antioxidante

Os principais sistemas de defesas antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: defesas enzimáticas e não-enzimáticas (SOUZA, 2010). Estes sistemas de defesas têm potencial para diminuir as espécies reativas de oxigênio geradas, agindo contra o estresse oxidativo, e são constituídas tanto por parâmetros enzimáticos como não enzimáticos, sendo ambos os tipos comumente utilizados como biomarcadores em estudos de biomonitoramento (VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008).

2.5.1.1 Biomarcadores enzimáticos

As enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) são importantes biomarcadores enzimáticos, cuja atividade vem sendo utilizada em estudos de

impacto ambiental, porque pode indicar o nível de estresse oxidativo nos organismos.

2.5.1.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) tem a função de catalisar a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e está presente em quase todos os organismos eucariontes. A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres e está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. O composto produzido $O_2^{\bullet-}$ sozinho, não é altamente danoso, porém, pode extrair elétrons de diversos componentes celulares causando reações em cadeia de radicais livres, possuindo alto potencial de geração de estresse oxidativo.

O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, (por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica) possui alto potencial reativo, por participar da reação de geração de OH^{\bullet} , que constitui o mais reativo dos radicais livres (BARBOSA, *et al.* 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Por este motivo, o H_2O_2 deve ser retirado do meio o mais rápido possível (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

2.5.1.1.2 Catalase (CAT)

Amplamente difundida entre os seres aeróbios, a catalase (CAT) é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 , numa reação em que, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida a água. Está localizada, principalmente, no peroxissoma, podendo ser encontrada também nas mitocôndrias. A catálise do H_2O_2 é de extrema importância, pois, na presença de Fe^{+2} , leva à formação de radical hidroxil (HO^{\bullet}), que é um radical altamente reativo e danoso, através da reação de Fenton (AEBI, 1984; CHAMPE; HARVEY, 1996; HALLIWELL, 1992).

2.5.1.2 Biomarcadores não-enzimáticos

A Lipoperoxidação, e a quantificação de radicais Carbonil e Sulfidril são importantes biomarcadores não-enzimáticos, e a sua mensuração vem sendo bastante utilizada em estudos de impacto ambiental, porque também podem indicar o nível de estresse oxidativo nos organismos.

2.5.1.2.1 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A utilização das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reagem com extremidades aldeídicas dos lipoperóxidos, em meio ácido e altas temperaturas, formando compostos secundários (e.g. malondialdeído) que podem ser lidos em espectrofotômetro (532nm), constituem excelentes biomarcadores não enzimáticos indicadores dos níveis de lipoperoxidação (LPX) (SOUZA, 2010; ESTERBAUER, CHESSMAN, 1990) e já são amplamente utilizados como indicadores de estresse oxidativo (VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008). Em geral, essas reações são iniciadas através da interação dos lipídeos com o radical hidroxila. Mutações, adutos de DNA e mudanças nos padrões da expressão gênica podem ocorrer por consequência dos processos de lipoperoxidação (STEINBERG, 1997).

2.5.1.2.2 Danos oxidativos protéicos

A mensuração de dano em proteínas também pode ser utilizada como biomarcador não enzimático do estresse oxidativo. Danos à proteína podem ocorrer pelo ataque direto das espécies reativas de oxigênio à sua estrutura, que quando na forma primária pode variar muito ocasionando em diferentes tipos de processos oxidativos, ou através de moléculas originadas de processos de oxidação (e.g. malondialdeído). Ligações peptídicas também podem ser atacadas por espécies reativas de oxigênio como por exemplo, na abstração de hidrogênio pelo radical hidroxil, mas geralmente este radical exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico exercem efeitos nocivos a grupos facilmente oxidáveis, como os tióis (SH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os grupamentos tiólicos (SH) também chamados de sulfidril funcionam como mecanismos de defesa antioxidante não enzimático, e podem ser mensurados

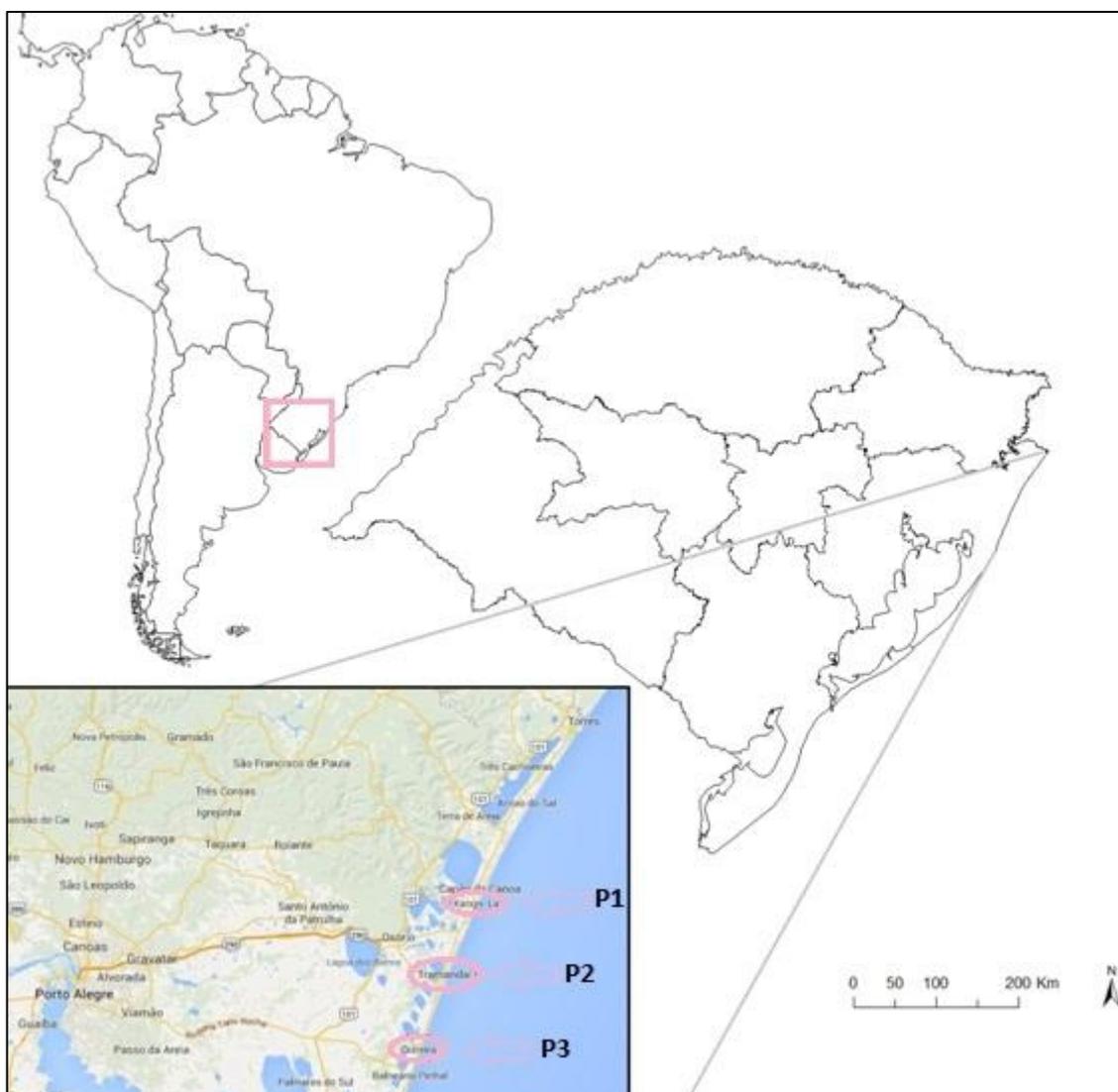
através do método de Ellman (1959), que consiste em utilizar o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) como marcador dos grupamentos tiólicos reduzidos, e após, ler esta marcação em espectrofotômetro a 412nm. Assim, a mensuração dos grupamentos tiólicos (SH) é frequentemente utilizada como biomarcador não enzimático de estresse oxidativo em estudos de biomonitoramento. As proteínas estão ainda potencialmente sujeitas a sofrer a reação de Fenton porque, podem se ligar a íons metálicos, e caso sejam posteriormente expostas a peróxido de hidrogênio, conseqüentemente irão formar o radical hidroxil como produto desta reação. O ataque de OH pode gerar outros radicais capazes de combinar com o O₂, gerando os radicais alcoxilas e peroxilas, os quais podem fazer a abstração de H e formar peróxidos nas cadeias laterais ou na cadeia central das proteínas. Os radicais alcoxil podem ainda realizar fragmentações de proteínas, formando grupos carbonilas, tornando os processos de geração de danos às biomoléculas cíclicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A carbonilação é um tipo de oxidação protéica, formadora de cetonas ou aldeídos reativos. Estes compostos originados podem reagir com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas, que são quantificadas espectrofotometricamente numa absorvância entre 360-385nm (LEVINE, *et al.*, 1990). Portanto, a mensuração da carbonilação é outro biomarcador não enzimático do estresse oxidativo que também é muito utilizado em estudos de monitoramento ambiental.

3 ÁREA DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado na Zona Costeira do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, em três pontos de amostragem: P1 localizado na Plataforma de Pesca de Atlântida (no município de Xangrilá); P2 na Plataforma de Pesca de Tramandaí e P3 na Plataforma de Pesca de Cidreira (conforme ilustrado na Figura 1).

Figura 1 - Mapa destacando o litoral norte do Rio Grande do Sul e os municípios de Atlântida, Tramandaí e Cidreira, onde se localizam os pontos de coleta.



Fonte: Autor (2015).

De acordo com a Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM) a Zona Costeira é o espaço geográfico de interação do ar, do mar e da terra, incluindo seus recursos ambientais, abrangendo as faixas marinha e terrestre brasileiras (GRUBER, *et al.*, 2003). O litoral Norte do Rio Grande do Sul usualmente é dividido em litoral Norte, Médio e Sul.

O presente trabalho foi desenvolvido no litoral Norte do Rio Grande do Sul, que possui extensão de aproximadamente 610 km e praias arenosas, contínuas, retilíneas que são predominantemente dominadas por ondas (CALLIARI, *et al.*, 2005). Esta faixa do litoral engloba 21 municípios, sendo limitada pelos municípios de Torres, a norte, e Palmares do Sul, a sul (DE MATOS; GRUBER, 2009).

O primeiro ponto de amostragem (P1) localiza-se na Plataforma de Pesca de Atlântida (no município de Xangrilá), que foi construída em 1970 e possui 300 metros de extensão, por m de largura. O município de Xangrilá possui 60,688 km² de área, mais de 12.434 habitantes (IBGE, 2010) e entre os municípios amostrados é o menos populoso.

O segundo ponto de amostragem (P2) localiza-se na Plataforma de Pesca de Tramandaí, que foi construída em 1973, possui 365 metros de extensão e 8 metros de largura. O município de Tramandaí possui 144,408 km² de área, mais de 41.585 habitantes (IBGE, 2010) e entre os municípios amostrados é o de maior população.

O terceiro ponto de amostragem (P3) localiza-se na Plataforma de Pesca de Cidreira, que foi construída em 1992, possui 500 metros de extensão e 8,5 metros de largura. O município de Cidreira possui 245,885 km² de área, mais de 12.668 habitantes (IBGE, 2010).

Ambos os municípios amostrados possuem sua população extremamente aumentada nos meses de veraneio, sofrendo graves consequências ecológicas com este aumento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção das amostras a serem analisadas, foram realizadas 2 coletas (setembro de 2014 – coleta1- inverno; março de 2015 – coleta 2 - verão) em três pontos de coleta, ao longo do Litoral Norte do Rio Grande do Sul: P1 na plataforma de pesca de Atlântida (no município de Xangrilá), P2 na plataforma de pesca de Tramandaí e P3 na plataforma de pesca de Cidreira. Em cada um dos três pontos, foram coletados 30 mexilhões, totalizando 180 mexilhões coletados, que mediam entre 6 e 8 centímetros de comprimento, para possibilitar a padronização e comparação entre as amostras. Os mexilhões foram retirados dos pilares das plataformas com auxílio de uma faca para romper o bisso, filamento protéico secretado pela glândula do pé, para fixação do mexilhão em substratos. Após a coleta, os indivíduos foram transportados em caixas de plástico (volume 30 litros), com água do mar, utilizando-se aeradores à pilha para controlar os níveis de oxigênio presente na água, até o Centro Universitário Metodista (IPA), onde foram processadas as amostras.

