

**Universidade Federal do Pará   Faculdade de Oceanografia   Instituto de Geociências**

## **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**ANTÔNIO LEONILDO NASCIMENTO DERGAN**

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO POLIQUETA *NAMALYCASTIS*  
ABIUMACOMO FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE  
LOCAIS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE CONTAMINAÇÃO NO ESTUÁRIO  
GUAJARINO, BELÉM (PA).**

**GEOCIÊNCIAS  
U F P A**

**ANTÔNIO LEONILDO NASCIMENTO DERGAN**

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO POLIQUETA *NAMALYCASTIS ABIUMACOMO*  
FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LOCAIS COM DISTINTOS  
HISTÓRICOS DE CONTAMINAÇÃO NO ESTUÁRIO GUAJARINO, BELÉM (PA).**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Oceanografia do  
Instituto de Geociências da Universidade  
Federal do Pará-UFPA, em cumprimento às  
exigências para obtenção do grau de  
Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian Lund Amado

**BELÉM**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Dergan, Antônio Leonildo Nascimento

Biomarcadores bioquímicos no poliqueta *namalycastis abiuma* como ferramentas para avaliação da qualidade de locais com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, Belém (Pa) / Antônio Leonildo Nascimento Dergan; Orientadora: Lílian Lund Amado – 2013

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em oceanografia) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Geociências, Faculdade de Oceanografia, Belém, 2013.

1. Estuários. 2. Biomonitoramento. 3. Estresse oxidativo. I. Amado, Lílian Lund, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD 22ª ed.: 551.4618

---



**ANTÔNIO LEONILDO NASCIMENTO DERGAN**

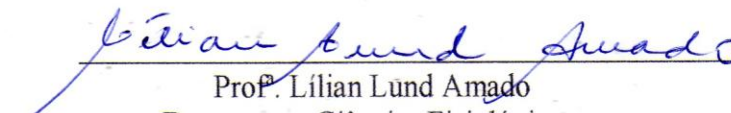
**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO POLIQUETA *NAMALYCASTIS*  
*ABIUM* COMO FERRAMENTAS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE  
AMBIENTAL DE LOCAIS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE  
CONTAMINAÇÃO NO ESTUÁRIO GUAJARINO, BELÉM (PA).**

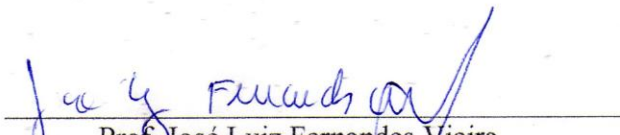
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Oceanografia do  
Instituto de Geociências da Universidade  
Federal do Pará- UFPA, em cumprimento às  
exigências para obtenção do grau de  
Bacharel em Oceanografia.

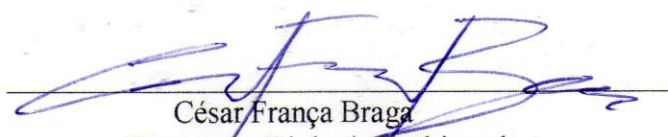
Data de aprovação: 15 / 02 / 2013

Conceito: EXCELENTE

Banca Examinadora:

  
Prof. Lillian Lund Amado  
Doutora em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Pará

  
Prof. José Luiz Fernandes Vieira  
Doutor em Toxicologia  
Universidade Federal do Pará

  
César França Braga  
Doutor em Biologia Ambiental  
Universidade Federal do Pará

*À minha Mãezona,  
minha grande e eterna heroína.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o final de uma etapa muito divertida, em que o trabalho se torna sua diversão e vice-versa. Isso é Oceanografia! Tive o prazer de partilhar bons momentos com grandes *personagens*, que com certeza me ensinaram muito. A eles devo toda minha gratidão, pois cada um contribuiu de forma singular para a concretização do meu sonho. E a eles agradeço agora:

Ao meu bom Deus, pela saúde durante desta etapa. E por ter cuidado de mim mesmo quando eu não cuidava.

Às meninas de casa: Ivanilde, Jéssica e Joyce. Os olhos que tudo vêem na minha vida (a lá Sauron fugia como um hobbit). Seu apoio e incentivo foram essenciais!

À minha Princesa, Dayana Mesquita, pelo seu amor, amizade e incentivo mesmo quando “ser” um oceanógrafo não passava de um sonho.

À minha orientadora Lílían Amado, pela oportunidade de participação no seu trabalho. Mais ainda pelos seus ensinamentos, *puxões de orelha*, sua paciência, e, sobretudo por sua amizade.

Ao Prof. José Souto, por abrir as portas do Bentos para realizarmos este trabalho, e até mesmo quando não tinha nada pra fazer.

À minha ex-parceira e grande amiga Thaís Cassiano, pelo apoio e pelas brincadeiras que me faziam rir durante o nosso aprendizado da ecotoxicologia.

Às crianças da casa da Lílían: Cléverson e Ronny, por darem aquela força de Jah nas amostragens.

Aos constantes estudantes do bentos: Daiane, Roseanne, Virág, César, Álvaro e Yuri, por nos ajudarem muito nas coletas e triagem de material. Agradeço também pelas conversas sempre construtivas.

Ao Laboratório de Análises Químicas/IG/UFPA, pelo espaço durante a padronização dos biomarcadores.

Ao Laboratório de Oc. Química/IG/UFPA, pelo espaço em momentos turbulentos à procura de espectrofotômetro.

Ao Prof. José Luiz Vieira, por nos receber no Laboratório de Toxicologia/UFPA de braços bem abertos quando tudo ficou ainda mais **preto**.

À Prof.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro, por ajudar bastante cedendo o espaço do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia/UFPA.

À equipe do BIOPAQ: Dani, Thamyris, Tamirys, Thaiane, Carla, Carol, John e Sarita pelo apoio durante a preparação para a defesa. Muito obrigado mesmo!

Aos amigos da Turma de 2009: Andrey, Luisa, Fabíola, Wilson, Priscila Valéria, Cíntia, Jônatas, Pablo, Ellery, Lory e Shirlen, que me acolheram e ajudaram no percurso da graduação.

Aos amigos Malandro, Raque, Esther, David, Kleper, Simão, Frejat, Tuca e John, por sua amizade e pelos momentos de distração quando mais precisava. E até quando não precisava.

Aos professores do curso de Oceanografia, por se esforçarem pelo desenvolvimento da ciência na Amazônia.

A CAPES e FAPESPA, pelo financiamento do projeto e também pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À Universidade Federal do Pará, pela utilização de seu espaço físico e apoio em eventos.



**EPÍGRAFE**

*“O mar que chama todas as coisas, chama-me também e tenho de embarcar.”*

*Khalil Gibran*

## RESUMO

Os organismos do estuário Guajarino têm sofrido uma intensa pressão por causada proximidade com a cidade de Belém. Diariamente, uma grande quantidade de compostos antropogênicos são lançados neste ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade ambiental de sítios da baía de Guajará com distintos históricos de contaminação, do ponto de vista biológico, utilizando o poliqueta *Namalycastis abiuma* como organismo biomonitor. Os locais escolhidos para o estudo foram o Canal do Una e Terminal portuário de Miramar, pontos com considerável histórico de contaminação orgânica e por metais. Como ambiente referência a região escolhida foi a desembocadura do Rio Guamá, considerado um ponto não poluído deste estuário. Os poliquetas foram coletados em todos os ambientes de estudo com o auxílio de uma draga de Petersen ao longo de um ano, em cada um dos períodos climáticos da região (período seco, seco-chuvoso, chuvoso, chuvoso-seco e seco). Foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e a capacidade antioxidante total (TEAC) como biomarcadores de exposição e a lipoperoxidação (LPO) como biomarcador de efeito. Os poliquetas de todos os pontos amostrados tiveram um aumento da capacidade antioxidante total (TEAC) no período chuvoso, sugerindo uma resposta ao aumento da quantidade e/ou qualidade de matéria orgânica carregada para o estuário e consumida como alimento. Houve uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes nos poliquetas de Una (CAT e GST) e Miramar (CAT) em relação ao Guamá no período chuvoso e chuvoso-seco, o que pode estar relacionado à exaustão das defesas antioxidantes em função da exposição prolongada a poluentes, que provavelmente são carregados pelas chuvas. O efeito de diminuição da atividade dessas enzimas foi observado no período chuvoso-seco, quando o dano oxidativo (LPO) foi maior nos animais do Una e Miramar. Os organismos do Guamá mostraram maior capacidade de enfrentar insultos oxidativos, apresentando um aumento sazonal dos biomarcadores de exposição CAT, GST e TEAC influenciados pelos níveis de chuvas (período chuvoso e chuvoso-seco). Os organismos do ambiente referência apresentaram um aumento transiente da lipoperoxidação durante o período chuvoso, ocasionado provavelmente pelo aumento do metabolismo oxidativo durante este período de maior oferta alimentar, mas que retorna ao nível basal após esse período. Diante das dificuldades para caracterizar os efeitos danosos da poluição crescente no estuário Guajarino, pode-se destacar que este estudo pioneiro contribuiu para os

efeitos biológicos da contaminação, particularmente sobre o status oxidativo das populações de *N. abiuma* encontradas em pontos contaminados, bem como o papel das chuvas como a principal forçante que potencializa os efeitos da poluição.

Palavras-chave: Estuários. Biomonitoramento. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Guajará estuary organisms have been suffering an intense stress due proximity to Belém city. Daily, large amounts of untreated anthropogenic compounds are released in this environment. This study aims to evaluate, from a biological point of view, the environmental quality of different sites along Guajará Bay using the polychaete *Namalycastis abiuma* as abiomonitor organism. Study area included Una Channel and Miramar port, which are characterized as organic and metal contaminated sites. Guamá River represents the reference site, with a lack of direct contamination. In each site, during a period of 1 and a half year with different climatic stations (dry season, intermediary dry-rainy, rainy season, intermediary rainy-dry and dry season), polychaetes were collected with a Petersen's dredge. We analyzed the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) and total antioxidant potential (TEAC) as exposure biomarkers and lipoperoxidation (LPO) as effect biomarker. The polychaetes from all sampled points had an increase in total antioxidant potential (TEAC) in rainy season, probably as a response to elevated amount and/or quality of organic matter transported to estuary in this period. A reduction on antioxidant enzymes activity was observed during rainy and rainy-dry seasons in worms from Una (CAT and GST) and Miramar (enzyme CAT) compared to reference organisms. These results can be related to the exhaustion of antioxidant defenses in function to extended exposure to pollutants. The effect of the reduction in these enzymes activities was observed in rainy-dry season, when the polychaetes from both contaminated sites showed higher oxidative damage (LPO) than animals from reference site. Worms collected in Guamá river showed a higher capacity to cope with oxidative insults than organisms from polluted sites. They presented a seasonal increase in exposure biomarkers CAT, GST e TEAC that was also associated with the rainfall levels. These worms exhibited a transient state of elevated lipoperoxidation in the rainy season, which can be related to the augmented oxidative metabolism during this period of higher food availability. We can emphasize that this pioneer study helps to elucidate the biological effects of contamination, particularly on oxidative status of the *N. abiuma* inhabiting contaminated sites, such as the role of rainfall as a major force that potentiates the effects of pollution.

Keywords: Estuaries, biomonitoring, oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Esquema da redução do oxigênio a água durante a respiração aeróbica ( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ). Quando o oxigênio recebe elétrons que escapam de reações redox ou é reduzido por oxidases ocorre a formação de EROs ..... | 18 |
| Figura 2: Sistema de defesa antioxidante que atua de forma conjunta na proteção das células contra danos oxidativos. ....                                                                                                                          | 20 |
| Figura 3: Reações de lipoperoxidação.....                                                                                                                                                                                                          | 21 |
| Figura 4: Localização da área de estudo. P1- Ponto referência; P2- Ponto do Una e P3- Ponto de Miramar.....                                                                                                                                        | 27 |
| Figura 5: Chuva acumulada mensal x número de dias com chuva de janeiro a dezembro de 2010 na cidade de Belém/PA. ....                                                                                                                              | 30 |
| Figura 6: Chuva acumulada mensal x número de dias com chuva, de janeiro a dezembro de 2011 na cidade de Belém/Pará. ....                                                                                                                           | 30 |
| Figura 7: Atividade da catalase nos poliquetas da espécie <i>Namalycastis abiuma</i> coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento. ....                             | 31 |
| Figura 8: Atividade da glutathione S-transferase nos poliquetas da espécie <i>Namalycastis abiuma</i> coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento.....             | 32 |
| Figura 9: Capacidade antioxidante total nos poliquetas da espécie <i>Namalycastis abiuma</i> coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento. ....                     | 34 |
| Figura 10: Lipoperoxidação nos poliquetas <i>Namalycastis abiuma</i> coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento. ....                                             | 35 |

## Sumário

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO .....</b>                                                                    | <b>15</b> |
| 1.1ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....                                                       | 17        |
| 1.2SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE .....                                                      | 19        |
| 1.3DANOS OXIDATIVOS .....                                                                    | 20        |
| 1.4ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS EM POLIQUETAS NEREIDÍDEOS.....                                   | 22        |
| 1.5ÁREA DE ESTUDO.....                                                                       | 23        |
| <b>1.5.1 Clima .....</b>                                                                     | <b>24</b> |
| <b>1.5.2 Parâmetros oceanográficos.....</b>                                                  | <b>24</b> |
| <b>1.5.3 Parâmetros físico-químicos .....</b>                                                | <b>25</b> |
| 1.6OBJETIVOS .....                                                                           | 26        |
| <b>1.6.1 Objetivo geral .....</b>                                                            | <b>26</b> |
| <b>1.6.2 Objetivos específicos .....</b>                                                     | <b>26</b> |
| <b>2.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                            | <b>26</b> |
| 2.1 AMOSTRAGEM .....                                                                         | 26        |
| 2.2 PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO .....                                                       | 28        |
| <b>2.2.1 Determinação de proteínas totais.....</b>                                           | <b>28</b> |
| <b>2.2.2 Análise da atividade da catalase (CAT) .....</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>2.2.3 Análise da atividade da glutathione S-transferase (GST) .....</b>                   | <b>28</b> |
| <b>2.2.4 Capacidade antioxidante total.....</b>                                              | <b>29</b> |
| <b>2.2.5 Determinação da lipoperoxidação (LPO).....</b>                                      | <b>29</b> |
| <b>2.2.6 Análise estatística .....</b>                                                       | <b>29</b> |
| <b>3.RESULTADOS.....</b>                                                                     | <b>30</b> |
| 3.1 PRECIPITAÇÃO .....                                                                       | 30        |
| 3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....                                              | 31        |
| 3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST).....                             | 32        |
| 3.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....                                                      | 33        |
| 3.5. DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO) .....                                             | 34        |
| <b>4.DISSCUSSÃO .....</b>                                                                    | <b>37</b> |
| 4.1 CICLO DE BIOMONITORAMENTO.....                                                           | 37        |
| 4.2 PERÍODOS PLUVIOMÉTRICOS .....                                                            | 39        |
| <b>5.CONCLUSÃO .....</b>                                                                     | <b>44</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                     | <b>46</b> |
| ANEXOS.....                                                                                  | 52        |
| ANEXO A- PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO FOX MODIFICADO PARA O POLIQUETA<br>NAMALYCASTIS ABIUMA ..... | 53        |

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente estuarino, por suas próprias características, impõe condições estressantes para os organismos que o habitam, fazendo com que tenham que adquirir muitas estratégias de osmorregulação, defesa ou aclimatização, como adaptações fisiológicas sazonais e relações mutualísticas. Esta situação também pode alterar sua sensibilidade a muitos poluentes (MONSERRAT et al., 2007). Como exemplo de condições estressantes no estuário Guajará pode-se citar o seu forte regime hidrodinâmico, dividido entre as variações sazonais do regime pluviométrico e os ciclos diários das marés, que controlam as mudanças nas propriedades físico-químicas, concentração de material particulado em suspensão e a distribuição dos bancos lamosos e arenosos ao longo da baía (PINHEIRO, 1987).