Em laboratório, os mexilhões foram abertos com o auxílio de uma tesoura para romper os músculos adutores e separar as valvas, após foram coletados os tecidos do manto e brânquia de cada um dos indivíduos, para realização das análises nos dois tecidos coletados, separadamente, e foram mantidos dentro de tubos plásticos identificados e colocados em gelo seco. Cada amostra foi composta por tecidos de 3 organismos diferentes, coletados no mesmo ponto de amostragem, a fim de aumentar o volume de tecido disponível para as análises em cada amostra, utilizando um N = 5 amostras para cada ponto de coleta. Após a coleta dos tecidos as amostras foram congeladas (-20°C) e transportadas até o Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Laboratório 32), Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde ficaram armazenadas (-80°C) para análises posteriores.

4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de tecido foram descongeladas e homogeneizadas em 1mL de solução tampão fosfato de potássio (pH 7,4) composta por KPBS 50 mM, 0,9% NaCl, na qual foi adicionado 1 mM EDTA e 0,01% PMSF diluído em DMSO que são

utilizados como inibidores de proteases e/ou quelantes de metais (VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008). A homogeneização foi realizada utilizando-se um aparelho homogeneizador LABGEN 125 durante 3 minutos em cada amostra. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas duas vezes, por 15 minutos (10.000g, 4°C), congeladas (-80°C) por uma hora, descongeladas e centrifugadas novamente por 15 minutos (10.000g, 4°C), e após este processo, o material sobrenadante foi retirado para a dosagem de proteínas e, posteriormente, para as análises bioquímicas.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas presentes nas amostras foi realizada através do método de Lowry (1951) em microplaca (750 nm) fazendo uso do kit Bio-Rad DC ProteinAssay (BIO-RAD LABORATORIES) para padronizar as quantidades de proteína, e adotando-se a albumina sérica bovina (BSA) para realizar essa padronização. Após a quantificação das proteínas, as amostras foram submetidas às análises de parâmetros do balanço REDOX.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada segundo Aebi (1984), esta enzima é responsável por converter o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, e a sua técnica de quantificação mede o decaimento do peróxido de hidrogênio através da absorvância em 240nm (UV) ao longo do tempo. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi quantificada segundo o método de Boveris (1984). Este método consiste em medir espectrofotometricamente (480nm) a inibição da auto-oxidação da adrenalina em adrenocrono, pela superóxido dismutase, presente na amostra biológica.

Os danos oxidativos a lipídeos foram avaliados, de acordo com o método de Esterbauer e Chessman (1990), através da determinação da quantidade de lipoperóxidos com extremidades aldeídicas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), formadas durante a peroxidação. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico, que reage com malondialdeído, um subproduto da lipoperoxidação, formando um composto final de coloração rósea que é lido em espectrofotômetro a 532nm.

Os danos oxidativos em proteínas foram avaliados determinando os níveis de grupamentos sulfidril (tióis) e carbonil. Os grupamentos tiólicos reduzidos foram analisados de acordo com a técnica de Ellman (1959). Esta técnica consiste em utilizar o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) como marcador dos grupamentos tiólicos reduzidos, e após, ler esta marcação em espectrofotômetro a 412nm. O conteúdo de grupamentos sulfidril não-protéicos poderá ser estimado nas mesmas amostras após reação da fração sobrenadante com 20% TCA. Já os grupamentos carbonil foram determinados de acordo com a técnica de Levine *et al.* (1990). A carbonilação é um tipo de oxidação protéica que forma cetonas ou aldeídos reativos, que podem reagir com 2,4 - dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas nas proteínas, que são quantificadas espectrofotometricamente a 360-385nm (LEVINE, *et al.*, 1990).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados bioquímicos entre os diferentes grupos foi realizada através de ANOVA de uma via com *post hoc* de “Duncan’s multiple range test”. Para comparações entre os resultados obtidos para machos e fêmeas nos mesmos pontos foi realizado teste T para análise paramétrica de amostras independentes utilizando o teste de Levene para calcular a significância. Em todos os casos os resultados foram considerados significativos para um $P < 0,05$, e serão expressos como média \pm erro padrão médio (EPM).

5 RESULTADOS

Na realização do presente trabalho, foram realizadas 2 coletas. A primeira coleta (Inverno) foi realizada no dia 18 de Setembro de 2014, e a segunda coleta (Verão) foi realizada no dia 16 de Março de 2015, sendo coletados 90 espécimes de mexilhão *P. perna* em cada amostragem realizada. Os resultados obtidos estão descritos nos tópicos abaixo:

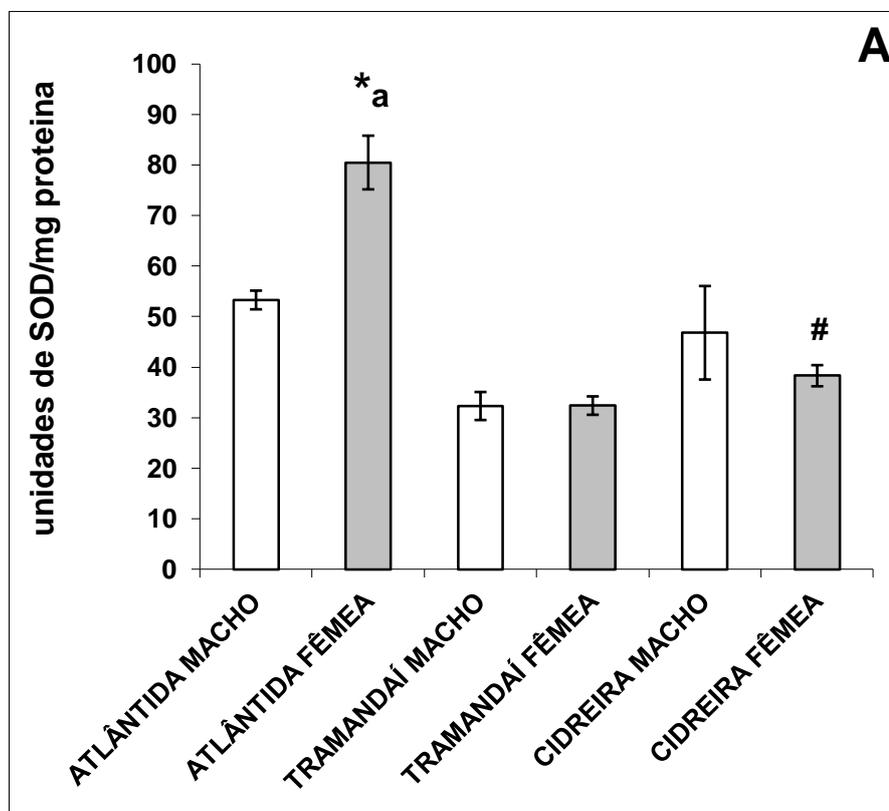
5.1 ANÁLISES DA COLETA DE INVERNO (2014)

Os resultados obtidos nas análises dos mexilhões coletados durante o Inverno de 2014 estão descritos abaixo:

A atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através do método de Boveris (1984), somente nos tecidos de manto dos mexilhões coletados nos três pontos amostrados durante o inverno de 2014, e os resultados obtidos estão ilustrados no Gráfico 1.

O ponto de maior atividade da enzima SOD foi Atlântida, para ambos os sexos de mexilhões, sendo que a atividade nos machos e fêmeas de Atlântida e Cidreira, após análises estatísticas, difere significativamente e entre os machos e fêmeas de Tramandaí não difere. A análise da atividade da enzima SOD não foi realizada para o tecido de brânqueas, dos mexilhões coletados durante o inverno de 2014.

Gráfico 1 – Comparação entre as atividades da SOD em tecidos de manto(A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A atividade da SOD foi mensurada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

* Indica diferença significativa ($p = 0,05$) entre os machos e as fêmeas coletados em Atlântida.

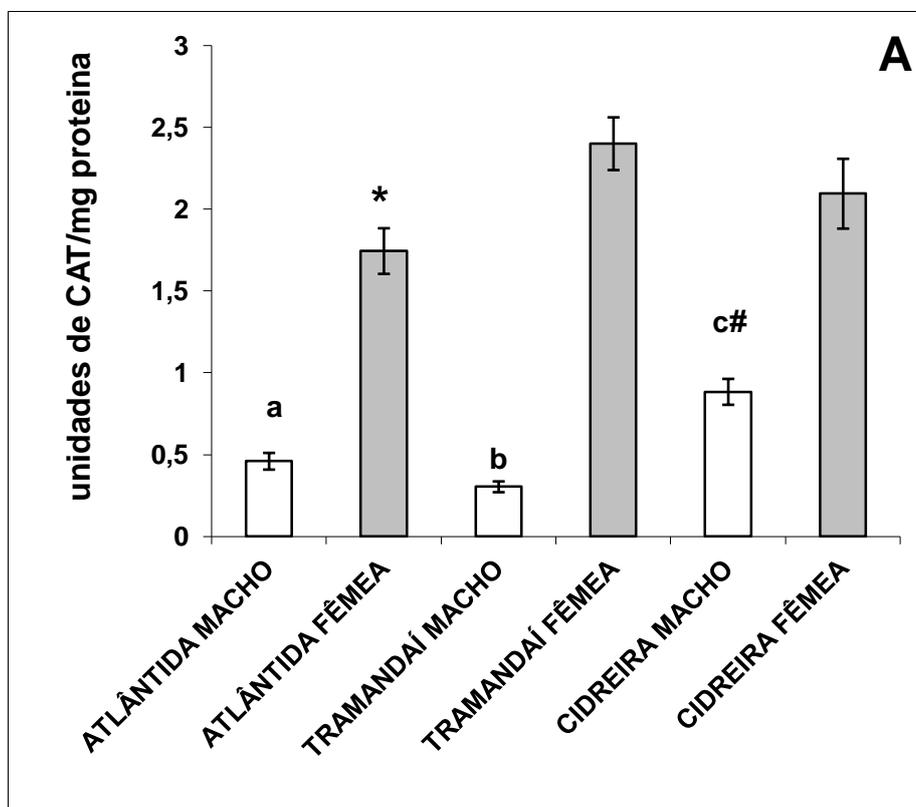
^a Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas de Atlântida e as fêmeas coletadas em Tramandaí e Cidreira.

Indica diferença significativa ($p = 0,006$) entre as fêmeas e machos coletados em Cidreira.

O ponto de maior atividade da enzima SOD foi Atlântida, para ambos os sexos de mexilhões, sendo que a atividade nos machos e fêmeas de Atlântida e Cidreira, após análises estatísticas, difere significativamente e entre os machos e fêmeas de Tramandaí não difere. A análise da atividade da enzima SOD não foi realizada para o tecido de brânqueas, dos mexilhões coletados durante o inverno de 2014.

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi determinada através do método de Aebi (1984), nos tecidos de manto (Gráfico 2) e brânqueas (Gráfico 3) dos mexilhões coletados nos três pontos amostrados durante o Inverno de 2014.

Gráfico 2 – Comparação entre as atividades da CAT em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A atividade da CAT foi mensurada conformedescrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

^a Indica diferença significativa ($p=0,017$) entre as fêmeas e os machos de coletados em Atlântida.

^b Indica diferença significativa ($p=0,040$) entre os machos e fêmeas coletados em Tramandaí.

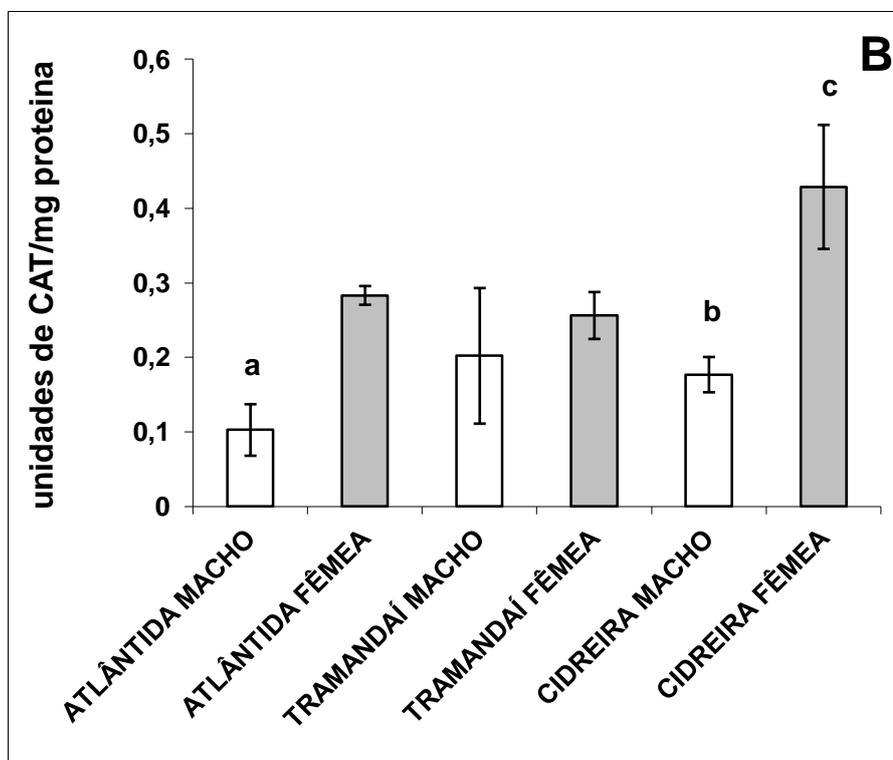
^c Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e fêmeas coletados em Cidreira.

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas coletadas em Atlântida e as fêmeas coletadas em Tramandaí.

Indica diferença significativa ($p < 0,005$) entre os machos coletados em Cidreira e os machos coletados em Atlântida e Tramandaí.

Foi observado um padrão na atividade da enzima catalase em tecidos de manto (Gráfico 2) de mexilhões *P. perna* durante o inverno de 2014, onde existiu maior atividade da enzima CAT em mexilhões fêmeas do que em mexilhões machos, atividade esta significativa nos três pontos amostrados, conforme análises estatísticas realizadas.

Gráfico 3 – Comparação entre as atividades da CAT em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

^a Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e fêmeas coletados em Atlântida.

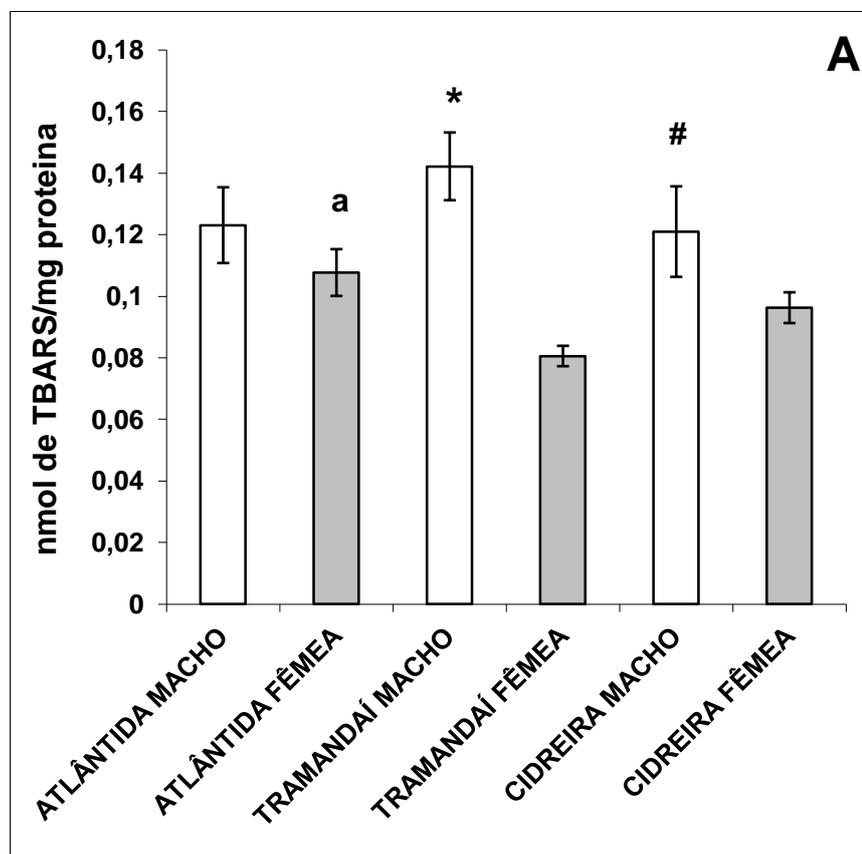
^b Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e fêmeas coletados em Cidreira.

^c Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas coletadas em Cidreira e Tramandaí.

O mesmo padrão de atividade da enzima CAT também foi observado nas análises realizadas em tecidos de brânqueas (Gráfico 3) coletados durante o inverno de 2014, com maiores valores de atividade da enzima CAT encontrados para mexilhões fêmeas, quando comparados com os machos.

Os níveis de lipoperoxidação foram determinados nos tecidos de manto (Gráfico 4) e brânqueas (Gráfico 5) dos mexilhões *P. perna* amostrados no inverno de 2014, através do método de Esterbauer e Chessman (1990) utilizando-se a técnica das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Gráfico 4 - Comparação da Lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A Lipoperoxidação (TBARS) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

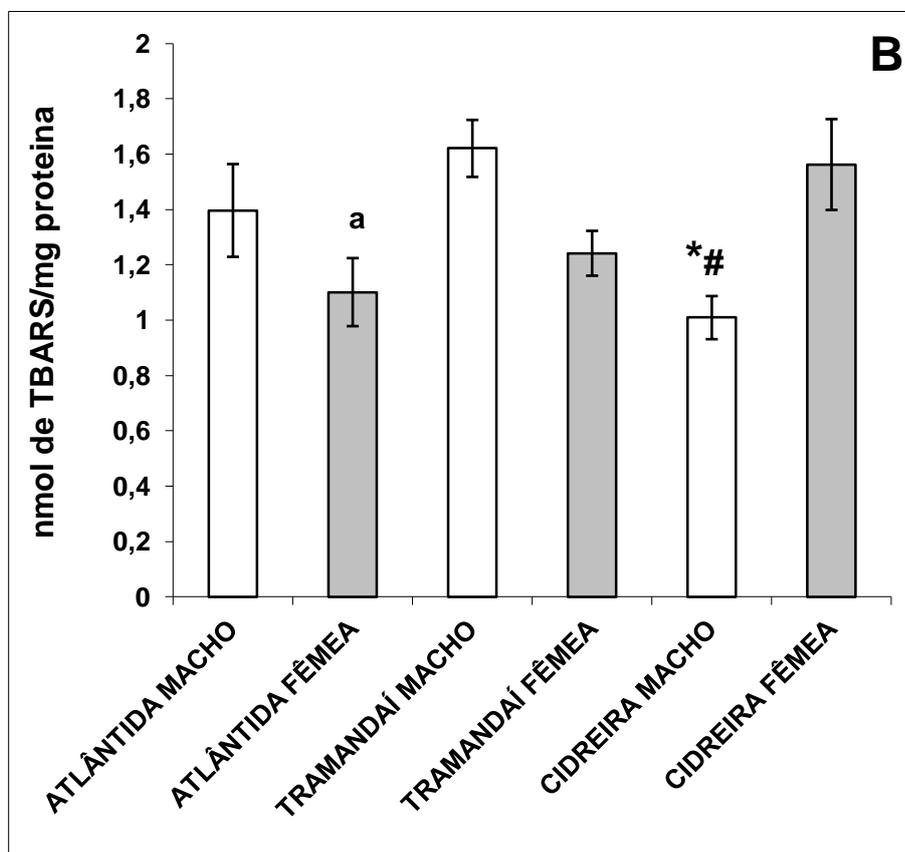
^a Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas coletadas em Atlântida e Tramandaí.

* Indica diferença significativa ($p = 0,046$) entre os machos e as fêmeas coletados em Tramandaí.

Indica diferença significativa ($p = 0,05$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

Como foi ilustrado no gráfico 4, foi observado um padrão nos níveis de lipoperoxidação em tecidos de manto dos mexilhões coletados no inverno de 2014, com maiores valores de danos lipídicos encontrados em mexilhões machos do que nas fêmeas em todos os pontos amostrados.

Gráfico 5 – Comparação da Lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A Lipoperoxidação (TBARS) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

^a Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas coletadas em Atlântida e Cidreira.

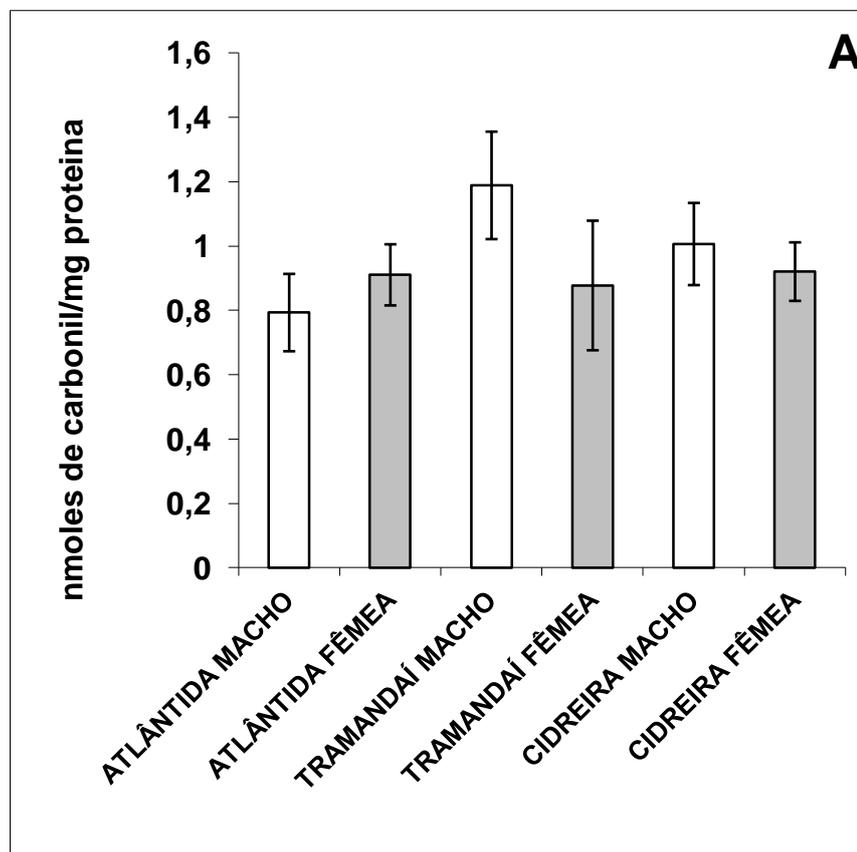
* Indica diferença significativa ($p = 0,025$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os machos coletados em Cidreira e os machos coletados em Atlântida e Tramandaí.

Também foi observado um padrão nos níveis de lipoperoxidação em tecidos de brânqueas dos mexilhões coletados no inverno de 2014, com maiores valores de danos lipídicos encontrados em mexilhões machos do que nas fêmeas, com exceção do ponto amostrado em Cidreira, no qual os níveis de lipoperoxidação encontrados foram maiores nas fêmeas do que nos machos, apesar desta diferença não ser significativa estatisticamente.

A carbonilação é um tipo de oxidação proteica que forma cetonas ou aldeídos reativos. Os radicais carbonil foram mensurados em tecidos de manto (Gráfico 6) e brânqueas (Gráfico 7) de mexilhões *P. perna* coletados no inverno de 2014, conforme o método de Levine *et al.* (1990).

Gráfico 6 – Comparação da quantidade de Carbonil em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.