A Baía do Guajará tem sofrido um enriquecimento orgânico antrópico que está favorecendo a bioestimulação das comunidades macrobentônicas (AVIZ et al., 2012), e possivelmente causando impactos em níveis de menor organização biológica. Associados às condicionantes hidrodinâmicas, os sedimentos da Baía de Guajará têm apresentado valores elevados de metais pesados antropogênicos, principalmente chumbo, como resultado do escoamento dos canais que cortam a cidade e que conduzem esgotos *in natura* e efluentes industriais para esse corpo d'água. Enquanto que os sedimentos do Rio Guamá não apresentam concentrações de metais que ofereçam risco imediato ao bem estar dos organismos bentônicos (NASCIMENTO, 2007).

Estes impactos em nível de menor organização biológica podem se apresentar como modificações na estrutura e funcionalidade de componentes essenciais à célula. Deste modo, as variações induzidas por compostos químicos que não ocorrem naturalmente em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas e/ou funções podem ser determinadas em sistemas biológicos ou amostras, sendo denominadas de biomarcadores (DEPLEDGE et al., 1995).

A partir da resposta dos biomarcadores pode-se inferir se o organismo está sendo exposto a algum tipo de contaminante (biomarcador de exposição), e se a concentração e/ou o tempo de exposição tem causado danos a algum componente do organismo (biomarcador de efeito). Assim, a avaliação de biomarcadores bioquímicos em organismos residentes em ambientes impactados fornece sinais de possíveis alterações nos ecossistemas gerados pelo estresse ambiental ou antrópico, auxiliando na prevenção de eventuais danos em níveis de organização

biológica superiores, como populações, comunidades e ecossistemas (MARKERT et al., 2003).

Grande parte dos xenobióticos que podem causar efeitos danosos em organismos são metais de transição, como ferro e cobre, que podem induzir a formação de substâncias tóxicas ao entrarem em contato com o oxigênio. São comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (HERMES-LIMA, 2004). As EROs também são geradas naturalmente pelo escape de elétrons durante a síntese mitocondrial de ATP, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas. Em concentrações baixas, são utilizadas na sinalização celular (mensageiros celulares) e têm ação anti-microbiana via NADPH oxidase de células fagocíticas, bem como no crescimento e proliferação celular normal (RICE-EVANS; BURDON, 1994).

Outra importante fonte de EROs é a metabolização de xenobióticos orgânicos pelo citocromo P-450, uma grande família de enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de substratos endógenos e exógenos. Esse processo normalmente torna-os mais solúveis e facilita sua excreção, porém a hidroxilação de alguns xenobióticos converte-os em substâncias mais tóxicas, subvertendo o sistema de detoxificação pelo aumento da produção de EROs.

Para garantir que o balanço entre produção e eliminação destas espécies permaneça em um nível estacionário, os organismos adquiriram um complexo sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Entre as defesas enzimáticas podemos destacar enzimas que atuam na degradação de EROs, como a catalase; aquelas atuam na detoxificação de metabólitos reativos ou xenobióticos, como a glutatona S-transferase; e enzimas que atuam na reciclagem de co-substratos essenciais, como a glutatona redutase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Assim, sob condições normais, o metabolismo celular produz e elimina concentrações estáveis de EROs. Mas quando há mudanças induzidas pelo contato com contaminantes e/ou variações ambientais, levando a um aumento na concentração de EROs, diminuição da capacidade antioxidante e alteração da sinalização redox celular, ocorre uma situação chamada de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011).

Contudo, os principais sistemas tiol/dissulfeto na célula (glutatona oxidada e reduzida, tioredoxina-1 e cisteína/cistina) não estão em equilíbrio redox e respondem de forma diferente a compostos tóxicos e estímulos fisiológicos. Então, do ponto de vista mecanístico, o estresse



oxidativo pode ser mais bem definido como uma desorganização do controle e da sinalização redox celular (JONES, 2006).

Uma vez que muitos poluentes precipitam, acumulando-se e modificando as características físico-químicas do sedimento (NASCIMENTO et al., 2006), animais bentônicos como o poliqueta *Namalycastis abiuma*, expostos diretamente a essa contaminação, podem ser utilizados como organismos biomonitores na avaliação da qualidade do ambiente onde vivem. A exposição a contaminantes pode influenciar a resposta do sistema de defesa antioxidante desses animais, favorecendo a produção de pró-oxidantes e expondo-os a uma situação de estresse oxidativo. Tal resposta indica antecipadamente os efeitos danosos da contaminação ambiental sobre os organismos que habitam os ambientes estudados.

Este estudo é pioneiro na utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no poliqueta estuarino *N. abiuma* como ferramentas para avaliar a qualidade ambiental da baía de Guajará e rio Guamá. Esse esforço consiste na identificação dos padrões do sistema de defesa antioxidante deste organismo bentônico, analisando a influência de um gradiente de poluição e da sazonalidade em suas respostas antioxidantes e de dano oxidativo, ao longo de um ano de coletas bimestrais.

### 1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

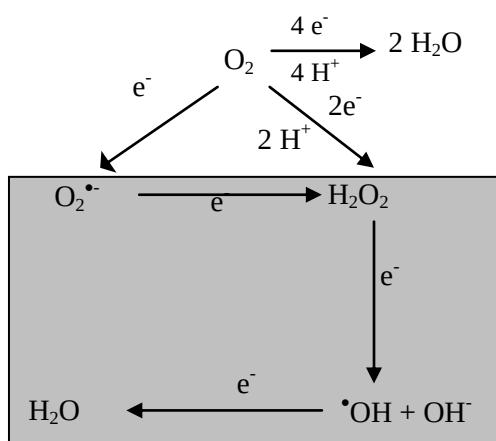
A acumulação de oxigênio na atmosfera primitiva da Terra e nos corpos d'água pode ter fornecido uma forte pressão de seleção para os organismos que adquiriram a capacidade de utilizar o oxigênio em seu metabolismo, assim como para aqueles que foram capazes de lidar com os subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico (HERMES-LIMA, 2004).

O oxigênio pode ser reduzido completamente à  $H_2O$  (Fig.1) durante a respiração mitocondrial pela enzima citocromo oxidase, que é um passo chave no mecanismo de formação aeróbica de ATP nas mitocôndrias. Contudo, o oxigênio pode receber elétrons que escapam da cadeia transportadora, sofrendo uma redução monoeletrônica, a qual resulta na formação de várias espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem causar danos a componentes celulares (LUSHCHAK, 2011).

Segundo Hermes-Lima (2004), de 0.1 a 0.4% de todo o oxigênio consumido nas mitocôndrias produz EROs, principalmente o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Outra fonte relevante de  $O_2^{\bullet-}$  inclui as atividades de oxidáveis solúveis (ex. xantina oxidase, aldeído oxidase), NADPH oxidase nas membranas celulares de fagócitos, e a auto-oxidação de pequenas moléculas. Outra espécie reativa de oxigênio é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que

é formado pela dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  (espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase) ou pelo sistema de oxidases de função mista durante a detoxificação de xenobióticos.

Figura 1: Esquema da redução do oxigênio a água durante a respiração aeróbica ( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2 H_2O$ ). Quando o oxigênio recebe elétrons que escapam de reações redox ou é reduzido por oxidases ocorre a formação de EROs. Símbolos:  $e^-$  - elétron;  $O_2^{\bullet-}$  - radicalânion superóxido;  $\bullet OH$  - radical hidroxila;  $OH^-$  - ânion hidroxila;  $H_2O_2$  - peróxido de hidrogênio. Este último ainda pode gerar radical hidroxila, através da reação de Haber-Weiss ( $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$ ). O radical hidroxila e o radical ânion superóxido são dois radicais livres altamente reativos, produzidos ao longo desta sequência de reações.



Fonte: Modificado de (NEWMAN, 2009).

Estas oxidases de função mista (ex. sistema citocromo P450) estão envolvidas principalmente na etapa inicial da biotransformação de xenobióticos orgânicos, que envolve a oxidação, hidrólise, hidratação ou redução desses compostos, permitindo o aumento de sua polaridade. Após esta etapa inicial, os compostos normalmente passam pelo segundo estágio da biotransformação, na qual são conjugados a uma molécula endógena que permite um aumento do peso molecular suficiente para garantir sua excreção.

$O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  têm baixa toxicidade em comparação com o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), o qual pode ser convertido a partir destas espécies via reação de Fenton ou reação de Haber-Weiss. Estas reações podem ser catalisadas por íons de cobre, ferro, cromo e mercúrio (LUSHCHAK, 2011), e a acumulação destes metais pode alterar e degradar processos de ativação enzimática (GERACITANO et al., 2004a).

$\bullet OH$  é uma das espécies mais reativas conhecidas, pois atinge um componente celular logo após sua produção. Este radical está envolvido no início da cadeia de lipoperoxidação em membranas biológicas, reagindo principalmente com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA),

mas também pode causar danos oxidativos a proteínas, DNA nuclear e DNA mitocondrial (HERMES-LIMA, 2004).

## 1.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

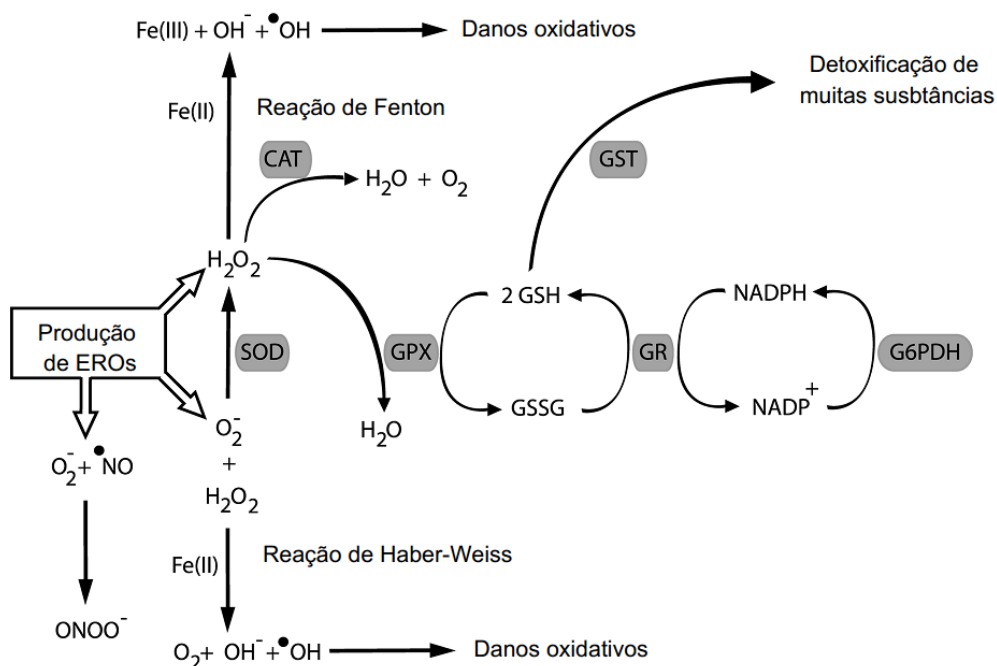
Como a eficiência energética favorece a manutenção do oxigênio comoceptor final dos elétrons durante a síntese mitocondrial do ATP, os organismos aeróbicos desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático) que atua na degradação, detoxificação ou interceptação das espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem ser produzidas, prevenindo as células de danos oxidativos (HERMES-LIMA, 2004).

As principais defesas enzimáticas contra as EROs (Fig. 2) incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatinoxidase (GPx) e glutatona S-transferase (GST). A SOD catalisa a dismutação de  $O_2^{\cdot -}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ . A CAT e a GPx catalisam a decomposição de  $H_2O_2$ . A GST constitui uma grande família de enzimas de fase II envolvidas na conjugação de xenobióticos e produtos aldeídicos da lipoperoxidação usando o tripeptídeo glutatona na sua forma reduzida (GSH), tornando-os mais polares e mais facilmente removíveis do ambiente intracelular (HERMES-LIMA, 2004). Os antioxidantes não enzimáticos compreendem compostos que podem se doar para oxidação em vez de componentes celulares importantes, como a glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico, carotenóides, retinol e  $\alpha$ -tocoferol (LUSHCHAK, 2011).