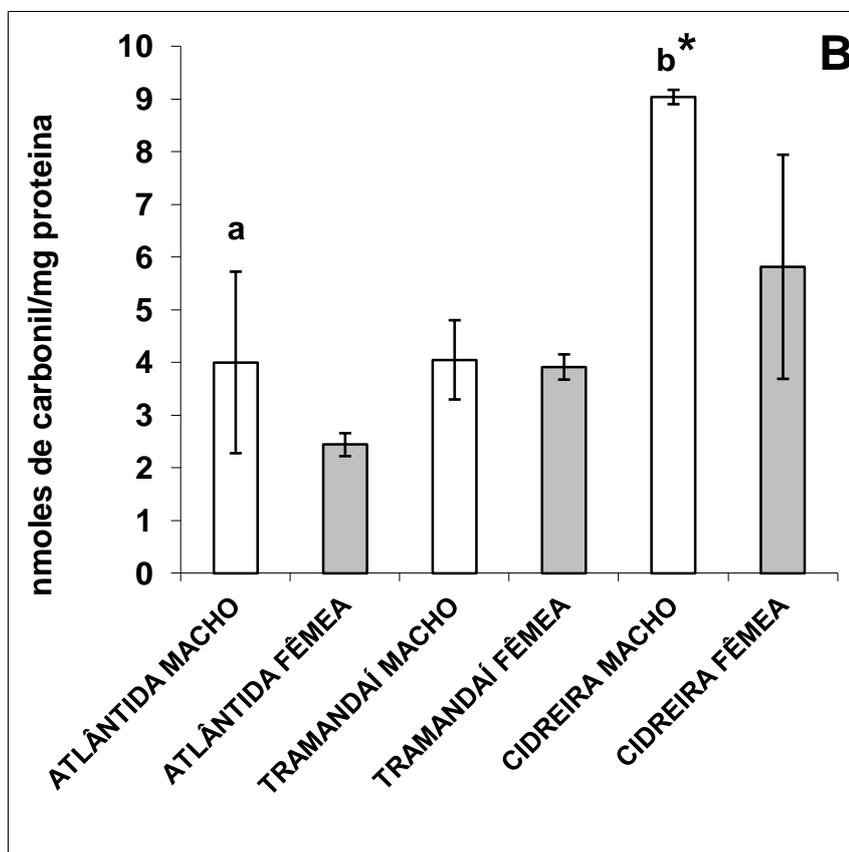


Fonte: Autor (2015).

A quantidade de radicais Carbonil foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

Como foi demonstrado no Gráfico 6, não ocorreram diferenças estaticamente significativas nas quantidades de carbonil determinadas em tecidos de manto de mexilhões machos e fêmeas, bem como entre grupos de fêmeas e machos entre si. Porém, apesar de não haver diferenças significativas, foi observado um padrão na quantidade de Carbonil, que seria maior em machos do que em fêmeas, e só não ocorreu no ponto de coleta de Atlântida, que poderia vir a ser estatisticamente significativo, aumentando-se o N amostral.

Gráfico 7 – Comparação da quantidade de Carbonil em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A quantidade de radicais Carbonil foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

^a Indica diferença significativa ($p=0,01$) entre os machos e as fêmeas coletadas em Atlântida.

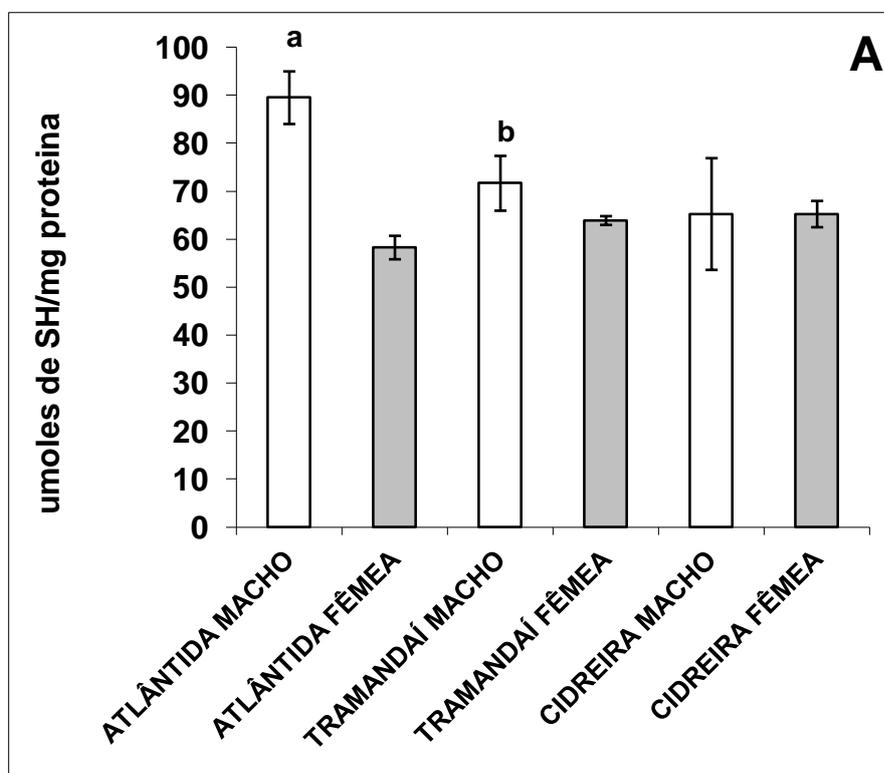
^b Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os machos coletados em Cidreira e os machos coletados em Atlântida e Tramandaí.

Assim como nas análises de tecidos de manto, as análises dos tecidos de brânqueas dos mexilhões *P. perna*, coletados no inverno de 2014, também demonstraram um padrão na quantidade de carbonil, com valores maiores encontrados nos mexilhões machos em todos os pontos amostrados, considerados estatisticamente significativos nos pontos de coleta de Atlântida e Cidreira.

Os grupamentos tiólicos (SH) também chamados de sulfidril, funcionam como mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos, e foram mensurados em tecidos de manto (Gráfico 8) e brânqueas (Gráfico 9) de mexilhões *P. perna* coletados no inverno de 2014, através do método de Ellman (1959).

Gráfico 8 – Comparação da quantidade de grupamentos tiólicos (SH) em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

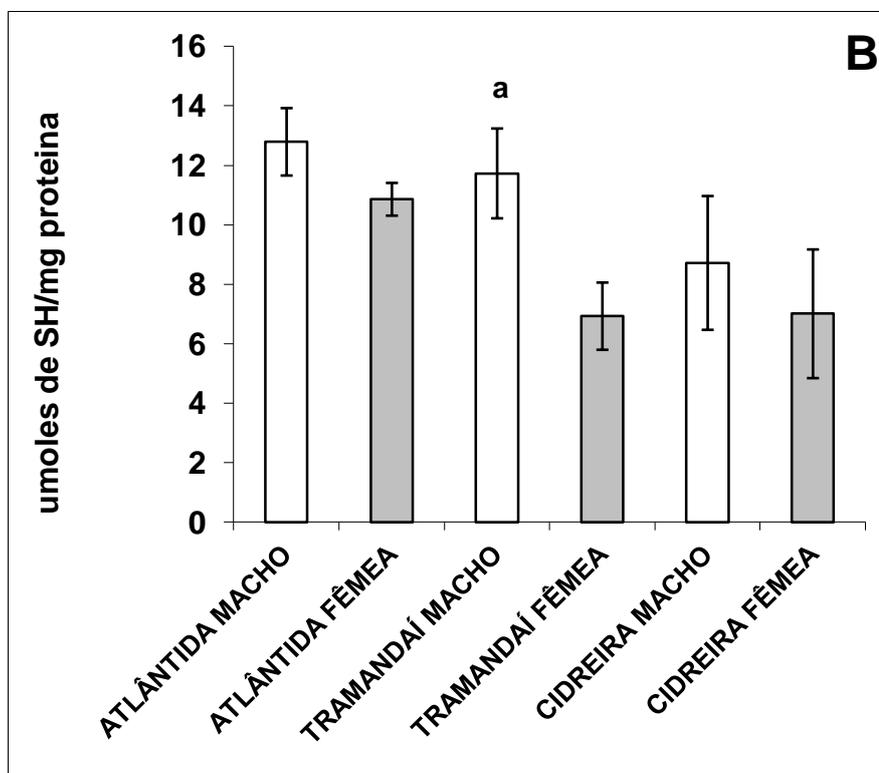
A quantidade de grupamentos tiólicos (SH) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média ±EPM.

^a Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e as fêmeas coletadas em Atlântida.

^b Indica diferença significativa ($p=0,025$) entre os machos e as fêmeas coletados em Tramandaí.

Foi observado um padrão nas análises da quantidade de grupamentos tiólicos, com maiores níveis de SH encontrados nos machos, significativos estatisticamente nos pontos de Atlântida e Tramandaí, em tecidos de manto de mexilhões *P. perna* coletados no inverno de 2014.

Gráfico 9 – Comparação da quantidade de grupamentos tiólicos (SH) em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Inverno de 2014.



Fonte: Autor (2015).

A quantidade de grupamentos tiólicos (SH) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

^a Indica diferença significativa ($p=0,04$) entre os machos e as fêmeas coletadas em Tramandaí.

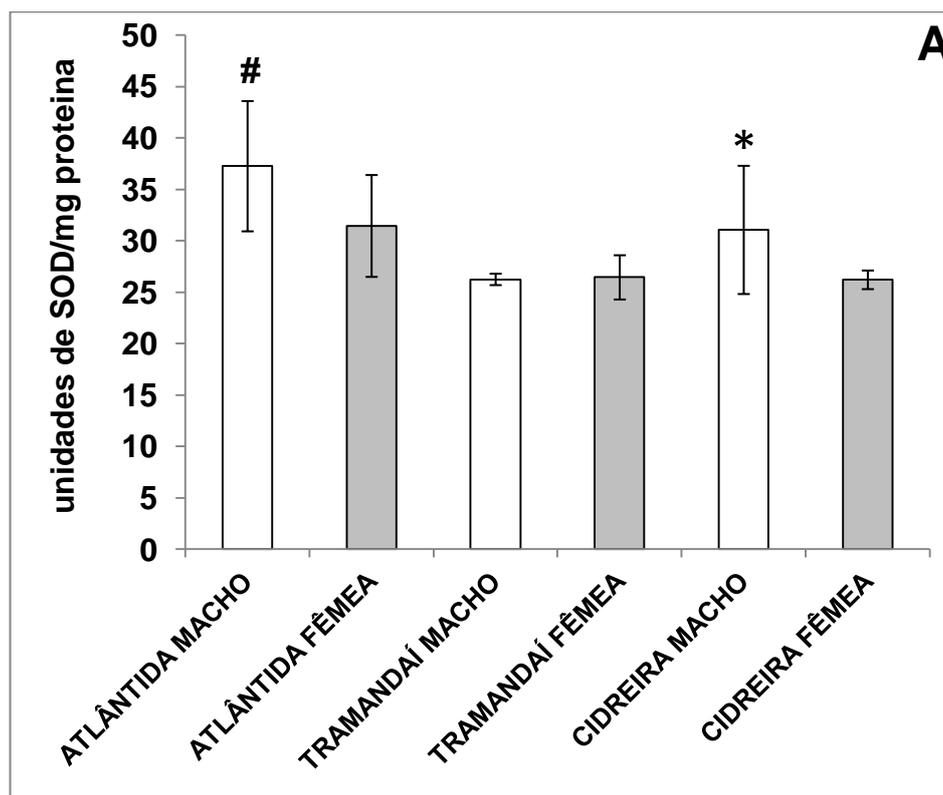
Assim como nas análises de tecidos de manto, também foi observado um padrão nas análises da quantidade de grupamentos tiólicos em tecidos de brânqueas, com maiores níveis de SH encontrados nos machos, significativos estatisticamente somente no ponto de coleta de Tramandaí, mas que poderia vir a ser significativo em todos os pontos, caso o N amostral fosse aumentado.

5.2 ANÁLISES DA COLETA DE VERÃO (2015)

Os resultados obtidos nas análises dos mexilhões coletados durante o Verão 2015 estão descritos abaixo:

A atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) foi mensurada nos tecidos de manto (Gráfico 10) e brânqueas (Gráfico 11) dos mexilhões coletados durante o verão de 2015.

Gráfico 10 – Comparação entre as atividades da SOD em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

A atividade da SOD foi mensurada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

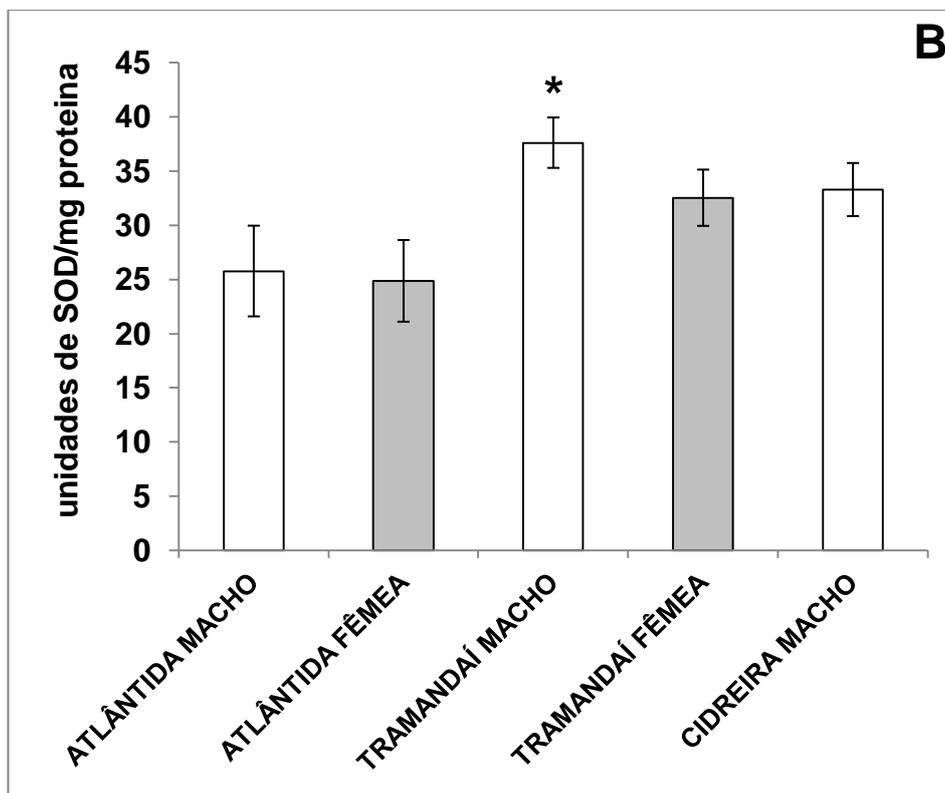
* Indica diferença significativa ($p=0,04$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

Indica diferença significativa ($p<0,05$) entre os machos coletados em Atlântida e os machos coletados em Tramandaí.

Assim como nas análises de Inverno, as análises de verão também mostraram que o ponto de coleta com maior atividade da enzima SOD em tecidos de manto de mexilhões *P. perna* foi Atlântida, para ambos os sexos de mexilhões. Ainda parece haver um padrão de maior atividade de SOD nos mexilhões machos, que poderia ser comprovado aumentando-se o N amostral.

As análises da comparação entre as atividades da SOD em tecidos de brânqueas não foram realizadas para o grupo de mexilhões fêmeas de Cidreira, sendo realizada somente para os outros grupos.

Gráfico 11 – Comparação entre as atividades da SOD em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e mexilhões machos coletados em Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

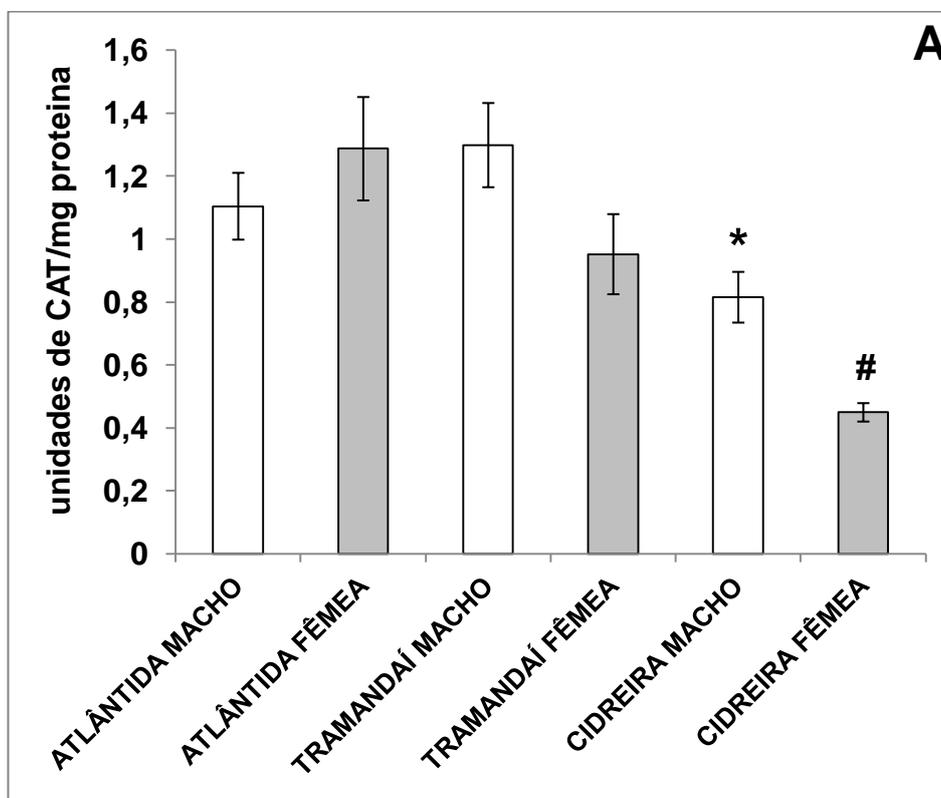
A atividade da SOD foi mensurada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

* Indica diferença significativa ($p=0,0001$) entre os machos e as fêmeas coletados em Tramandaí.

Foi observado que nos pontos de coleta de Atlântida de Tramandaí parece haver um padrão de maior atividade de SOD em mexilhões machos, que poderia ser comprovado aumentando-se o N amostral, enquanto que para o ponto de Cidreira não ocorreu comparações pela falta do grupo de fêmeas nas análises

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi determinada nos tecidos de manto (Gráfico 12) e brânqueas (Gráfico 13) dos mexilhões coletados nos três pontos amostrados durante o Verão de 2015.

Gráfico 12 – Comparação entre as atividades da CAT em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

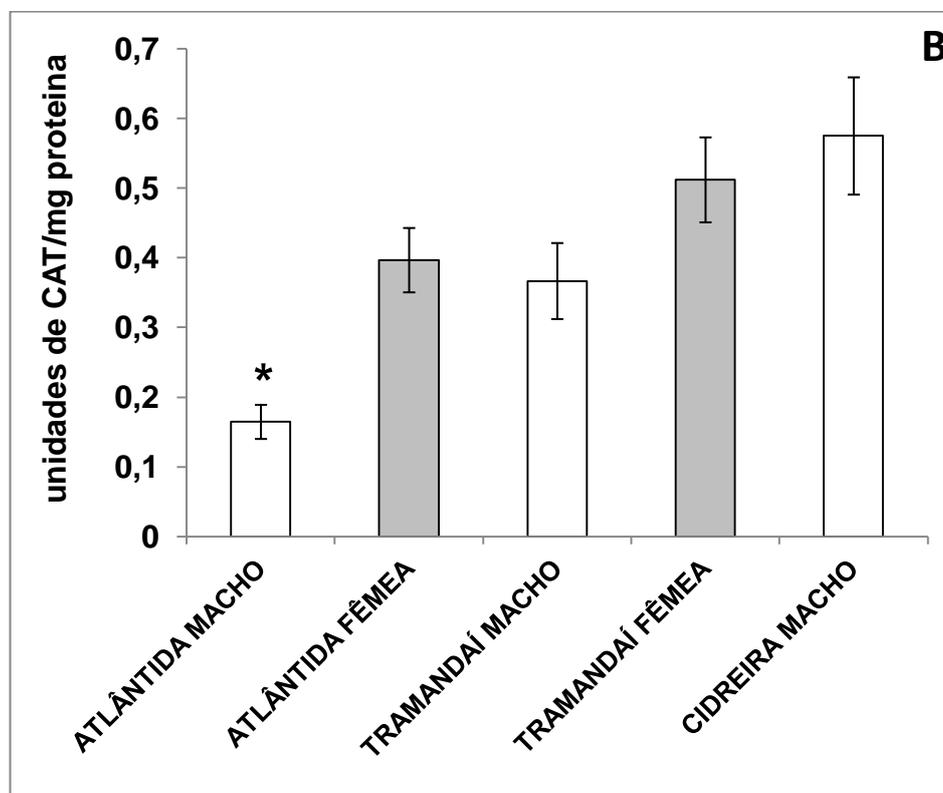
A atividade da CAT foi mensurada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

* Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

Indica diferença significativa ($p<0,005$) entre as fêmeas coletadas em Cidreira e as fêmeas coletadas em Atlântida e Tramandaí.

Foi observado um padrão na atividade da enzima catalase em tecidos de manto de mexilhões *P. perna* durante o Verão de 2015, onde existiu maior atividade da enzima CAT em mexilhões machos, significativa estatisticamente no ponto de Tramandaí, com excessão do ponto de Atlântida, onde os níveis de atividade de CAT foram maiores nas fêmeas.

Gráfico 13 – Comparação entre as atividades da CAT em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e mexilhões machos coletados em Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

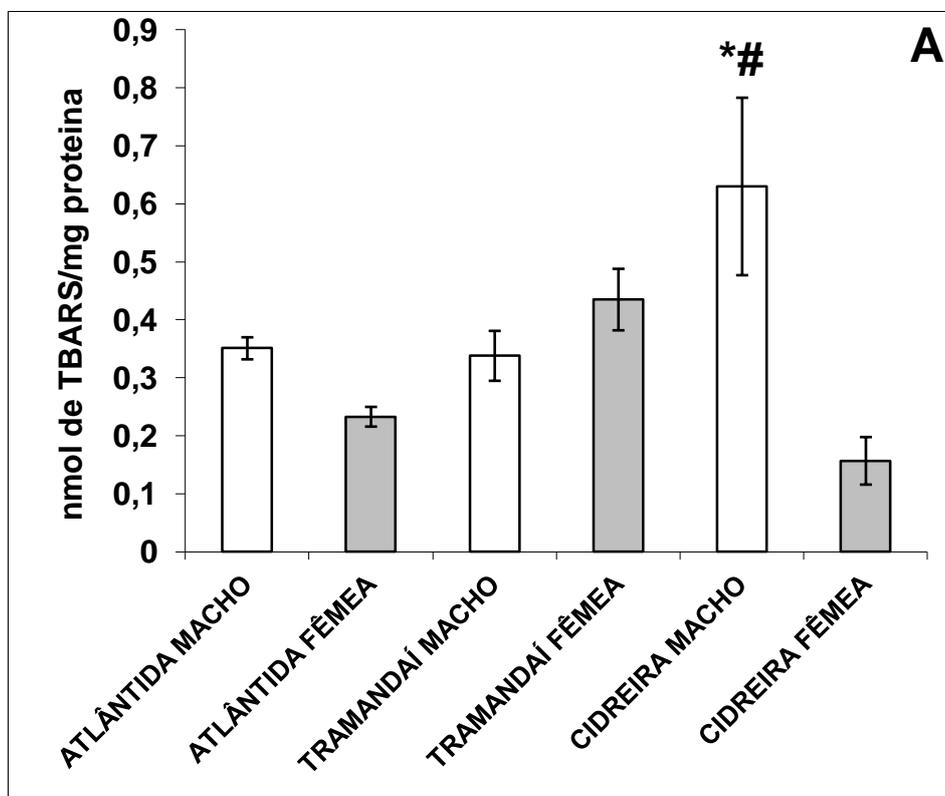
A atividade da CAT foi mensurada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

*Indica diferença significativa ($p=0,048$) entre os machos e as fêmeas coletados em Atlântida.