A GSH é um tripeptídeo de grande importância na proteção contra danos oxidativos, por atuar como sequestradora de radicais livres ou como co-substrato de enzimas antioxidantes. A enzima glutatinoxidase (GR) recicla a GSH, convertendo-a da forma oxidada (GSSG) de volta para a forma reduzida usando a nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como agente redutor.

O sistema de defesa antioxidante enzimático trabalha de maneira organizada. Se há um aumento crônico na formação de  $H_2O_2$  em uma célula, as enzimas CAT e/ou GPx irão decompor esta espécie para reduzir os níveis intracelulares até alcançar a concentração estável anterior. Contudo, se a formação de  $H_2O_2$  alcançar uma condição aguda, onde uma maior concentração for estabelecida, as células irão aumentar a biossíntese de enzimas (GPx e CAT) para aumentar a capacidade de decomposição do  $H_2O_2$  (HERMES-LIMA, 2004).

Figura 2: Sistema de defesa antioxidante que atua de forma conjunta na proteção das células contra danos oxidativos. As abreviações SOD, CAT, GST, GR, GPx e G6PDH representam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona S-transferase, glutationaredutase, glutatona peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente.



Fonte: Adaptado de HERMES-LIMA, 2004.

Os níveis normais de antioxidantes são mantidos pelo balanço entre a sua síntese/absorção, transporte, metabolização, inativação e excreção e representam a capacidade antioxidante total dos organismos em lidar com subprodutos tóxicos do oxigênio. Alguns antioxidantes como tocoferol e carotenóides são obtidos por animais aquáticos pela alimentação, enquanto outros como a GSH e enzimas antioxidantes são produzidos endogenamente. Sua produção usualmente corresponde à necessidade dos organismos e está sujeita a regulação ativa (LUSHCHAK, 2011).

### 1.3 DANOS OXIDATIVOS

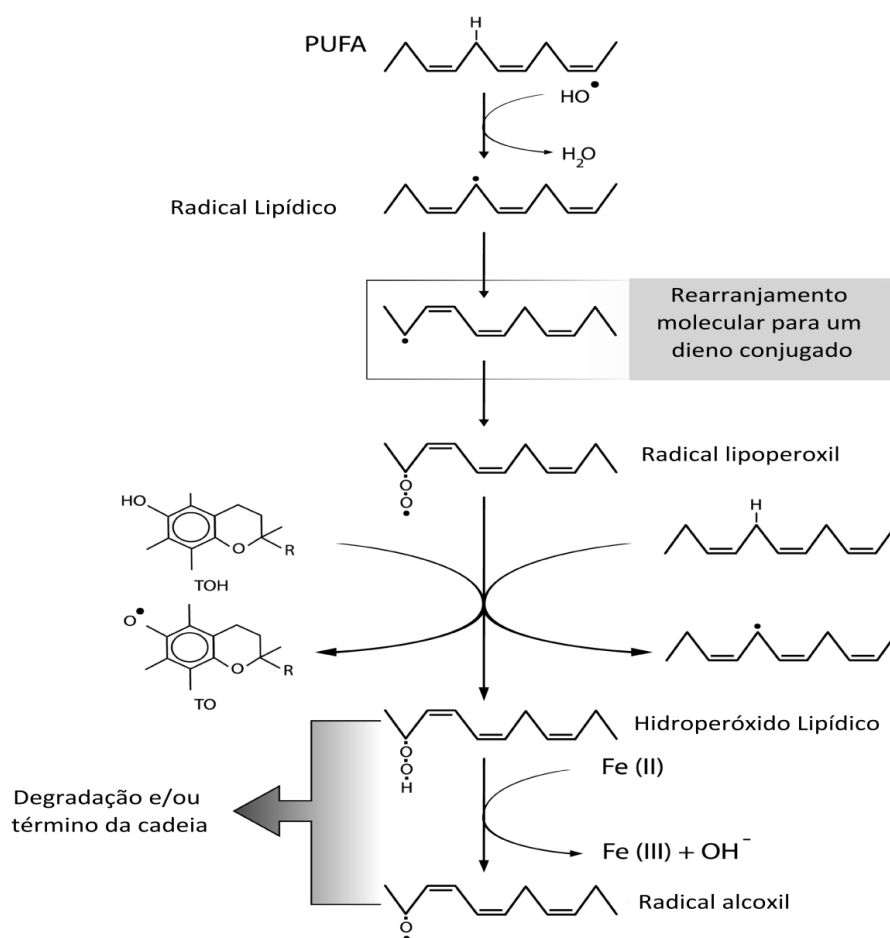
A exposição a uma grande quantidade de xenobióticos ou a bioativação de metabólitos reativos com maior toxicidade pode causar depleção dos antioxidantes celulares ou alteração da sinalização e do controle redox, causando danos a componentes celulares. Esta situação é chamada de estresse oxidativo, e pode ser definida como o distúrbio entre as concentrações de EROs e a capacidade das defesas antioxidantes, favorecendo os primeiros (MONSERRAT et al., 2007).

Os danos induzidos por EROs em carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas podem alterar a função de macromoléculas nas células, tecidos e órgãos. Estas perturbações

induzem danos e respostas adaptativas celulares que aumentam as defesas antioxidantes e mecanismos de reparo (ex. reparo de DNA) (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

A oxidação de lipídeos, comumente chamada de lipoperoxidação, ocorre numa reação em cadeia em muitas vezes é catalisada por metais em transição (HERMES-LIMA, 2004). Estes oxidantes causam o colapso da membrana fosfolipídica e, inclusive, formam intermediários reativos que podem continuar a reação em cadeia (Fig. 3).

Figura 3: Reações de lipoperoxidação. PUFAs- ácidos graxos poli-insaturados (inglês polyunsaturated fatty acids).



Fonte: Adaptado de HERMES-LIMA, 2004.

A intensidade da lipoperoxidação pode ser avaliada a partir de seus produtos primários, peróxidos lipídicos e dienos conjugados, e/ou dos produtos finais como malondialdeído e outros aldeídos. O aumento da lipoperoxidação é frequentemente o primeiro efeito da geração elevada de EROs, mas um aumento nas defesas antioxidantes, como na atividade da GST, pode causar o retorno do nível de produtos oxidados ao estado inicial (GERACITANO et al., 2004a; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

As proteínas também podem ser danificadas por vários mecanismos mediados por EROs, produtos da lipoperoxidação e oxidação de açúcares (principalmente aldeídos, formando adutoscarbonilados com proteínas), metabólitos derivados de óxido nítrico e sistemas de oxidação de metais (HERMES-LIMA, 2004). O radicalânion superóxido é capaz de inativar enzimas, incluindo a aconitase (por reduzir o  $\text{Fe}_3^+$  na molécula enzimática e causar liberação do íon ferro) e outras desidratases contendo cluster [Fe – S] (HERMES-LIMA, 2004).

#### 1.4 ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS EM POLIQUETAS NEREIDÍDEOS

Os estudos ecotoxicológicos utilizando organismos biomonitores, residentes em locais poluídos ou contaminados, têm se mostrado bastante eficazes no diagnóstico da saúde de diversos ambientes aquáticos. Dentre os organismos mais utilizados podem-se destacar os poliquetas da família Nereididae (MONSERRAT et al., 2007; LEWIS e WATSON, 2012). As espécies de nereidídeos são muito abundantes em ambientes com grande estresse ambiental e formação de bancos compostos por sedimentos finos, como os estuários, por apresentarem mecanismos de adaptação às condições hidrodinâmicas e físico-químicas destes locais e se beneficiarem da acumulação de depósitos de superfície e subsuperfície (ALMEIDA, 2008. AVIZ et al., 2012).

As populações de nereidídeos alternam a dominância nos substratos lamosos do estuário Guajarinó com populações de oligoquetas, tendo maiores densidades nos locais não impactados, ao contrário do segundo grupo. Os nereidídeos são mais abundantes no período menos chuvoso devido a entrada de águas mais salinas, enquanto que os oligoquetas são beneficiados pela maior influência fluvial e acúmulo de matéria orgânica no período chuvoso (AVIZ et al., 2012).

As características de acumulação da matéria orgânica, sulfetos e poluentes desses substratos lamosos impõem a existência de um complexo sistema antioxidante nestes organismos, para contrabalancear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os nereidídeos podem ser expostos a grandes concentrações de sulfetos, o que cria um alto risco de geração excessiva de radicais devido ao metabolismo desse composto (semelhante a episódios de hipoxia e re-oxigenação), e ainda pode ser potencializado pela exposição destes organismos a pró-oxidantes que podem estar acumulados e adsorvidos nos sedimentos (ABELE-OESCHGER; OESCHGER, 1995; ABELE-OESCHGER, 1996).

O poliqueta *Namalycastis abiuma* se destaca como organismo potencial para a avaliação ecotoxicológica pela sua atividade de bioturbação, que é reconhecida como controladora dos fluxos bentônicos de oxigênio dissolvido e nutrientes. A bioturbação também pode afetar os

efeitos de contaminantes nos organismos bentônicos devido à alteração de seu transporte, destino e biodisponibilidade. Panget et al. (2012) observaram em um estudo de microcosmos que oligoquetas (*Lumbriculus variegatus*) aumentaram a ressuspensão de sedimentos e daí de contaminantes associados, influenciando a toxicidade de hidrocarbonetos em anfípodas (*Hyalella azteca*) que são mais sensíveis a esses compostos.

Várias alterações morfológicas e fisiológicas têm sido registradas em anelídeos expostos natural ou experimentalmente a diferentes poluentes, os quais induzem efeitos potenciais nas respostas antioxidantes e de estresse oxidativo (MONSERRAT et al., 2007).

O nereidídeo *Laeonereis acuta*, por exemplo, apresenta um gradiente na atividade enzimática ao longo das regiões anterior, média e posterior, exibindo maior atividade antioxidante contra radicais hidroxil e peroxil na região posterior do corpo. Uma explicação possível para este gradiente antioxidante se dá pela menor quantidade de cutícula secretada nesta região, expondo estes organismos a maiores concentrações de oxigênio e até peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ambiental. Outra possibilidade é a existência de um gradiente de lipídeos insaturados, diminuindo as concentrações de alvos para as EROs na região posterior (ROSA et al., 2005a. FERREIRA-CRAVO et al., 2007).

Moraes et al. (2006) observaram que *L. acuta* também apresenta defesas antioxidantes no muco secretado pela epiderme, as quais podem ser moduladas pela presença de bactérias com defesas antioxidantes adicionais que colonizam a secreção de muco. Tais autores expuseram o poliqueto em laboratório ao  $H_2O_2$ , e evidenciaram que aqueles com a presença de mucotiveram uma redução significativa na produção de EROs e de danos oxidativos ao DNA, quando comparados aos expostos sem a presença de muco. Concluíram, desta forma, que se ocorrer uma produção de muco suficiente para a colonização de um grupo de bactérias, pode-se estabelecer uma relação mutualística entre as bactérias e este poliqueto, o que contribui com o sistema antioxidante destes animais através do auxílio na interceptação e degradação de  $H_2O_2$ , radicais hidroxil e peroxil.

### 1.5 ÁREA DE ESTUDO

A Baía do Guajará e Rio Guamá são os corpos d'água mais expressivos no entorno da Cidade de Belém, e em conjunto formam o estuário Guajarino. Confluem para desembocar no estuário do Rio Pará e ainda estão inseridos no grande estuário do Rio Amazonas (PINHEIRO, 1987).

A cidade de Belém tem aproximadamente 1,4 milhões de habitantes (IBGE, 2010), dos quais cerca de 30% vivem em áreas periféricas inundadas (AVIZ et al., 2012). A produção de esgoto é de aproximadamente 274,5 milhões de litros por dia, sendo que apenas 8% correm sobre o sistema de coleta e menos de 3% recebem tratamento prévio (IBGE, 2008<sup>1</sup> *apud* AVIZ et al., 2012). O principal corpo receptor dos esgotos é a Baía do Guajará, recebendo um volume diário de 18.294 m<sup>3</sup>/dia a partir da estação de bombeamento de esgotos do Una (COHAB, 1997).

A região do Terminal Petrolífero de Miramar se destaca como um ambiente com grande potencial impactante devido à contaminação por hidrocarbonetos. Oliveira (2009) encontrou uma redução na relação chumbo antropogênico/natural relacionada à atividade do porto de Miramar, pois os derivados de petróleo tem potencial de disseminação de Pb para o ambiente, podendo torná-lo biodisponível.

### **1.5.1Clima**

O clima da área de estudo é do tipo “Af”, floresta tropical úmido sem estação fria, de acordo com a classificação de Köppen (PINHEIRO, 1987). Existem quatro períodos climáticos baseados na redução do regime pluviométrico: um período mais chuvoso, que por sua vez é dividido em chuvoso (Janeiro a Março) e chuvoso-seco (Abril a Junho), o qual representa 73,2% da precipitação anual; e um período menos chuvoso, dividido em seco (Julho a Setembro) e seco-chuvoso (Outubro a Dezembro), que representa 26,8% da precipitação anual (OLIVEIRA et al., 2002).

A umidade relativa é elevada, com valores acima de 80% em todos os meses do ano, alcançando valores próximos a 90% no trimestre mais chuvoso (MORAES et al., 2005). A elevada umidade favorece a formação de nuvens de convecção, e a influência de fenômenos de meso e grande escala (como a Zona de Convergência Intertropical) alteram os regimes pluviométricos (ALMEIDA et al., 2002).

### **1.5.2Parâmetros oceanográficos**

O estuário do Guajará é do tipo rio com influência de maré, que apresenta valores muito baixos de salinidade mesmo no período seco (GREGÓRIO; MENDES, 2009).

A maré leva cinco horas para atingir a preamar, e oito horas para atingir a baixa-mar. Essa desigualdade é ocasionada pelo efeito da maré dinâmica e pela configuração do estuário, que

---

<sup>1</sup> IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Brasil, Brasília.



represa o escoamento em direção ao mar durante a vazante. Nos períodos de maré de sizígia as velocidades médias máximas são observadas três horas após a estofa da baixa-mar, a um metro da superfície, e três horas e meia após a estofa de preamar (GREGÓRIO, 2008).