Foi observado um padrão na atividade da enzima catalase em tecidos de brânqueas de mexilhões *P. perna* durante o Verão de 2015, onde existiu maior atividade da enzima CAT em mexilhões fêmeas, significativa estatisticamente no ponto de Atlântida, mas que também ocorreu no ponto de Tramandaí e poderia ser considerado significativo aumentando-se o N amostral.

Os níveis de lipoperoxidação foram determinados nos tecidos de manto (Gráfico 14) e brânqueas (Gráfico 15) dos mexilhões *P. perna* amostrados no Verão de 2015.

Gráfico 14 – Comparação da Lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

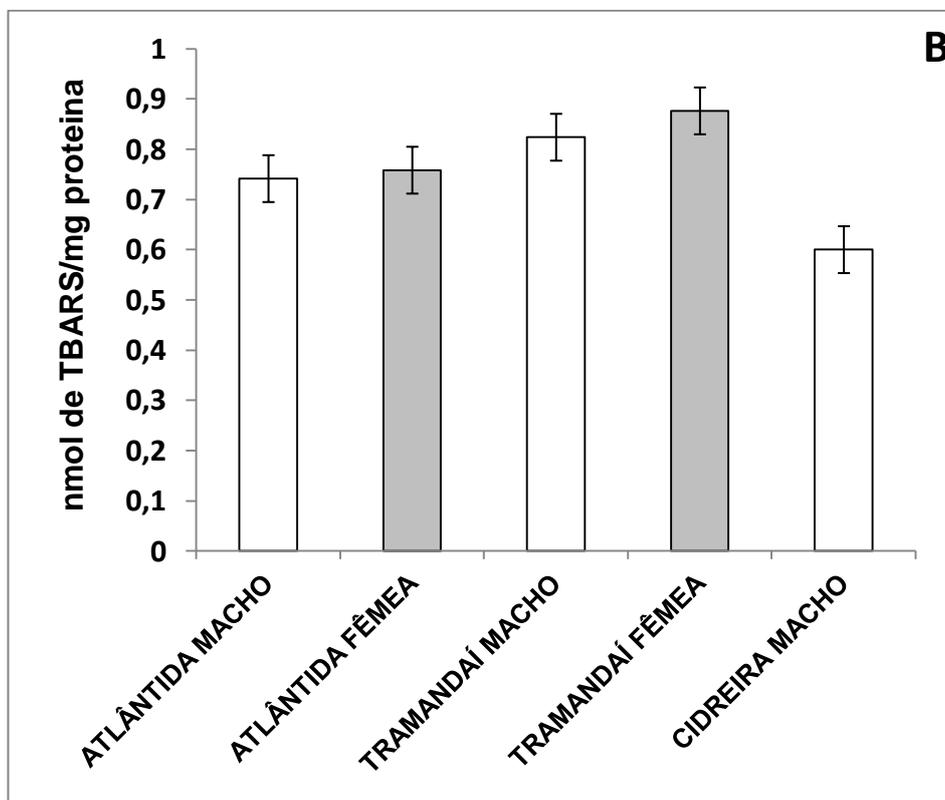
A Lipoperoxidação (TBARS) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

* Indica diferença significativa ($p=0,017$) entre os machos e as fêmeas coletados em Cidreira.

Indica diferença significativa ($p<0,05$) entre os machos coletados em Cidreira e os machos coletados em Atlântida e Tramandaí.

Foi observado um padrão nos níveis de lipoperoxidação em tecidos de manto dos mexilhões coletados no inverno de 2014, com maiores valores de danos lipídicos encontrados em mexilhões machos do que nas fêmeas, que só não ocorreu no ponto de Tramandaí.

Gráfico 15 – Comparação da Lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



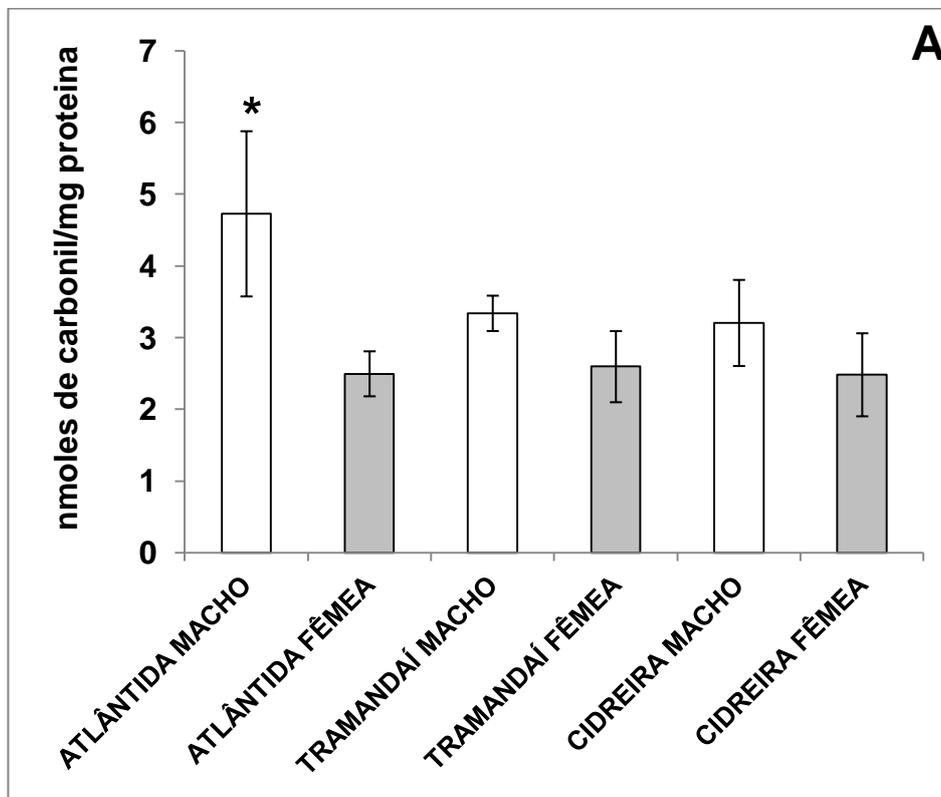
Fonte: Autor (2015).

A Lipoperoxidação (TBARS) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

Também foi observada uma diferença entre os níveis de lipoperoxidação em mexilhões machos e fêmeas, com maiores valores de lipoperoxidação em mexilhões fêmeas que poderiam ser consideradas significativos estatisticamente se o N amostral fosse maior, e houvesse o grupo de fêmeas de Cidreira para realizar comparações.

Os radicais carbonil foram mensurados em tecidos de manto (Gráfico 16) e brânqueas (Gráfico 17) de mexilhões *P. perna* coletados no Verão de 2015, conforme o método de Levine *et al.* (1990).

Gráfico 16 – Comparação da quantidade de Carbonil em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



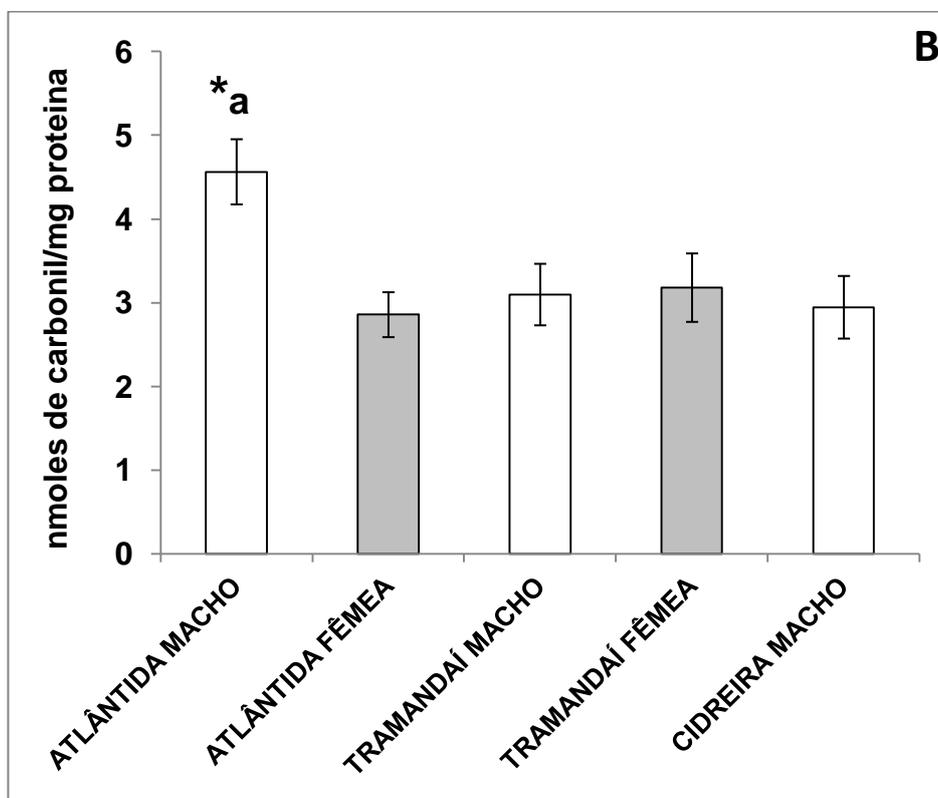
Fonte: Autor (2015).

A quantidade de radicais Carbonil foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

*Indica diferença significativa ($p = 0,05$) entre os machos e as fêmeas coletados em Atlântida.

No gráfico 16 podemos observar um padrão na quantidade de carbonil mensurada, com maiores valores de carbonil em tecidos de manto de mexilhões machos, que poderiam vir a se tornar significantes estatisticamente se o N amostral fosse aumentado.

Gráfico 17 – Comparação da quantidade de Carbonil em tecidos de brânqueas (B) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e machos coletados em Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

A quantidade de radicais Carbonil foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

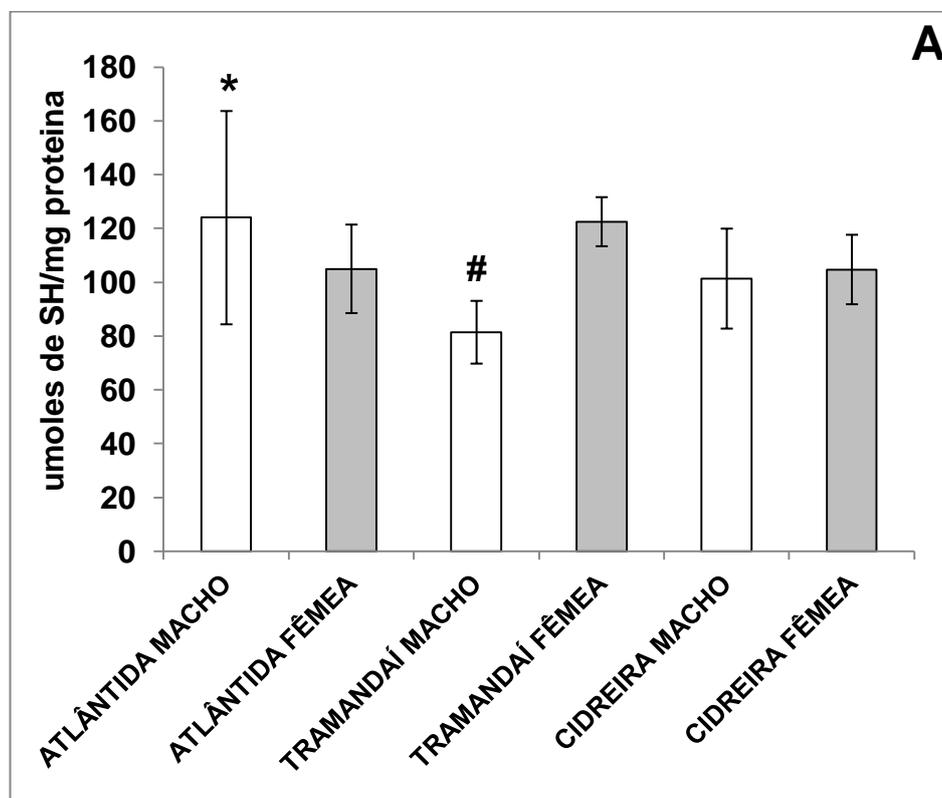
* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os machos coletados em Atlântida e os machos coletados em Tramandaí e Cidreira.