Os ventos predominantes nesta área são do tipo “terral” (Leste) que duram até o início da tarde, e do tipo “geral” (Norte-Nordeste) que duram até o início da noite. As ondas formadas por esses ventos podem alcançar 1 metro, dependendo da sua duração, intensidade e velocidade; e exercem um importante papel erosivo nas margens da Baía de Guajará (PINHEIRO, 1987).

### **1.5.3 Parâmetros físico-químicos**

No estuário do Guajará, a sazonalidade do regime pluviométrico e o ciclo das marés são os principais fatores controladores da variação das propriedades físico-químicas e da concentração de material particulado em suspensão (PINHEIRO, 1987).

Os grandes volumes de água descarregada, as turbulências causadas pelos ventos e as correntes de marés tornam o estuário estudado termicamente bastante homogêneo (Cordeiro, 1987). A variação anual da temperatura é de 1 a 3°C (AQUINO, 2011. AVIZ et al., 2012).

O pH e a condutividade nas regiões mais próximas à cabeceira do estuário são maiores na estação seca (respectivamente 5,7 e 185,1  $\mu\text{S}$ ) do que na estação chuvosa (respectivamente 5,4 e 32,9  $\mu\text{S}$ ), e aumentam quanto mais próximo dos pontos impactados (AVIZ et al., 2012). Os valores médios de salinidade são de 0,1‰, sendo o mínimo de 0‰ no período chuvoso e o máximo de 0,8‰ no período seco. Estes valores de salinidade permitem classificar as águas da maior parte das áreas da baía do Guajará como doces, segundo a resolução CONAMA 357/2005 (ROSA-FILHO et al., 2011).

As concentrações de fósforo, compostos nitrogenados e a demanda bioquímica de oxigênio (oxigênio consumido) são maiores na estação chuvosa, e nas proximidades das fontes de esgoto (AVIZ et al., 2012).

As concentrações de material em suspensão apresentam maiores variações ao longo do ciclo da maré, do que ao longo do ano. As variações vão de 100 mg/L no período seco a 115 mg/L no período chuvoso (PINHEIRO, 1987). Os maiores valores de turbidez no período chuvoso são decorrentes da erosão das margens ocasionada pela chuva e do aumento de efluentes trazidos dos canais (ROSA-FILHO et al., 2011).

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade ambiental de pontos do estuário Guajarino (Belém/PA) com distintos históricos de contaminação utilizando biomarcadores de exposição e de efeito no poliqueta *Namalycastis abiuma*, bem como as modificações espaço-temporais destes biomarcadores ao longo de um ano.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a atividade enzimática dos biomarcadores de exposição catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), comparando os resultados obtidos em organismos coletados em pontos com distintos históricos de contaminação na baía de Guajará e rio Guamá, ao longo de um ano.
- ✓ Quantificar os danos oxidativos nos poliquetas através do biomarcador de efeito lipoperoxidação, comparando os resultados obtidos em organismos coletados em pontos com distintos históricos de contaminação na baía de Guajará e rio Guamá, ao longo de um ano.
- ✓ Determinar a capacidade antioxidante total dos organismos pelo ensaio TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), comparando os resultados obtidos em organismos coletados em pontos com distintos históricos de contaminação na baía de Guajará e rio Guamá ao longo de um ano.
- ✓ Analisar as respostas antioxidantes e danos oxidativos de *N. abiuma* em ambientes com distintos históricos de contaminação, caracterizando a influência das variações sazonais nos biomarcadores.

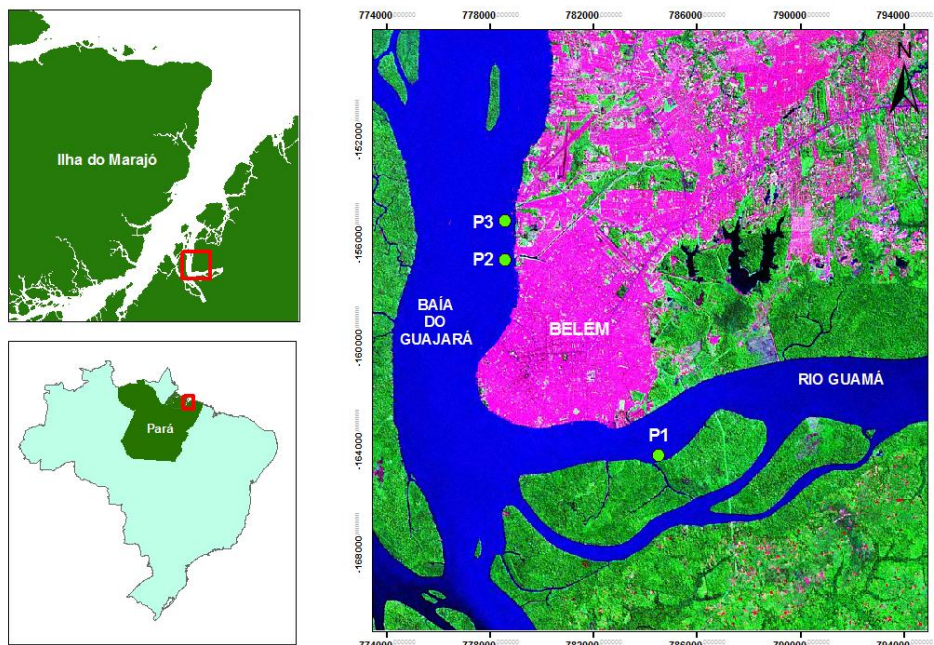
## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

Como pontos de coleta (Fig. 4) foram escolhidos a desembocadura do Canal do Una (P2) e Terminal Petroquímico de Miramar (P3), dois locais contaminados localizados na Baía de Guajará; e em um ponto considerado como referencial localizado na margem esquerda do Rio Guamá (P1), que apresenta um menor histórico de contaminação em relação aos demais (MOURA, 2007. SOUZA-HOLANDA, 2010).

Foram realizadas cinco coletas conforme o regime pluviométrico do Estuário Guajarinó, de julho de 2010 a julho de 2011; Sendo divididas em: julho de 2010 (período seco); outubro de 2010 (transição seco-chuvoso); fevereiro de 2011 (período chuvoso); abril de 2011 (transição chuvoso-seco) e julho de 2011 (período seco).

Figura 4: Localização da área de estudo. P1- Ponto referência; P2- Ponto do Una e P3- Ponto de Miramar. Os quadros vermelhos destacam a localização do estuário Guajarinó. Imagem Landsat ETM +7.



Na captura dos poliquetas foi utilizado um amostrador de fundo do tipo Petersen (área de 0,039 m<sup>2</sup>). Eles foram separados ainda no local, e mantidos em gelo até a chegada ao laboratório. Os espécimes de *Namalycastis abiuma* foram identificados e separados (apenas organismos inteiros) em “pools” de 10 a 15 animais, devido ao seu peso e tamanho reduzido ( $0,042 \pm 0,007$  g), ainda em condição de críoanestesia. Os “pools” foram acondicionados em endorffs e armazenados em ultrafreezer à -80 °C até o momento de análise.

Os poliquetosepítocos capturados não foram utilizados na composição dos pools, evitando um possível erro na interpretação das análises enzimáticas. A epitoquia consiste numa metamorfose reprodutiva dos poliquetas bentônicos para permitir a natação, na qual há um hipertrofiamento das estruturas da cabeça, dos parapódios e das acículas. Os organismos epítocos apresentam um distinto padrão metabólico associado a essa modificação corporal, caracterizado por uma alta produção de espécies reativas de

oxigênio que não é acompanhada pelo aumento das atividades antioxidantes (CHATELAIN et al., 2008).

## 2.2 PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO

Para determinação das atividades enzimáticas e da capacidade antioxidante total, as amostras coletadas foram homogeneizadas em uma solução tampão feita com TRIS Base (20 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), Sacarose (0,5 M), KCl (0,15 M) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0,1 mM) numa proporção de 1:4 (tecido:tampão), e o pH foi ajustado para 7,6 (GERACITANO et al., 2004a).

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 30 minutos a velocidade de  $9.000\times g$  e temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, descartou-se o pellet e o sobrenadante foi recolhido e separado em alíquotas para as análises bioquímicas.

### 2.2.1 Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método do Biureto usando um kit comercial (Dole Reagentes Ltda., MG/Brasil). Esse método é baseado na reação entre o biureto presente no meio de reação com as proteínas amostradas, que é medida espectrofotometricamente a 550 nm, e comparada com a concentração de uma proteína padrão (Albuma Bovina Sérica). Todas as dosagens, assim como as dos biomarcadores, foram feitas no mínimo em duplicata.

### 2.2.2 Análise da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), medindo-se espectrofotometricamente a taxa de decomposição enzimática do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm. A diminuição da absorbância representa a atividade da enzima, que é expressa em unidade de CAT/mg de proteína, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar  $1\mu\text{m}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min/mg de proteína, à  $30^{\circ}\text{C}$  e pH 8. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi  $0,071\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Análise da atividade da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada pela reação de conjugação de 1 mM de glutathione (GSH) com 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo com o método descrito por Habig e Jakoby (1981). A formação do composto é analisada como um aumento da absorbância a 340 nm que representa a atividade desta enzima. A atividade da GST é

expressa em unidades de GST/mg de proteínas, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para conjugar 1 $\mu$ mol de CDNB/min/mg de proteína, à 25°C e pH 7. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6mM<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

#### 2.2.4 Capacidade antioxidante total

Foi determinada pelo método TEAC (do inglês *Trolox equivalent antioxidant capacity*). Neste ensaio um radical ABTS<sup>•+</sup> pré-formado é adicionado às amostras, e a redução da concentração deste radical é medida espectrofotometricamente na faixa de 734 nm. Os resultados representam a concentração total de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, tendo a capacidade antioxidante do Trolox (análogo sintético da vitamina E) como padrão (Re et al., 1999).

#### 2.2.5 Determinação da lipoperoxidação (LPO)

O conteúdo de lipídeos peroxidados foi determinado segundo o método FOX descrito por HERMES-LIMA et al. (1995) e adaptado por MONSERRAT et al. (2003). Os “polls” foram homogeneizados (1:4, peso/volume) em metanol 100% (resfriado). As amostras foram centrifugadas (1000xg, 4°C, 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da lipoperoxidação.

Este ensaio é baseado na oxidação do Fe II por hidroperóxidos lipídicos (substâncias reativas de FOX) presentes na amostra, em pH ácido e na presença do corante laranja de xilenol (Fe III-complexante). O aumento na absorbância foi registrado a 550 nm após o tempo de incubação de 150 minutos, sendo que os resultados são comparados ao hidroperóxido de cumeno (CHP), que é adicionado às amostras após o período de incubação. A lipoperoxidação é expressa em nmols de CHP/g de tecido úmido.

O método FOX modificado foi previamente padronizado para utilização no poliqueta *Namalycastis abiuma* conforme o anexo A.

#### 2.2.6 Análise estatística

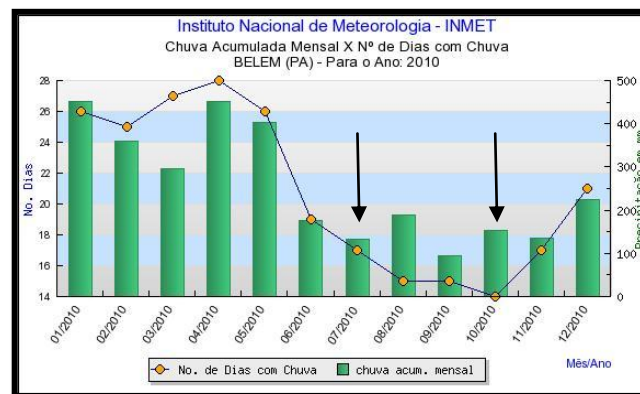
Os dados foram testados quanto a sua normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (teste de Levene) e, se algum destes parâmetros não fosse obtido, foram transformados através de Log (x+1) (ZAR, 1984). Após esta etapa, foram analisados através do teste de ANOVA para amostras independentes, comparando as médias dos grupos amostrados. Em todos os casos foi utilizado um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n = 4-10).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 PRECIPITAÇÃO

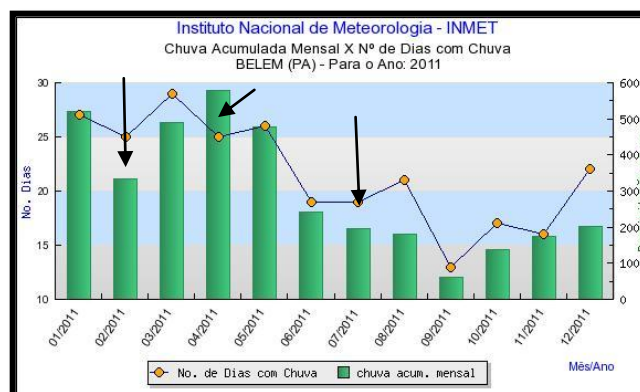
A precipitação na cidade de Belém (figura 6) no primeiro mês do período seco (Julho/2010) apresentou redução significativa das chuvas e do número de dias com chuva ( $n=17$ ) em relação ao período chuvoso deste ano. O primeiro mês do período seco-chuvoso (outubro/2010) apresentou um pequeno aumento (aproximadamente 50 mm) nos níveis de precipitação e redução no número de dias com chuva ( $n=14$ ). Já no mês de Fevereiro/2011 (período chuvoso) houve um aumento significativo das chuvas e do número de dias com chuvas ( $n=25$ ) (figura 7). Contudo, o primeiro mês do período chuvoso-seco (abril/2011) foi que apresentou maior chuva acumulada mensal (~ 550 mm), distribuída em 25 dias com chuva. No mês de Julho/2011 os níveis de chuva já se mostram baixos (~ 150 mm) e diminuí também o número de dias com chuvas ( $n=17$ ) (INMET, 2011).

Figura 5: Chuva acumulada mensal x número de dias com chuva de janeiro a dezembro de 2010 na cidade de Belém/PA. Em destaque os meses em que houve coleta.



Fonte: INMET, 2011.

Figura 6: Chuva acumulada mensal x número de dias com chuva, de janeiro a dezembro de 2011 na cidade de Belém/Pará. Em destaque os meses em que houve coleta.