^a Indica diferença significativa ($p = 0,05$) entre os machos e as fêmeas coletadas em Atlântida.

Apesar de haver diferenças nas quantidades de carbonil mensuradas, nenhuma diferença entre machos e fêmeas foi considerada significativa estatisticamente, somente sendo considerada entre os grupos de machos coletados no Verão de 2015.

Os grupamentos tiólicos (SH) foram mensurados em tecidos de manto (Gráfico 18) e brânqueas (Gráfico 19) de mexilhões *P. perna* coletados no Verão de 2015, através do método de Ellman (1959). Os resultados encontrados estão ilustrados nos gráficos abaixo:

Gráfico 18 – Comparação da quantidade de grupamentos tiólicos (SH) em tecidos de manto (A) de mexilhões machos e fêmeas coletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

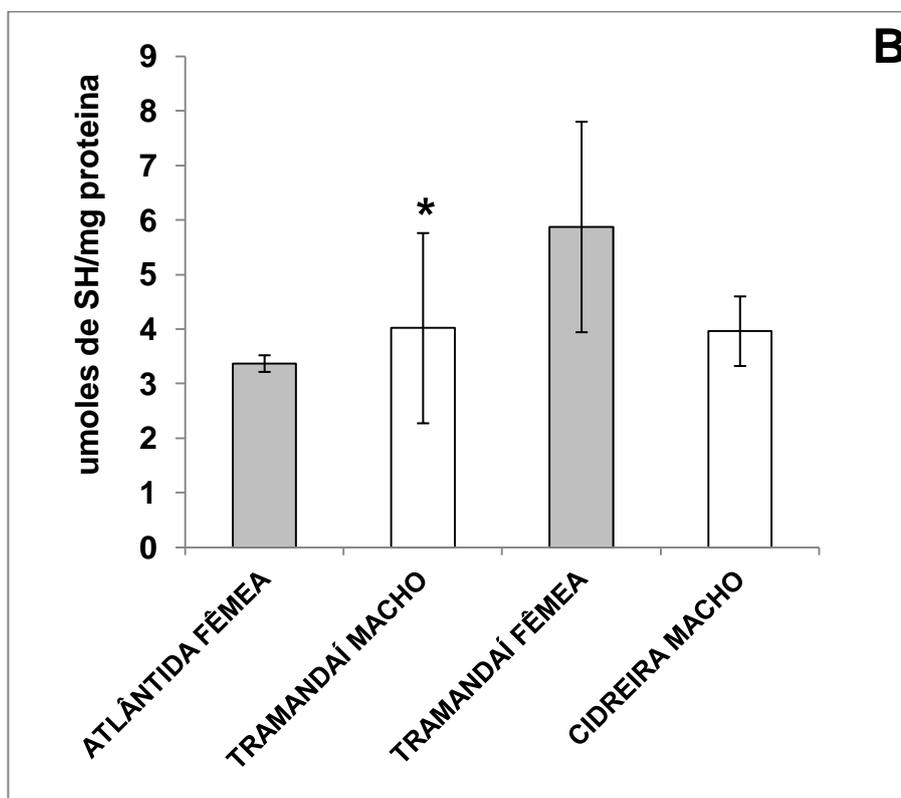
A quantidade de grupamentos tiólicos (SH) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

*Indica diferença significativa ($p=0,05$) entre os machos e fêmeas coletados em Atlântida.

#Indica diferença significativa ($p=0,04$) entre os machos e as fêmeas coletados em Tramandaí.

As análises da quantidade de grupamentos tiólicos apresentaram resultados bastante variáveis, sendo que para o ponto de Atlântida, os machos apresentaram maiores níveis de SH significativos estatisticamente, porém, este também foi o ponto com maior índice de erro, enquanto nos pontos de Tramandaí e Cidreira as fêmeas apresentaram maiores níveis de SH, sendo somente os níveis de SH mensurados em Tramandaí significativos estatisticamente.

Gráfico 19 – Comparação da quantidade de grupamentos tiólicos (SH) em tecidos de brânqueas (B) de mexilhõescoletados em Atlântida, Tramandaí e Cidreira no Verão de 2015.



Fonte: Autor (2015).

A quantidade de grupamentos tiólicos (SH) foi determinada conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são apresentados como média ±EPM.

*Indica diferença significativa ($p=0,0001$) entre os machos e fêmeas coletados em Tramandaí.

As análises da quantidade de grupamentos tiólicos foram realizadas somente nos mexilhões machos e fêmeas de Tramandaí, fêmeas de Atlântida e machos de Cidreira. Apesar da falta de resultados para realizar comparações entre machos e fêmeas, os níveis de grupamentos tiólicos foram maiores nas fêmeas e foram considerados significativos estatisticamente.

6 DISCUSSÃO

A utilização de mexilhões da espécie *P. perna* no biomonitoramento já vem sendo amplamente empregada pelos pesquisadores. Atualmente existem diversos trabalhos utilizando análises (ALMEIDA *et al.*, 2005; DAFRE *et al.*, 2004; FILHO *et al.*, 2001; TREVISAN, 2008) do balanço REDOX em mexilhões *P. perna* em diferentes locais do Brasil.

O presente estudo foi realizado ao longo do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, com mexilhões *Perna perna*, em três pontos de coleta: nas plataformas de pesca de Atlântida (p1), Tramandaí (p2) e Cidreira (p3). Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira em Setembro de 2014 (Inverno) e a segunda em Março de 2015 (Verão). Foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), os níveis de lipoperoxidação (TBARS), carbonil e sulfidril em tecidos de manto e brânqueas de mexilhões machos e fêmeas amostrados nas duas estações.

A atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) foi determinada em tecidos de manto e brânqueas de machos e fêmeas de mexilhões *P. perna* no período de Verão (2015) e somente nos tecidos de manto no período de Inverno (2014). Os machos apresentaram maior atividade da enzima SOD do que as fêmeas, no ponto de coleta de Cidreira, para as duas coletas realizadas, nos tecidos de manto amostrados. Os valores da atividade da SOD encontrados para o ponto de coleta de Tramandaí foram semelhantes entre machos e fêmeas e considerados iguais após análises estatísticas nos tecidos de manto amostrados, enquanto que nas brânquias, foram encontrados maiores níveis de atividade de SOD em mexilhões machos e estes níveis foram considerados significativos estatisticamente. O ponto de coleta de Atlântida apresentou variações, sendo que na coleta de Verão os machos apresentaram maiores valores de atividade de SOD, enquanto na coleta de Inverno as fêmeas apresentaram maiores valores de atividade de SOD em tecidos de manto, sendo este o maior valor de SOD encontrado neste trabalho ($80,5 \pm 5,31$ unidades de SOD/mg de proteína). Portanto, podemos estimar que existiu maior atividade de SOD em mexilhões machos, com exceção da análise de manto, no período de Inverno, em que a atividade foi maior em fêmeas.

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi determinada em tecidos de manto e brânqueas de mexilhões machos e fêmeas nos períodos de Inverno (2014) e Verão

(2015). No ponto de coleta de Atlântida, a atividade de CAT foi maior nas fêmeas, em tecidos de manto e brânqueas, nas duas coletas realizadas. No ponto de coleta de Tramandaí, a atividade de CAT foi maior nas fêmeas, nos tecidos de brânqueas analisados durante as coletas de Verão e Inverno, e nos tecidos de manto analisados na coleta de Inverno, sendo este valor da atividade de CAT em fêmeas o maior encontrado neste estudo ($2,0945 \pm 0,213$ unidades de CAT/mg de proteína), enquanto que nos tecidos de manto da coleta de Verão, os níveis de atividade de CAT foram maiores em mexilhões machos. Os valores da atividade de CAT para o ponto de Cidreira, foram maiores em fêmeas nos tecidos de brânqueas e manto, referentes à coleta de Inverno, enquanto para a coleta de Verão, os níveis de atividade de CAT foram maiores em mexilhões machos. Sendo assim, pode-se concluir que a enzima CAT apresenta maior atividade em mexilhões fêmeas, principalmente durante o Inverno, do que em machos, mas que provavelmente existam fatores que causam a maior atividade de CAT em mexilhões machos durante o período do Verão, causando uma inversão do padrão analisado.

A lipoperoxidação foi determinada em tecidos de manto e brânqueas de mexilhões machos e fêmeas nos períodos de Inverno (2014) e Verão (2015). No ponto de coleta de Atlântida, os valores de lipoperoxidação foram maiores em mexilhões machos em ambos tecidos estudados. No ponto de coleta de Tramandaí, os valores de lipoperoxidação foram maiores em machos, nos tecidos de manto e brânqueas, sendo este o maior valor de lipoperoxidação encontrado neste estudo ($1,62 \pm 0,103$ nmol de TBARS/mg de proteína), amostrados no período de Inverno, enquanto no período de Verão, os valores de lipoperoxidação para o ponto de coleta de Tramandaí, nos tecidos de manto e brânqueas foram maiores em mexilhões fêmeas. No ponto de coleta de Cidreira, os valores de lipoperoxidação foram maiores em mexilhões machos, para os tecidos de manto, nas coletas de Inverno e Verão, e maiores em fêmeas para os tecidos de brânqueas coletados durante o Inverno. Portanto, podemos estimar que a lipoperoxidação ocorreu mais em mexilhões machos, durante o inverno, sendo que no Verão podem ocorrer fatores que façam com que a lipoperoxidação aumente nas fêmeas.

Os radicais carbonil foram mensurados em tecidos de manto e brânqueas de mexilhões machos e fêmeas coletados nos períodos de Inverno (2014) e Verão (2015). No ponto de coleta de Atlântida os níveis de carbonil encontrados foram maiores em mexilhões machos, para os tecidos de brânqueas coletados no Inverno

e no Verão, e também para os tecidos de manto coletados no Verão, enquanto que para os tecidos de manto coletados no Inverno, os valores de carbonil foram maiores nas fêmeas. No ponto de coleta de Tramandaí, os valores de carbonil não apresentaram nenhuma diferença significativa, sendo um pouco maiores nas fêmeas do que nos machos, nos tecidos de manto, nas coletas de Inverno e Verão, e praticamente iguais nos tecidos de brânqueas. No ponto de coleta de Cidreira, foram encontrados maiores valores de carbonil em mexilhões machos, para ambos tecidos amostrados, nos períodos de Inverno e Verão, sendo o valor de carbonilação dos tecidos de brânqueas de mexilhões machos, amostrados no Inverno o maior valor encontrado neste estudo ($9,04 \pm 0,136$ nmoles de carbonil/mg de proteína). Então, podemos concluir que existiram maiores valores de carbonil em mexilhões machos do que nas fêmeas.

Os grupamentos tiólicos (SH) foram mensurados em tecidos de manto e brânqueas de mexilhões machos e fêmeas coletados nos períodos de Inverno (2014) e Verão (2015). No ponto de coleta de Atlântida, foram encontrados maiores valores de SH em mexilhões machos, nos tecidos de manto, sendo este o maior valor de SH encontrado neste estudo ($124,026 \pm 39,64$ umoles de SH/mg de proteína) e brânqueas, nas coletas de Inverno e Verão. No ponto de coleta de Tramandaí, foram encontrados valores de SH maiores em machos, nos tecidos de manto e brânqueas da coleta de Inverno, enquanto que na coleta de verão os valores de SH foram maiores nas fêmeas para ambos os tecidos. No ponto de coleta de Cidreira, os valores de SH tiveram pouca variação, sendo considerados iguais estatisticamente. Sendo assim, podemos concluir que ocorreram maiores valores de SH em mexilhões machos, porém, podem ocorrer fatores que aumentes os níveis de SH em fêmeas, durante o Verão, em Tramandaí.

Portanto, podemos concluir com este estudo que os espécimes de mexilhões machos analisados provavelmente sofreram maiores danos oxidativos do que os mexilhões fêmeas analisados, principalmente no período do Inverno. Os mexilhões machos apresentaram menores níveis de atividade da enzima CAT, maiores níveis de lipoperoxidação e também maiores níveis de carbonil e grupamentos tiólicos (SH), principalmente durante o Inverno. Somente a atividade da enzima SOD foi maior em mexilhões machos, com exceção do período de Inverno, em que a atividade de SOD foi maior nas fêmeas.