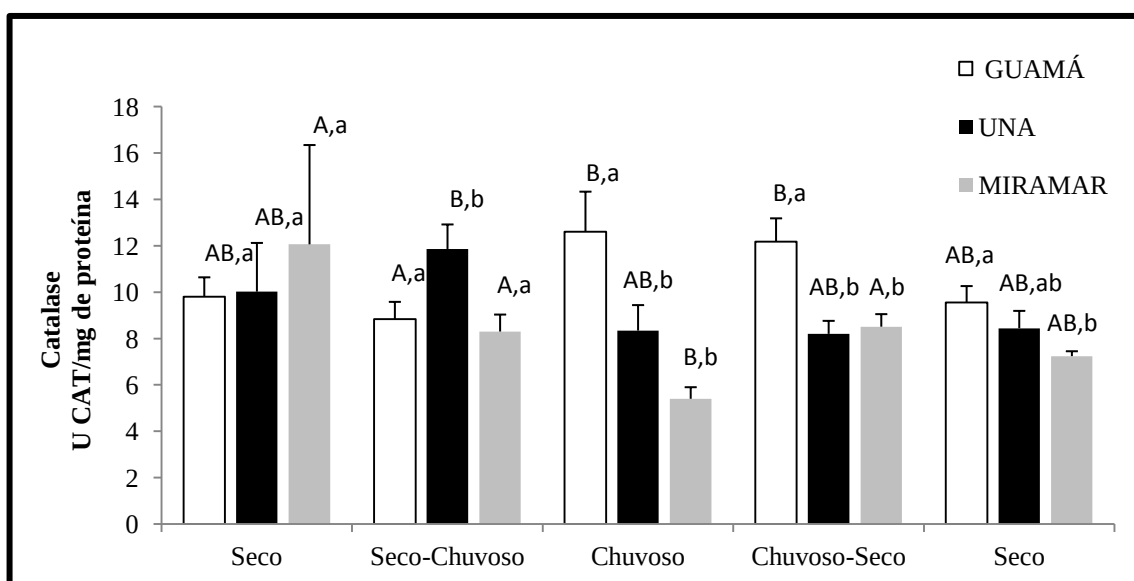
Fonte: INMET, 2011.

### 3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT (Fig. 8) nos poliquetas coletados no Guamá ( $9,8 \pm 0,8$  U CAT/mg proteína), Una ( $10,02 \pm 2,10$  U CAT/mg proteína) e em Miramar ( $12,6 \pm 4,28$  U CAT/mg proteína) foi estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) no primeiro período seco, correspondente a Julho/2010. No período seco-chuvoso (Outubro/2010), a atividade nos animais da Una ( $11,86 \pm 1,06$  U CAT/mg proteína) aumentou, e foi maior ( $p < 0,05$ ) do que nos do Guamá ( $8,83 \pm 0,75$  U CAT/mg proteína) e de Miramar ( $8,3 \pm 0,73$  U CAT/mg proteína).

No período chuvoso (Fevereiro/2011), a atividade da CAT apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos animais coletados no ambiente referência ( $12,6 \pm 1,73$  U CAT/mg proteína), comparado com a atividade desta enzima nos animais coletados no período anterior no mesmo ambiente. Neste mesmo período, a atividade da catalase nos animais coletados no Guamá foi superior a dos animais de Miramar e Una. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na atividade desta enzima entre os animais coletados em Miramar ( $5,4 \pm 0,5$  U CAT/mg proteína) e os da Una ( $8,3 \pm 1,1$  U CAT/mg proteína), mas a atividade dos organismos de Miramar foi reduzida em relação aos períodos anteriores.

Figura 7: Atividade da catalase nos poliquetas da espécie *Namalycastis abiuma* coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajará, durante um ciclo de biomonitoramento. As letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) no mesmo local ao longo dos períodos amostrados. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão.



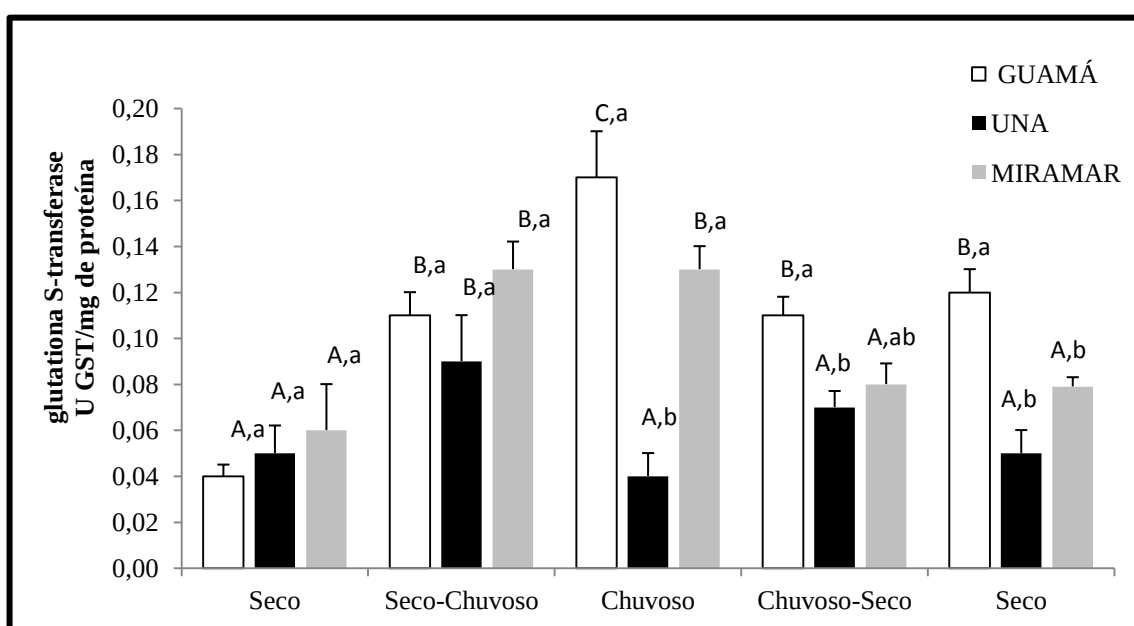
A atividade da CAT permaneceu elevada nos poliquetos coletados no Guamá ( $12,18 \pm 1,0$  U CAT/mg proteína) durante o período chuvoso-seco (Abril/2011), comparada aos organismos de Miramar e Una. Houve uma recuperação na atividade dessa enzima nos animais de Miramar ( $8,51 \pm 0,56$  U CAT/mg proteína) em relação ao período anterior, os quais tiveram atividades da CAT estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) ao poliquetos do Una ( $8,20 \pm 0,56$  U CAT/mg proteína).

No segundo período seco (Julho/2011) a atividade da CAT nos poliquetos oriundos do Guamá ( $9,55 \pm 0,71$  U CAT/mg proteína) continuou mais elevada do que nos de Miramar ( $7,24 \pm 0,21$  U CAT/mg proteína). Já os poliquetos do Una ( $8,44 \pm 0,75$  U CAT/mg proteína) não apresentaram diferenças significativas na atividade desta enzima em relação aos do Guamá, nem aos de Miramar.

### 3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLUTATIONAS-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST (Fig. 9) no primeiro período seco (julho 2010), assim como a da CAT, não apresentou diferenças significativas entre os animais oriundos do Guamá ( $0,04 \pm 0,005$  U GST/mg proteína), Una ( $0,05 \pm 0,012$  U GST/mg proteína) e Miramar ( $0,06 \pm 0,02$  U GST/mg proteína).

Figura 8: Atividade da glutatona S-transferase nos poliquetos da espécie *Namalycastis abium* coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento. As letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período. As letras maiúsculas diferentes significam diferenças ( $p < 0,05$ ) no mesmo local ao longo dos períodos amostrados. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão.





No período seco-chuvoso houve um aumento na atividade dos organismos de todos os ambientes em relação ao período anterior. A atividade da GST nos poliquetas do Guamá ( $0,11 \pm 0,013$  U GST/mg proteína), Una ( $0,09 \pm 0,022$  U GST/mg proteína) e Miramar ( $0,13 \pm 0,012$  U GST/mg proteína) foi estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) nesta coleta.

No período chuvoso, a atividade da GST nos organismos do Una ( $0,04 \pm 0,01$  U GST/mg proteína) reduziu significativamente tanto em relação ao período anterior como em relação a atividade observada nos poliquetas de Miramar ( $0,13 \pm 0,01$  U GST/mg proteína) e do Guamá ( $0,17 \pm 0,02$  U GST/mg proteína). Já os poliquetas coletados no Guamá tiveram um aumento significativo na atividade da GST em relação ao período seco-chuvoso, e não houve diferença na atividade destes organismos com os de Miramar.

A atividade da GST nos organismos do Guamá ( $0,11 \pm 0,008$  U GST/mg proteína) diminuiu ( $p < 0,05$ ) no período chuvoso-seco em relação ao período anterior, mas ainda foi significativamente maior do que a atividade nos organismos do Una ( $0,07 \pm 0,007$  U GST/mg proteína). Enquanto que não houve diferença na atividade da GST entre os organismos de Miramar ( $0,079 \pm 0,004$  U GST/mg proteína) e Una, e nem entre os de Miramar e Guamá.

No segundo período seco, os poliquetas do Una ( $0,05 \pm 0,01$  U GST/mg proteína) e de Miramar ( $0,05 \pm 0,01$  U GST/mg proteína) tiveram uma atividade da GST estatisticamente igual. A atividade nos poliquetas destes dois ambientes contaminados esteve reduzida ( $p < 0,05$ ) em relação ao ambiente referência ( $0,12 \pm 0,01$  U GST/mg proteína).

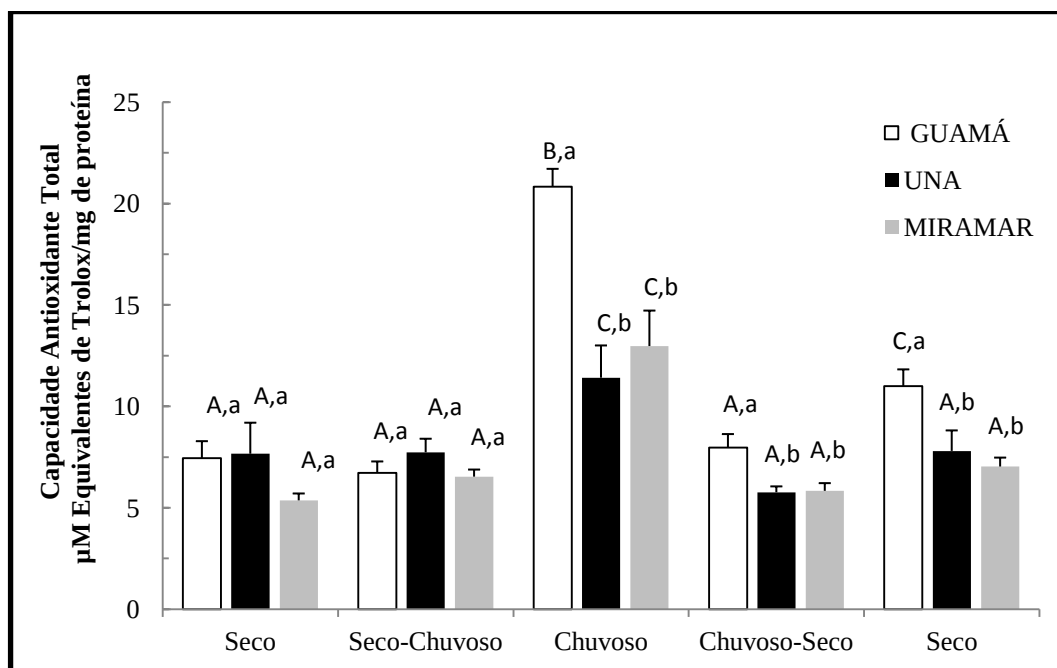
### 3.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Quanto à capacidade antioxidante total (Fig. 10), expressa como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), os poliquetas de todos os locais amostrados tiveram os mesmos conteúdos de antioxidantes no período seco e seco-chuvoso, e também não ocorreram diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais. Os respectivos valores de capacidade antioxidante obtidos nos organismos coletados no Guamá, no Una e em Miramar no período seco foram de  $7,45 \pm 0,83$  TEAC/mg proteína,  $7,66 \pm 1,53$  TEAC/mg proteína, e  $5,36 \pm 0,34$  TEAC/mg proteína. Enquanto que no período seco-chuvoso foram de  $6,72 \pm 0,56$  TEAC/mg proteína,  $7,73 \pm 0,67$  TEAC/mg proteína, e  $6,53 \pm 0,35$  TEAC/mg proteína.

No período chuvoso, os valores de TEAC nos organismos do Guamá ( $20,83 \pm 0,88$  TEAC/mg proteína), Una ( $11,41 \pm 1,59$  TEAC/mg proteína) e Miramar ( $12,97 \pm 1,75$  TEAC/mg proteína), tiveram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação às coletas

anteriores. Não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) do TEAC entre os organismos de Una e Miramar, mas os poliquetas do Guamá tiveram um maior ( $p < 0,05$ ) TEAC do que os organismos dos dois ambientes contaminados.

Figura 9: Capacidade antioxidante total nos poliquetas da espécie *Namalycastisabium* coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajarinó, durante um ciclo de biomonitoramento. As letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) no mesmo local ao longo dos períodos amostrados. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão.



No período chuvoso-seco, os níveis de capacidade antioxidante total dos poliquetas foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) no Guamá ( $7,96 \pm 0,67$  TEAC/mg proteína), Una ( $5,76 \pm 0,29$  TEAC/mg proteína) e Miramar ( $5,83 \pm 0,38$  TEAC/mg proteína) em relação ao período anterior. Contudo, ainda se observou uma maior ( $p < 0,05$ ) TEAC nos organismos do Guamá, em relação aos locais contaminados.

No segundo período seco, os maiores valores ( $p > 0,05$ ) de TEAC se mantiveram nos organismos do Guamá ( $10,99 \pm 0,83$  TEAC/mg proteína), comparado com os ambientes contaminados. Novamente não houve variação significativa dos valores de TEAC entre Una ( $7,80 \pm 1,01$  TEAC/mg proteína) e Miramar ( $7,03 \pm 0,44$  TEAC/mg proteína).

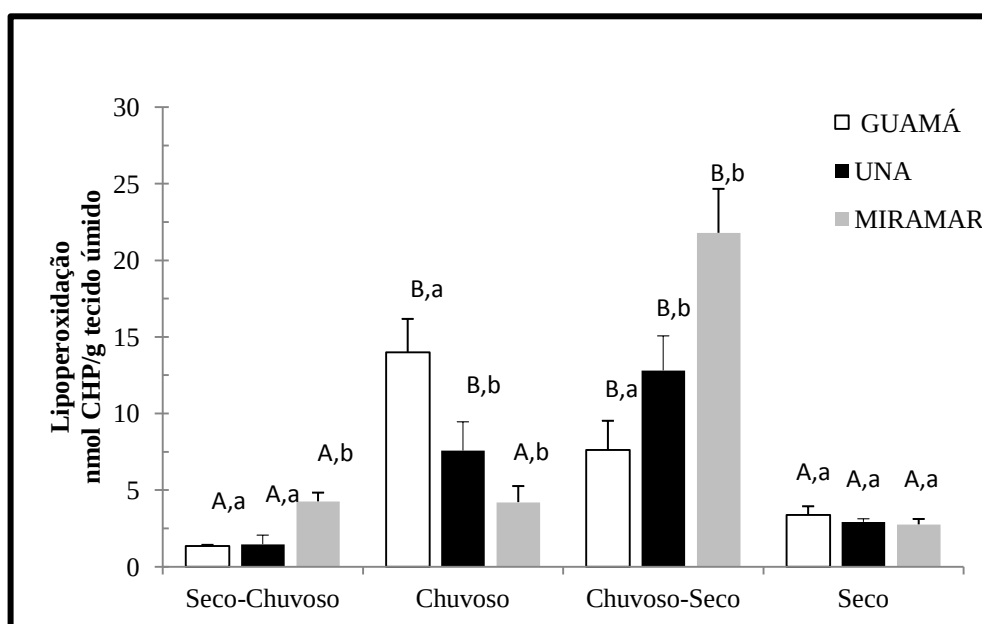
### 3.5. DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Não foi possível determinar a lipoperoxidação (LPO) nos organismos coletados no primeiro período seco (Julho/2010), por limitação de número de poliquetas coletados.

Como se pode observar na figura 11, no período seco-chuvoso ocorreu um maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo de LPO nos poliquetas coletados em Miramar ( $4,25 \pm 0,57$  nmols CHP/g tecido úmido), do que nos do Una ( $1,45 \pm 0,6$  nmols CHP/g tecido úmido) e do Guamá ( $1,34 \pm 0,07$  nmols CHP/g tecido úmido).

No período chuvoso, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de lipídeos peroxidados nos animais do Una ( $7,57 \pm 1,87$  nmols CHP/g tecido úmido) e Guamá ( $14,0 \pm 2,16$  nmols CHP/g tecido úmido) em relação ao período anterior. Sendo que os danos em lipídeos foram significativamente maiores nos organismos do Guamá do que nos poliquetas dos dois locais contaminados. Os animais de Una e Miramar ( $4,20 \pm 1,05$  nmols CHP/g tecido úmido) não tiveram diferenças significativas no conteúdo de LPO durante esta coleta.

Figura 10: Lipoperoxidação nos poliquetas *Namalycastis abiuma* coletados em ambientes com distintos históricos de contaminação no estuário Guajará, durante um ciclo de biomonitoramento. As letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) no mesmo local ao longo dos períodos amostrados. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão.



No período chuvoso-seco, ocorreu um aumento no conteúdo de lipídeos peroxidados nos poliquetas de Miramar ( $21,78 \pm 2,87$  nmols CHP/g tecido úmido) em relação ao período anterior. O conteúdo de LPO nos poliquetas do Guamá ( $7,61 \pm 1,90$  nmols CHP/g tecido úmido) foi menor ( $p < 0,05$ ) em relação aos do Una ( $12,86 \pm 2,25$  nmols CHP/g tecido úmido), e também foi significativamente menor em relação aos valores obtidos nos organismos de Miramar.

No período seco observamos uma redução ( $p < 0,05$ ) do conteúdo de lipídeos peroxidados nos poliquetas de Miramar e Una não havendo diferenças significativas

( $p > 0,05$ ) comparado aos organismos do Guamá. Os respectivos valores obtidos para os animais coletados em Guamá, Una e Miramar são de  $3,37 \pm 0,56$  nmols CHP/g tecido úmido,  $2,91 \pm 0,20$  nmols CHP/g tecido úmido e  $2,75 \pm 0,35$  nmols CHP/g tecido úmido, respectivamente.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 CICLO DE BIOMONITORAMENTO

Analizando o padrão obtido para os biomarcadores de exposição catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e a capacidade antioxidante total (TEAC) nos organismos do Guamá, durante o ciclo de biomonitoramento realizado, fica claro que há indução dessas enzimas antioxidantes e aumento da TEAC conforme ocorre o aumento da precipitação. Contudo, pôde-se evidenciar uma clara inversão do ciclo anual da CAT e GST, com diminuição da atividade destas enzimas nos poliquetas de Una e Miramar, a qual resultou em danos lipídicos quando os níveis de precipitação se elevam no período seco-chuvoso. Reduções na atividade da CAT são observadas em bivalves de ambientes poluídos devido a um aumento da atividade catabólica e/ou inibição direta por poluentes (VIARENGO et al., 2007), inclusive em alguns organismos pode haver ausência de expressão gênica (mRNA) desta enzima para contrabalancear a produção de  $H_2O_2$  (ROLA et al., 2012).

Apesar da resposta antioxidante inicial no período chuvoso, a exposição prolongada dos animais de Una e Miramar a poluentes e os elevados níveis de precipitação no período chuvoso-seco mostraram um efeito negativo com redução dos biomarcadores de exposição (CAT, GST e TEAC) a níveis muito baixos quando comparados com os animais do Guamá, e convergiram para um aumento de danos oxidativos em lipídeos. Esta diminuição da competência antioxidante com consequentes danos oxidativos tem sido registrada em organismos de locais poluídos devido à contínua exposição a poluentes (AMEUR et al., 2012).

A contaminação por hidrocarbonetos em Miramar pode ter sido um dos possíveis agravantes para ocorrência de maiores danos oxidativos nos poliquetas deste ambiente, já que neste local há uma maior exposição a combustíveis, óleos e graxas de operações do próprio porto e carregados pelo igarapé de Val-de-Cães (MARANHÃO, 2007), o que também tem acrescentado Pb para o ambiente (OLIVEIRA, 2009). Apesar padrão de enriquecimento de Pb antropogênico não ocorrer no poliqueta *N. abiuma* (concentração média de 0,3mg/Kg) da mesma forma que em oligoquetas do estuário Guajará (concentração média de 5 mg/Kg), como uma possível defesa natural dessa espécie contra a bioacumulação de poluentes, a exposição a uma grande quantidade de hidrocarbonetos é conhecida geradora de estresse oxidativo. Estes compostos tendem a ser biotransformados, produzindo uma maior quantidade de EROs e, se ultrapassadas as defesas antioxidantes, de danos oxidativos (JORGENSEN et al., 2008). A tentativa de metabolização por enzimas de biotransformação pode ter sido

parcialmente responsável pela LPO observada nos animais deste ambiente no período seco-chuvoso, no qual somente a atividade da GST foi induzida.

Um padrão de alternância de vias de metabolização foi identificado no peixe *Limandalimanda*, em que houve um maior conteúdo de enzimas de biotransformação (CYP1A) e uma diminuição nas atividades da CAT e GST durante o inverno, indicando ativação do metabolismo de biotransformação com produção elevada de EROs e ocorrência de quebras nas fitas de DNA (AKCHA et al., 2004). No poliqueta *Arenicola marina*, exposto a sedimentos contaminados em áreas portuárias da Espanha (Baía de Santander), também se pôde verificar que a indução de uma enzima de biotransformação (DBF) nos pontos com maior contaminação por hidrocarbonetos mais persistentes resultou em metabólitos mais reativos que causaram danos em lipídeos. Já os poliquetas que apresentaram indução de enzimas antioxidantes (GPx, GST e GR), amostrados um ponto com contaminação por hidrocarbonetos menos persistentes, não sofreram lipoperoxidação (RAMOS-GÓMEZ et al., 2011). Estes resultados corroboram também com o mecanismo observado em nosso estudo para os animais do Guamá, que apresentam uma elevada atividade de enzimas antioxidantes como uma resposta protetiva à condição de estresse oxidativo.

Santos (2011) analisou paralelamente a atividade da GST na fração orgânica (fitoplâncton e zooplâncton) da matéria particulada em suspensão na baía do Guajará, e confrontando com nossos resultados pode-se destacar que a poluição afeta diferentemente organismos que ocupam posições distintas na coluna d'água. Seus resultados mostraram uma maior atividade da GST nesse complexo de organismos no período seco, principalmente nos pontos impactados, inferindo que a maior concentração de xenobióticos disponíveis para os organismos de superfície ocorre quando há menor diluição dos efluentes lançados na baía. Mas como o poliqueta *N. abiuma* habita os sedimentos lamosos de fundo, sendo influenciado diferentemente pelos fatores abióticos, apenas o potencial hidrodinâmico do período chuvoso estaria expondo-o a uma maior concentração de poluentes carregados e/ou ressuspensos nos sedimentos. Outro fator importante para esta interpretação seria a complexação e/ou adsorção de poluentes à matéria orgânica nos sedimentos que pode ocorrer no período seco (ROSA-FILHO et al., 2011), assim como a complexação de metais a óxidos de ferro (SOUZA-HOLANDA, 2010) que estariam reduzindo a biodisponibilidade de contaminantes.

Comparando nossos resultados com os obtidos por Geracitano et al. (2004a) no também nereídeo *Laeonereis acuta*, coletado no estuário da Lagoa dos Patos/RS, pode-se destacar a existência de variações espécies-específicas entre as atividades antioxidantes (LIMÓN-

PACHECO; GONSEBATT, 2009), bem como diferentes níveis de contaminação nos dois ambientes. Estes autores observaram que os poliquetas amostrados em um local poluído demonstraram maiores respostas antioxidantes (atividades da CAT e GST, e conteúdo de metalotioneínas) do que aqueles coletados no ambiente não poluído durante o verão e outono. Evidenciaram também que tais respostas antioxidantes foram suficientes para prevenir danos oxidativos a lipídeos, ao contrário do resultado obtido nos poliquetas de Miramar e Una. Considerando que o estuário da Lagoa dos Patos e o Guajará têm dinâmicas diferenciadas, seria esperado um padrão diferente entre *L. acutae* e *N. abiuma* principalmente sobre a principal forçante ambiental que influencia as taxas de produção de EROs, em nosso caso os níveis das chuvas. Também vale ressaltar que os poliquetas da espécie *N. abiuma* amostrados na Baía de Guajará (Una e Miramar) apresentam uma condição de estresse oxidativo sazonal (período chuvoso e chuvoso-seco), relacionada com a influência das chuvas no aporte de poluentes destes locais. Já os poliquetas do Guamá apresentam um aumento transiente da lipoperoxidação no período chuvoso, mas relacionado possivelmente com o aumento nas taxas de alimentação.

Geracitano et al. (2004a) também compararam as médias anuais dos biomarcadores de exposição, obtendo maior média anual nos animais do ambiente poluído (CAT:  $5,7 \pm 0,6$ ; GST:  $0,045 \pm 0,004$  e MT:  $0,23 \pm 0,03$ ) e demonstrando que existe uma tendência de maior competência antioxidante do que naqueles do ambiente referência (CAT:  $3,7 \pm 0,3$ ; GST:  $0,034 \pm 0,003$  e MT:  $0,15 \pm 0,02$ ). Uma análise semelhante em nossos resultados nos mostra uma tendência de maior média anual dos biomarcadores nos poliquetas do Guamá (CAT:  $10,59 \pm 1$ ; GST:  $0,11 \pm 0,01$  e TEAC:  $10,79 \pm 0,75$ ) do que naqueles de Una (CAT:  $9,37 \pm 1,11$ ; GST:  $0,06 \pm 0,01$ ; e TEAC:  $8,07 \pm 1,01$ ) e Miramar (CAT:  $8,3 \pm 1,25$ ; GST:  $0,10 \pm 0,01$  e TEAC:  $7,54 \pm 0,65$ ), corroborando com nossa interpretação de que os poliquetas do ambiente referência têm maior competência antioxidante do que aqueles coletados nos ambientes contaminados.

#### 4.2 PERÍODOS PLUVIOMÉTRICOS

Os poliquetas dos três locais amostrados não apresentaram diferenciação quanto aos biomarcadores de exposição (catalase-CAT, glutathione S-transferase-GST, e capacidade antioxidante total-TEAC) analisados no período seco (julho/2010), provavelmente devido a níveis semelhantes de estresse nos organismos dos três locais amostrados. Como não foi possível a análise da lipoperoxidação (LPO) neste período, torna-se impossível definir se nesta estação os animais estavam ou não sob estresse oxidativo. Em todo o estuário

Guajarino ocorre um forte tráfego de embarcações dos mais variados fins e portes, destacando-se o transporte de passageiros e/ou cargas e a venda de mercadorias em balsas (GREGÓRIO, 2008), o que se considera como uma perturbação comum a todos os pontos e que não aparenta ter influenciado em nossas análises.