Sendo assim, as fêmeas parecem possuir maiores defesas contra os danos causados pelo estresse oxidativo, principalmente durante o período de Inverno, fato este que provavelmente possa estar relacionado com a época do ápice das atividades de reprodução desta espécie ser também durante o Inverno, mas que também comprova que provavelmente existam diferenças sazonais nas defesas antioxidantes destes organismos (CHRISTO, 2014; FILHO *et al.* 2001). Estas diferenças sazonais podem estar associadas ao grande aumento da população nos municípios estudados, durante o período de verão, aumentando também o volume de esgotos e efluentes lançados no ecossistema, fator este que pode alterar drasticamente o metabolismo dos organismos aquáticos destes habitats.

Em estudos desenvolvidos com a espécie de ostra *Crassostrea gigas* que analisaram a influência da sazonalidade nas defesas antioxidantes e no ciclo reprodutivo da espécie, sugere-se que as ostras também possam ativar seu sistema metabólico e alterar sazonalmente as respostas antioxidantes, de modo semelhante a *Perna perna* (ZOTTIS, 2005).

Os maiores níveis de lipoperoxidação em mexilhões machos, assim como a maior atividade de SOD em mexilhões machos durante o período do Inverno também foram encontrados por Christo (2014). Atualmente, já existem estudos do balanço REDOX que demonstram que o aumento da lipoperoxidação tecidual em organismos aquáticos pode estar associado a elevadas concentrações de xenobióticos, como observado por Jorge *et al.* (2002), no molusco *Mytella guyanensis*, que apresentou elevados níveis de lipoperoxidação (TBARS) em regiões consideradas potencialmente contaminadas por metais-traço.

Diversos estudos com a utilização de marcadores do estresse oxidativo já foram realizados com mexilhões *P. perna*, objetivando estudar os mais diversos parâmetros. Almeida e Bainy (2006) realizaram estudos, analisando atividades de enzimas antioxidantes dos mexilhões *P. perna*, em momentos de hipoxia, comprovando que os níveis da enzima SOD aumentam quando os mexilhões são expostos ao ar, sugerindo então que os animais poderiam alterar suas defesas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo gerado naturalmente em seus organismos.

Alves *et al.* (2002) realizaram estudos sobre os efeitos do Furadan (pesticida agrícola) em mexilhões *P. perna*, e ostras *Crassostrea rhizophorae*, determinando os níveis da glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) e da colinesterase (ChE)

antes e depois da exposição ao pesticida, percebendo que os níveis de CAT aumentaram 9% nas ostras *Crassostrea rhizophorae* estudadas, após serem expostas ao pesticida Furadan.

Trevisan (2010) estudou as defesas antioxidantes de mexilhões *Mytilus edulis* e mexilhões *P. perna* quando estes organismos foram expostos a Cobre e Zinco, respectivamente, comprovando que, após exposição aos metais, ocorreu uma forte resposta adaptativa de amplificação das defesas antioxidantes celulares.

Dafree *et al.*, (2004) estudaram as enzimas antioxidantes e o status tiol/dissulfeto na glândula digestiva de mexilhões *P. perna*, quando expostos ao Chumbo e ao Paraquat (herbicida). Foi observado que o Chumbo teve um efeito supressor sobre as alterações enzimáticas, induzidas pelo Paraquat, enquanto as alterações nos parâmetros tiol/dissulfureto foram contidas.

Filho *et al.*, (2001) realizaram estudos determinando as atividades de enzimas do sistema antioxidante em tecidos de glândula digestiva de mexilhões *P. perna*, em diferentes estações do ano. Foi comprovado neste estudo que existem mudanças sazonais na defesas antioxidantes, no tecido estudado.

Como demonstrado acima, os mexilhões *P. perna*, utilizados neste estudo, são bastante utilizados para testar os efeitos de xenobióticos sobre as respostas do sistema de defesas antioxidantes, em seus diferentes tecidos. Os mexilhões fornecem respostas significativas, satisfatórias e rápidas aos estímulos realizados em diversos trabalhos. Portanto, podemos inferir que os mexilhões também forneceriam respostas quando expostos a estresses ambientais, como xenobióticos, revelando-se uma espécie com alto potencial na realização de biomonitoramento de ambientes aquáticos.

7 CONCLUSÃO

Atualmente, torna-se cada vez mais importante analisar os efeitos do estresse ambiental em organismos aquáticos, especialmente nas espécies cultivadas para consumo humano. O estudo dos sistemas de defesa antioxidante dos organismos pode fornecer informações importantes que podem ser utilizadas como ferramentas para avaliar a qualidade dos ecossistemas aquáticos.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que existiram diferenças sazonais nas defesas antioxidantes de mexilhões *P. perna*, e também entre os diferentes sexos e tecidos (manto e brânqueas) dos mexilhões estudados . A avaliação destes parâmetros em bivalves brasileiros é promissor e a sua continuidade é extremamente importante para se obter dados confiáveis e representativos dos padrões de defesas antioxidantes em *P. perna*, e também para sermos capazes de reconhecer as mudanças que ocorrerem nestes padrões.

A sugestão para coletas futurasseria de aumentar o N amostral com o objetivo de tornar os resultados obtidos mais confiáveis, e tornar visíveis possíveis diferenças, que, após análises estatísticas, não são consideradas significativas em análises com baixo N amostral. Além disso, propõe-se também a realização das análises em tecidos de gônadas dos mexilhões *P. perna*, a fim de confirmar as diferenças encontradas nas defesas antioxidantes entre machos e fêmeas, e também para propor uma justificativa para as diferenças encontradas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, New York, v.105, p. 121-126, 1984.

ALMEIDA, E. A. de; BAINY, A. C. D. Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Pernaperna*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 2, p. 225-229, 2006.

ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in *Pernaperna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. New York, v. 146, p. 588-600, 2007.

ALVES, S. R. C. *et al.* Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine environmental research**, Barking, Inglaterra, GB, v. 54, n. 3, p. 241-245, 2002.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643. jul./ago. 2010.

BOVERIS, A. Determination of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods Enzymol.**, New York, v. 105, p. 429-435, 1984.

BRASILEIRO, A. L. S. A injúria da reperfusão miocárdica. **Socerj**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p.79-88, 1997.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996. 446 p.

CHRISTO, G. S. **Análise de parâmetros do balanço redox em populações do mexilhão *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2014. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Imbé. 2014.

COE, W.R. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. **Quart. Jour. Rev. Biol.**, v.18,n. 2, p. 154-164, 1943.

COGO, A. J. D. *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza online**.v. 7, p. 37-42, 2009. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br/>>. Acesso em: 18 nov. 2015.

DAFRE, A. L. *et al.* Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. **Chemico-biological interactions**, Limerick, Irlanda, v. 149, n. 2, p. 97-105, 2004.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys**, Duluth, n. 82, p. 70-77, 1959.

ESTERBAUER, H.; CHESSMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERNANDES, F. C. *etal.* Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. In: RESGALLA JR, C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. da (Ed.) **O Mexilhão *Perna perna* (L.)**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 25-30.

FREIRE, M. M. *et al.* Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 2, 2008.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**. Porto Alegre, Ano 2, n. 1, p. 156-164, 2003. Disponível em: <<http://www.santoangelo.uri.br/~briseidy/P%F3s%20Licenciamento%20Ambiental/bioindicadores%2019.10.2010.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

GRUBER, N.L.S.; BARBOZA, E.G.; NICOLODI, J.L. Geografia dos sistemas costeiros e oceanográficos: subsídios para gestão integrada da zona costeira. **Gravel**. Porto Alegre, n. 1, p. 81-89, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University, 2007. v.1, 851 p.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**,v. 142, n. 2, p. 231-55,2004.

HALLIWELL, B. The chemistry of free radicals.**Toxicology and Industrial Health** [S.l.], v. 9, n. 1-2, p. 1-21, 1993.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system.**Journal of Neurochemistry.** Oxford, Inglaterra, GB,v. 59, p. 1609–1623, 1992.

JORGE, L. C. *et al.* Interações dos processos sócio-ambientais nas bacias das enseadas de Icaraí e São Francisco, Niterói (RJ). Organismos aquáticos como bioindicadores da qualidade ambiental com enfoque no mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1798), em Niterói-RJ. **Mundo & Vida**, Niterói,v. 3, n. 2, p. 108-116, 2002.

JORGE, R. A. **Avaliação de impacto ambiental sobre o ecossistema marinho utilizando larvas de mexilhões (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA) como bioindicadores, através de técnicas ecotoxicológicas.** 2003. 505 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasil e fíos con claves para sudeterminación y notas sobre sudistribucion. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**,Rio de janeiro, v. 37 (supl.), p. 327-352,1964.

LAM, P. K.; GRAY, J. S.The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LEVINE, R.L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.**Methods Enzymology**,New York, v. 186, p. 464–478,1990.

LIMA, I. *et al.* Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the north-western coast of Portugal. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, GB,v. 66, p. 1230-1242, 2007.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York ,v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **JBC**, Missouri, v.193, p. 265-275, 1951.

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

Disponível

em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X1000411X>>

Acesso em: 05 nov. 2015.

MANDUZIO, H., *et al.* The point about oxidative stress in molluscs. **Invertebrate Survival Journal** (ISJ).Italy, v. 2, p. 91-104, 2005.

MARQUES, H. L. A. **Criação comercial de mexilhões**. 1 ed. São Paulo: Nobel, 1998. 111 p.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (BIVALVIA, MYTILIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**. Curitiba, v.14, n. 1, p.135-168, 1997.

NOGUEIRA, L. F.; PEREIRA, C. D. S.; SILVA FILHO, J. I. Técnicas baseadas em Lógica Paraconsistente aplicadas na avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Unisanta Science and Technology**. v. 2, n. 1, p. 24-30, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/5812/Downloads/135-466-1-PB.pdf>. Acesso em: 02 out. 2015.

SCHMITT, J. F. **Efeito de diferentes condições ambientais em áreas de cultivo sobre alimentação e biodeposição do mexilhão *Perna perna***. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SIDDALL, S. E. A clarification of the genus *Perna* (Mytilidae). **Bulletin of Marine Science**, Miami, Fla. USA, v. 30, n. 4, p. 858-870, 1980.

SILVA, A. C. *et al.* Estudo hidrodinâmico, climático e bacteriológico associado às fontes pontuais de poluição ao longo do litoral de Fortaleza. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 14, n. 2, abr/jun, p. 83-90, 2009.

SOUZA, R. E. **Monitoramento da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC, utilizando biomarcadores de estresse oxidativo em *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) como indicadores de poluição aquática**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md., US, v. 272, p. 20963–20966, 1997.

STROHAECKER, T. M. **A urbanização no Litoral Norte do Estado do Rio Grande do Sul: contribuição para a gestão urbana ambiental do município de Capão da Canoa**. 2007. 398 f. Dissertação (Doutorado em Geociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

TERCEDOR, A. J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. **SIMPOSIO DEL AGUA EN ANDALUCÍA**, 4., 1996, Almeria, vol. II: 203-213. Disponível em: < <http://ocw.atika.um.es/ciencias/ecologia/lectura-obligatoria-1/pubalbj1996p203.pdf> >. Acesso em: 20/10/2015.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramenta de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, US, v.64, p. 178-189, 2006.

VALENTE, A. M. **Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: Coliformes termotolerantes e *Enterococcus*: ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras**. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense, 2004.

VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, GB, v. 76, n. 4, p.745-752, 2008.

VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane Lipid Oxidation**. Boca Raton: CRC Press, 1990. v. 1,

ZOTTIS, A. D. A. **Uso de biomarcadores de estresse oxidativo no diagnóstico ambiental em ostra, *Crassostrea gigas* e mexilhão, *Perna perna* em estações de malacocultura da Ilha de Santa Catarina**. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Florianópolis, SC. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, London, v. 411, n. 28, p. 989-990. 2001.