A redução da hidrodinâmica no período menos chuvoso (seco) permite uma maior sedimentação de matéria orgânica e sedimentos finos (silte e argila) no estuário (ROSA-FILHO et al., 2010), que poderiam estar complexando ou soterrando compostos químicos nos locais contaminados, diminuindo seu contato com os organismos e até sua biodisponibilidade (BEZERRA et al., 2008). Estes fatores estariam diminuindo a influência do impacto antrópico na resposta das enzimas antioxidantes para os animais de Una e Miramar, que são ambientes com reconhecida contaminação por esgotos domésticos e hidrocarbonetos, respectivamente (AVIZ et al., 2012; OLIVEIRA, 2009). MONSERRAT et al. (2007) destacam que a exposição de organismos aquáticos a contaminantes normalmente cria uma resposta antioxidante adaptativa, prevenindo os componentes celulares de possíveis danos oxidativos. Pode-se inferir, deste modo, que não houve a necessidade de indução das enzimas CAT e GST nos animais dos pontos contaminados durante o período seco devido a um menor contato com poluentes, e por isso a ausência de diferenças em relação aos poliquetas do Guamá, que não estão expostos a uma fonte de contaminação direta e cujos sedimentos apresentam baixas concentrações de metais (Cr, Zn, Ni, Cu e Pb) (SOUZA-HOLANDA, 2010; SANTOS et al., 2012). Inclusive, podemos destacar que a desembocadura do Rio Guamá tem sido usada como ambiente referência na avaliação ambiental deste estuário por muitos pesquisadores (MONTES et al., 2010; ROSA-FILHO et al., 2011).

No período seco-chuvoso a atividade da GST não se diferenciou entre os poliquetas de nenhum dos locais amostrados, mas apresentou um incremento significativo nos organismos dos três ambientes em relação à coleta anterior. Considerando que existe uma ampla gama de poluentes em nossa área de estudo, a maior quantidade de chuva acumulada neste período (aproximadamente 50 mm em relação ao anterior) resultou num maior aporte de xenobióticos no ambiente aquático e na necessidade de aumento no processo de detoxificação. Muitos estudos têm caracterizado que a exposição de organismos a poluentes leva a uma indução da GST, como o de Amado et al. (2006b) que, embasados em dados ambientais, relataram que a atividade da GST no linguado *Paralichthys orbignyanus* poderia ser induzida pelo contato dos peixes com hidrocarbonetos presentes no ambiente.



O aumento na atividade da CAT nos poliquetas do Unadurante o período seco-chuvoso, em relação aos organismos do Guamá, permitiu a diminuição da exposição celular ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e preveniu o aumento no conteúdo de lipídios peroxidados. Como houve aumento apenas do processo de detoxificação nos organismos de Miramar, sem esta resposta na atividade da CAT, as EROs não interceptadas provavelmente induziram a maior LPO observada. A CAT é uma das enzimas responsáveis pela dismutação do  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Com a sua atividade diminuída, os níveis de  $H_2O_2$  aumentaram e com isso a probabilidade de formação de radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), extremamente reativo e capaz de iniciar a reação em cadeia da lipoperoxidação (HERMES-LIMA, 2004).

Quanto aos poliquetas do Guamá, pode-se inferir que houve exposição a uma menor quantidade de xenobióticos do que nos locais contaminados no período seco-chuvoso. Assim, o aumento na atividade da GST foi suficiente para prevenir danos oxidativos e não foi necessária nenhuma mudança na atividade da CAT. Box et al. (2007) indicam que a CAT é mais ativa preferencialmente em altas concentrações de  $H_2O_2$ , tendo um papel secundário no catabolismo de  $H_2O_2$  em baixas concentrações. Então, outra enzima antioxidante como a glutatona peroxidase (GPx) poderia ter sido induzida neste momento.

A TEAC apresentou um incremento significativo nos organismos dos três ambientes apenas no período chuvoso. Considerando que o aumento dos níveis de chuva permitiria a maior lixiviação e carreamento de compostos vegetais das planícies de inundação (BARTHEM e FABRÉ, 2004), uma hipótese de mudança na dieta em termos de composição ou concentração pode ser sustentada. Assim, o aumento natural das chuvas poderia incrementar as concentrações de matéria orgânica carregada para o estuário. Essa matéria orgânica, sendo consumida pelos organismos, levaria ao aumento nas concentrações de antioxidantes não enzimáticos como compostos fenólicos e, então, da TEAC.

Contudo, pode-se notar que os poliquetas de Una e Miramar apresentam menor TEAC do que aqueles do ambiente referência. Este é um indicativo de maior oxidação destes compostos nos organismos residentes nestes locais contaminados, prevenindo a oxidação de componentes celulares importantes.

A TEAC é definida, segundo Re et al. (1999), principalmente como a capacidade antioxidante de compostos naturais (fenólicos, antocianinas e misturas brutas). Mas como um radical pré-formado é adicionado à amostra no ensaio, também se pode esperar que proteínas com papel antioxidante como as tioredoxinas sejam capazes de capturá-lo (AISPUR-

HERNANDEZ et al., 2008), e a oxidação dessas enzimas poderia estar diminuindo a TEAC (GORINSTEIN et al., 2006).

A atividade reduzida da CAT e GST nos poliquetos do Una no período chuvoso, em relação aos organismos do ambiente referência, resultou em danos lipídicos não observados nos animais desse local no período anterior. Este resultado está de acordo com diversos estudos que têm observado que outros animais de locais poluídos, como peixes e moluscos, apresentam deficiência do sistema antioxidante e conseqüentes danos oxidativos associados a mudanças nas condições ambientais (AMADO et al., 2006a; AMEUR et al., 2012; VIARENGO et al., 1998). Estas diminuições nos processos de degradação de  $H_2O_2$  e na detoxificação de xenobióticos e/ou peróxidos lipídicos não aparentam ser influenciadas pelos baixos níveis destas espécies, uma vez que resultaram em altos níveis de LPO. E considerando ainda que o aumento da TEAC também possa implicar num aumento de GSH, a diminuição da GST não estaria associada à diminuição na concentração de seu co-substrato.

A elevada atividade da GST e maior TEAC no período chuvoso permitiram que a lipoperoxidação permanecesse no mesmo nível da coleta anterior, mesmo com a redução na atividade da CAT. Como a GST também tem um papel antioxidante, retirando hidroperóxidos lipídicos através da conjugação com a GSH, tornando-os mais solúveis e facilitando a eliminação (MONSERRAT et al., 2007), sua maior atividade nestes animais pode ter contribuído para os baixos níveis que ocorreram.

As menores atividades da CAT nos organismos de Miramar e Una, e da GST nos poliquetos coletados no Una durante o período chuvoso podem ser resultado de um ataque das EROs diretamente nas enzimas amostradas devido à intensa exposição a poluentes orgânicos, principalmente na desembocadura do canal do Una (NASCIMENTO, 1995; SOUZA-HOLANDA, 2010). Estas enzimas possuem “clusters” de Fe-S em suas ligações que podem ser oxidados via reação de Fenton pela exposição ao  $O_2^{\bullet-}$  (HERMES-LIMA, 2004) e ter permitido esta diminuição na competência antioxidante. Uma situação semelhante já foi observada no estudo de Ferreira-Cravo et al. (2007), em que ocorreram maiores danos oxidativos no poliqueto *L. acuta* coletado em um local poluído do estuário da Lagoa dos Patos, causados por um aumento da concentração de EROs na região corporal posterior e diminuição na competência antioxidante contra  $OH^{\bullet}$ . A ausência de danos em lipídeos e a diminuição no conteúdo de proteínas (P-SH) permitiram que estes autores indicassem que outras macromoléculas, como proteínas, estivessem sendo atacadas e novamente dá suporte a nossos resultados.

Os poliquetas de Una e Miramar coletados no período chuvoso podem ter apresentado uma estratégia de prevenção a condição de lipoperoxidação que consiste na redução da síntese de lipídeos, já sugerida para o peixe *Micropogonias furnieri* (AMADO et al., 2006a). Considerando esta hipótese, os poliquetas quando expostos a poluição em níveis significativos ou a poluentes específicos, poderiam apresentar a inativação de enzimas envolvidas na biossíntese de PUFA's, permitindo baixos níveis de lipoperoxidação devido à baixa produção desses potenciais alvos. As EROs, então, não atacariam seus principais alvos que são lipídeos, e haveria uma maior probabilidade para ocorrência da oxidação de proteínas.

Já os poliquetas do Guamá apresentaram uma maior resposta antioxidante no período chuvoso, tanto de um aumento na atividade das enzimas CAT e GST, quanto na capacidade antioxidante total, mas sofreram lipoperoxidação. As respostas antioxidantes ou de reparos a danos oxidativos de organismos coletados em ambientes controle normalmente são suficientes para prevenir a condição de estresse oxidativo, ao contrário do que se espera para os organismos de ambientes poluídos (AMADO et al., 2006b). Assim, a maior lipoperoxidação observada nos poliquetas do Guamá pode ter sido influenciada pelo aumento sazonal na taxa de alimentação, visto que um aumento do metabolismo oxidativo eleva a probabilidade de contato dos organismos com EROs (RISSO DE FAVERNEY et al., 2010; SRODA et al., 2011). Outro fator agravante para este resultado é que a intensa alimentação no período chuvoso propiciaria um acúmulo de lipídeos, como mostrado no decápode *Parastacus brasiliensis*, coletado sazonalmente e exposto a uma dieta rica em carboidratos, que apresenta concentrações máximas de lipídeos na hemolinfa apenas nos períodos de maior alimentação no ambiente de origem (outono e inverno) (DUTRA et al., 2012). No anfípoda *Gammarus roeseli*, a associação entre diminuição da temperatura e aumento da disponibilidade alimentar no inverno também induz o acúmulo de tecidos de reserva (PUFA's), exercendo um efeito sinérgico na suscetibilidade ao estresse oxidativo e aumentando da sensibilidade a estressores ambientais (SRODA et al., 2011).

Flutuações sazonais na capacidade antioxidante de organismos coletados em ambientes referência têm sido observadas, principalmente em bivalves, durante períodos de atividades alimentares mais intensas que resultam em maior metabolismo oxidativo (VELECAR et al., 2008; VIDAL-LIÑÁN et al., 2010). Pode-se supor que os produtos oxidativos oriundos do metabolismo de nutrientes e de poluentes podem alcançar um nível em que as defesas antioxidantes poderiam ser superadas e, então, causar danos a membrana celular. Os organismos do Guamá passariam então por um aumento sazonal da lipoperoxidação durante períodos de maior intensidade alimentar, uma vez que há possibilidade de formação de

EROS durante a síntese de ATP através do escape de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial (HERMES-LIMA, 2004). Estes resultados também podem estar associados a flutuações naturais nas concentrações de metais de transição carregados pelos rios (PISANELLI et al., 2009) e inclusive ao aumento ciclo de ressuspensão e afundamento de partículas gerado pela excessiva precipitação que poderiam estar sendo carregados até este local pelas correntes de maré, uma vez que não há uma relativa proximidade com a cidade de Belém (KENNISH, 1997).

Se esta hipótese estiver correta os organismos dos três ambientes teriam capacidade de aumentar não somente a TEAC, mas a quantidade de lipídeos no período chuvoso, possibilitando a alta lipoperoxidação observada nos organismos do Guamá que está associada a uma alta atividade enzimática para contrabalancear esta situação.

No segundo período seco a atividade da CAT, GST e a TEAC nos organismos de Una e Miramar permanecem em níveis semelhantes aos obtidos no primeiro período seco. Esta diminuição da capacidade antioxidante está provavelmente relacionada com a redução da precipitação, já que a influência das chuvas na hidrodinâmica diminui e ocorre o menor aporte/ou ressuspensão de poluentes para a área de estudo. E ao contrário da resposta obtida no período chuvoso-seco, os poliquetas destes ambientes contaminados não sofrem LPO.

Como observado durante grande parte do biomonitoramento, os poliquetas do Guamá permaneceram com atividade da CAT e a TEAC elevadas em relação aos do Una e de Miramar no segundo período seco, e também não ocorreram danos oxidativos em lipídeos.

## 5. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que as variações observadas nos biomarcadores analisados estiveram associadas à subdivisão do regime pluviométrico da região, que corresponde ao período seco, transição seco-chuvoso, período chuvoso e transição chuvoso-seco.

Considerando os dados do período chuvoso e chuvoso-seco, podemos associá-los ao aumento no ciclo de advecção, afundamento e ressuspensão de partículas, principalmente de poluentes provindos de descargas domésticas e industriais que deságuam através de inúmeros esgotos abertos ao longo da Baía de Guajará e na desembocadura do canal do Una. Assim, o maior aporte de águas das chuvas no estuário Guajarino estaria expondo o poliqueta *Namalycastis abiuma* a maiores concentrações de pró-oxidantes, diminuindo sua competência antioxidante e induzindo efeitos deletérios em lipídeos nos organismos de Una e Miramar.

O poliqueta *N. abiuma* mostrou ser sensível bioquimicamente aos diferentes graus de poluição no estuário Guajarinó. Foi caracterizada uma variação sazonal nas atividades antioxidantes dos organismos amostrados no ambiente referência, supostamente relacionada com um aumento nas taxas de alimentação.

Pode-se confirmar que os diversos alertas sobre enriquecimento orgânico e de metais estariam exercendo um efeito negativo sobre a biota do estuário Guajarinó, inclusive com distinção entre fatores ambientais (poluição) e sazonais. A afinidade de muitos poluentes ao substrato lamoso, seu contato a partir da alimentação e a indução das respostas antioxidantes observadas diante das diferentes fontes de contaminação (PAHs e efluentes domésticos) tornam *N. abiuma* um bom organismo biomonitor da qualidade do estuário Guajarinó.

Como os organismos mostram uma recuperação do estresse oxidativo induzido sazonalmente no segundo período seco, pode-se inferir que os níveis de contaminação no estuário retornam para um estado não alarmante. Contudo, sugere-se que sejam feitos estudos de biomonitoramento da qualidade do estuário Guajarinó em períodos mais longos, associados a avaliações das condições ambientais, e considerando que os organismos estariam mais suscetíveis ao estresse oxidativo durante o aumento da precipitação (período chuvoso e chuvoso-seco).

Sugere-se também que estes estudos sejam compostos pela utilização de organismos biomonitores de diferentes níveis tróficos, para verificar se a influência das forçantes ambientais e a amplitude de efeitos tóxicos dos poluentes atuam de maneira semelhante entre organismos distintos, permitindo desenvolver estratégias de diminuição da contaminação local mais realistas e efetivas.

## REFERÊNCIAS

- ABELE-OESCHGER, D. A comparative study of superoxide dismutase activity in marine benthic invertebrates with respect to environmental sulphide exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 197, p. 39-49, 1996.
- ABELE-OESCHGER, D.; OESCHGER, R. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187, p. 63-80. 1995.
- ALMEIDA, M. F. *Comunidades macrobentônicas da reserva biológica do lago Piratuba (Amapá - Brasil)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). 2008. 71f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e EMBRAPA, Belém, 2008.
- AISSPURO-HERNANDEZ, E.; GARCIA-OROZCO, K.D.; MUHLIA-ALMAZAN, A.; DEL-TORO-SANCHEZ, L.; ROBLES-SANCHEZ, R.M.; HERNANDEZ, J.; GONZALEZ-AGUILAR, G.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; SOTELO-MUNDO, R.R. Shrimpt hior edoxinis a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, p. 94-99. 2008.
- AKCHA, F.; LEDAY, G.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 552, n.1-2, p. 197-207. 2004.
- AMADO, L.L.; ROSA, C.E.; MEIRELLES LEITE, A.; MORAES, L.; VAZ PIRES, W.; PINHO, G.L.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei, Scianidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, 52, p. 199-206. 2006a.
- AMADO, L. L.; ROBALDO, R.B.; GERACITANO, L.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 52, p. 207-213. 2006b.
- AMEUR, W. B.; LAPUENTE, J.; EL MEGDICHE, Y.; BARHOUMI, B.; TRABELSI, S.; CAMPS, L.; SERRET, J.; RAMOS-LÓPEZ, D.; GONZALEZ-LINARES, J.; DRISS, M. R.; BORRÀS, M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 642, p. 241-251. 2012.
- AQUINO, R. F. O. *Investigação do estado trófico de um sistema estuarino amazônico (Pará, Brasil) sob influência antrópica*. 2011. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.
- AVIZ, D.; CARVALHO, I. L. R.; ROSA FILHO, J. S. Spatial and temporal changes in macrobenthic communities in the Amazon coastal zone (Guajará Estuary, Brazil) caused by discharge of urban effluents. *Scientia Marina*, 76, p. 381-390. 2012.

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, M. L. (Coord.). *A Pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus: Ibama/Provárzea, 272 p. 2004.

BEUTLER, E. The preparation of red cells for assay. In: BEUTLER, E. (Ed.). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: GRUNE & STRATON, p. 8–18, 1975.

BEZERRA, P. S. S.; TAKIYAMA, L. R.; BEZERRA, C. W. B. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. *Acta Amazônica*, v.39, n.3, p. 639 – 64. 2009.

BOX, A.; SUREDA, A.; GALGANI, F.; PONS, A.; DEUDERO, S. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146, p. 531–539, 2007.

CHATELAIN, É. H.; BRETON, S.; LEMIEUX, H.; BLIER, P. U. Epitoky in *Nereis (Neanthes) virens* (Polychaeta: Nereididae): A story about sex and death. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 149, p. 202–208, 2008.

COHAB – COOPERATIVA HABITACIONAL. *Levantamento do quadro ambiental da região metropolitana de Belém – produto 3*. Belém: PNUB/IPESP/FADESP/COHAB. 158 p. 1997.

CORDEIRO, C. A. *Estudo da salinização no estuário do rio Pará no trecho Belém-Mosqueiro*. 1987. 119f. Dissertação (Mestrado em Geociências)–Curso de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Pará, Centro de Geociências, Belém, 1987.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, R. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31, p. 19–27, 1995.

DUTRA, B. K.; SILVA, K. M.; ZANK, C.; CONTER, M. R.; OLIVEIRA, G. T. Seasonal variation of the effect of high-carbohydrate and high-protein diet on the intermediate metabolism of *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) maintained in the laboratory. *Iheringia, Série Zoológica*, 98(4), p. 433–440, 2008.

FERREIRA-CRAVO, M.; REINHARDT PIEDRAS, F.; BARROS MORAES, T.; RIBAS FERREIRA, J.L., DE FREITAS, D.P.S.; DORNELLES MACHADO, M.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere*, 66, p. 1367–1374, 2007.

GERACITANO, L. A.; BOCCHETTI, R.; MONSERRAT, J.; REGOLI, F.; BIANCHINI, A. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Marine Environmental Research*, 58, p. 1–17, 2004a.

GERACITANO, L. A.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Marine Environmental Research*, 58, p. 625–630, 2004b.

GREGÓRIO, A. M. S. *Contribuição à gestão ambiental da Baía de Guajará (Belém-Pará-Amazônia) através de estudo batimétrico e sedimentológico*. 2008. 128f. Dissertação

(Mestrado em Geociências), Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GREGÓRIO, A. M. S.; MENDES, A. C. Characterization of sedimentary deposits at the confluence of two tributaries of the Pará River estuary (Guajará Bay, Amazon). *Continental Shelf Research*, 29, p. 609–618, 2009.

GORINSTEIN, S.; ARANCIBIA-AVILAB, P.; MONCHEVAC, S.; TOLEDO, F.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, A.; GOSHEV, I.; NAMIESNIK, J. Changes in mussel *Mytilus galloprovincialis* protein profile as a reaction of water pollution. *Environment International*, 32, p. 95–100, 2006.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods on Enzymology*, 77, p. 398–405, 1981.

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

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

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.; STOREY, K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)-xynol orange complex formation. *Free Radical in Biology and Medicine*, 19, p. 271–280, 1995.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. *Censo populacional*. Brasil, Brasília. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidade-sat/topwindow.htm?>>. Acesso em 06 Jun. 2012.

INMET. 2011. *Chuva acumulada mensal x Número de dias com chuva na cidade de Belém*. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>>. Acesso em: 20 Jul. 2012.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxidant Redox Signaling*, 8, p. 1865–79, 2006.

JORGENSEN, A.; GIESSING, A. M. B.; RASMUSSEN, L. J.; ANDERSEN, O. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes. *Marine Environmental Research*, 65, p. 171–186, 2008.

KENNISH, M.J. 1997. *Practical handbook of estuarine and marine pollution*. Florida: Boca CRC Press LLC, 254 p.

LEWIS, C.; WATSON, G.J. Expanding the ecotoxicological toolbox: The inclusion of polychaete reproductive endpoints. *Marine Environmental Research*, 75, p. 10–22, 2012.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674, p. 137–147, 2009.

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

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*, 144, p. 283–289, 2006.



MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. *Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications*. Oxford: ELSEVIER SCIENCE, 2003.

MARANHÃO, R. A. *Impactos da ocupação urbana e qualidade das águas superficiais na Microbacia de Val-de-Cães (BELÉM/PA)*. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Programa de Pós-Graduação em Geografia, Belém, 2007.

MAZZEO, T. E. Avaliação ambiental das vias de drenagem da região metropolitana de Belém (PA) quanto a distribuição dos elementos Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb e Zn. 1991. 164 f. Tese (Mestrado em Geoquímica e Petrologia) – Instituto de Geociências Universidade Federal do Pará, Belém, 1991.

MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A.; PINHO, G.L.L.; VINAGRE, T.M.; FALEIROS, M.; ALCIATI, J.C.; BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, p.177–183, 2003.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G.; PINHO, L. L. G.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology part C*, 146, p. 221–234, 2007.

MONTES, C. S.; FERREIRA, M. A. P.; SANTOS, S. S. D.; VON LEDEBUR, E. I. C. F.; ROCHA, R. M. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (CASTELNAU, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Science*, 32 (1), 87-92, 2010.

MORAES, B.C.; COSTA, J. M. N; COSTA, A. C. L.; COSTA, M. H. Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. *Acta amazônica*, 35, p. 207-214, 2005.

MORAES, T.B.; RIBAS FERREIRA, J.L.; ROSA, C.E.; SANDRINI, J.Z.; VOTTO, A.P.; TRINDADE, G.S.; GERACITANO, L.A.; ABREU, P.C.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant properties of the mucus secreted by *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): A defense against environmental pro-oxidants? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 142, p. 293–300, 2006.

MOURA, E. M. *Mapeamento do halo de dispersão formado por efluentes industriais lançados na baía do Guajará no trecho compreendido entre o bairro de Val-de-Cães e o distrito de Icoaraci*. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Geologia e Geoquímica)- Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

NASCIMENTO, F. S. *Dinâmica da Distribuição dos Poluentes Metálicos e Orgânicos nos sedimentos de fundo dos canais de drenagem de Belém, PA*. 1995. 91f. Dissertação (Mestrado em Geologia e Geoquímica) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

NASCIMENTO, S. F.; KURZWEIL, H.; WRUSS, W.; FENZL, N. Cadmium in the Amazonian Guajará Estuary: Distribution and remobilization. *Environmental Pollution*, 140, p.29-42, 2006.

NASCIMENTO, S. N. *Caracterização da assinatura isotópica de Pb atual e da concentração de metais pesados em sedimentos de fundo da foz do rio*

*GuamáedabaíadoGuajará(Belém –Pará).*2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Geologia e Geoquímica) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

OLIVEIRA, M. C. F.; ABREU, J. R. R; BARROS, A. N. F.; BEZERRA, A. C. N.; MACHADO, J. R. S.; NETO, B. S.Tendência mensal e anual das chuvas em Belém-PA, de 1896 a 2000 (105 anos). CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 12, 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: ABM, 2002.1 CD ROM.

OLIVEIRA, S. P. *Estudo da composição isotópica de Pb em organismos bentônicos, poliquetas (Namalycastisabiuma) e oligoquetas, da Baía do Guajará e rio Guamá.* 81f. 2009. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Petrologia) – Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

PANG, J.; SUN, B.; LI, H.; MEHLER, W. T.; YOU, J. Influence of bioturbation on bioavailability and toxicity of PAHs in sediment from an electronic waste recycling site in South China.*Ecotoxicologyand Environmental Safety*, 84, p. 227–233, 2012.

PINHEIRO, R. V. L. *Estudo hidrodinâmico e sedimentológico do Estuário Guajará-Belém (PA).* 1987. 185f. Dissertação (Mestrado emGeociências) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 1987.

PISANELLI, B.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; REGOLI, F. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilusgalloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere*, 77 (11), p. 1551–1557, 2009.

RAMOS-GÓMEZ, J.; MARTINS, M.; RAIMUNDO, J.; VALE, C.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; DELVALLS, T. A. Validation of *Arenicola marina* in field toxicity bioassays using benthic cages: Biomarkers as tools for assessing sediment quality. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (7), p. 1538-1549, 2011.

RE, R.; PELLEGRINO, N.; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay.*Free Radical Biology and Medicine*, 26, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.;BURDON, R.H (Ed.).*Free Radical Damage and its Control.* London:Elsevier Science B.V., 392p.1994.

ROSA, C. E.; IURMAN, M.G.; ABREU, P.C.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M.Antioxidant mechanisms of the Nereididae*Laeonereisacuta*(Annelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide.*Physiological and Biochemical Zoology*, 78, p. 641–649, 2005a.

ROSA, C. E.; SOUZA, M.S.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: characteristicsand effects on *Laeonereisacuta*(Polychaeta, Nereididae). *Marine PollutionBulletin*, 50, p. 956–964, 2005b.

ROSA-FILHO, J.S.*Diagnóstico da qualidade ambiental da Baía do Guajará (Belém-PA) utilizando indicadores químicos e biológicos (QUALIGUAJARÁ).* Relatório de pesquisa. CNPq – Edital CT Hidro 01/2003 – N°. Processo 504.308/2003-3, 2011.

SANDRINI, J. Z.; VENTURA LIMA, J.; REGOLI, F.; FATTORINI, D.; NOTTIC, A.; MARINSA, L. F.;MONSERRAT, J.M.Antioxidantresponses in

the Nereididae *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta), after cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, p. 115-120, 2008.

SANTOS, S.N.; LAFON, J.F.; CORRÊA, J.A.M.; BABINSKI, M.; DIAS, F.F.; TADDEI, M.H.T. Distribuição e assinatura isotópica de Pb em sedimentos de fundo da foz do Rio Guamá e da Baía do Guajará (Belém - Pará). *Química Nova*, 35 (2), p. 249-256, 2012.

SOUZA-HOLANDA, N. *Comportamento de metais pesados e nutrientes nos sedimentos de fundo da Baía do Guajará e Baía do Marajó*. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Petrologia) – Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

REISH, D.; GELINGER, T. A review of the toxicological studies with polychaetous annelids. *Bulletin of Marine Sciences*, 60, p. 584-607, 1997.

RISSO-DE FAVERNEY, C.; GUIBBOLINI-SABATIER, M. E.; FRANCOUR, P. An ecotoxicological approach with transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for assessing the impact of tyre reefs immersed along the NW Mediterranean Sea. *Environmental Research*, 70, p. 87-94, 2010.

SANTOS, C. S. *Variação sazonal da atividade da glutathione S-transferase e a qualidade hídrica da Baía de Guajará (Belém-PA-Amazônia)*. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SRODA, S.; COSSU-LEGUILLE, C. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*, 83, p. 538-544, 2011.

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*, 76 (4), 2008, p. 745-752.

VIARENGO, A. CANESI, L.; PERTICA, M.; LIVINGSTONE, D. R. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100, p. 187-190, 1991.

VIARENGO, A.; ABELE-OESCHGER, D.; BURLANDO, B. Effects of low temperature on prooxidants and antioxidant defence systems in marine organisms. In: PORTNER HO, PLAYLE R. (Ed.). *Cold Ocean Physiology*. London: Cambridge University Press, p. 213-235, 1998.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, p. 281-300, 2007.

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

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1984.

## **ANEXOS**

## ANEXO A- PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO FOXMODIFICADO PARA O POLIQUETA NAMALYCASTIS ABIUMA

Os poliquetas utilizados nesta análise foram coletados no estuário Guajarinó em fevereiro de 2011. Devido ao peso e tamanho reduzido dos animais ( $0,042 \pm 0,004$  g), foi necessária a composição de pools de organismos, sendo utilizadas 4 amostras compostas cada uma por cerca de 10 a 15 animais.

Foram testadas duas diluições (1:9 e 1:4; peso: volume); diferentes volumes de amostras (8, 15, 20, 30 e 40  $\mu$ L para a diluição de 1:9 e 20, 30, 40 e 50  $\mu$ L para a diluição de 1:4) e distintos tempos de incubação (variando de 0 a 270 min).

Das duas diluições testadas (1:9 e 1:4) apenas a segunda (1:4) apresentou resultados mensuráveis, já que a diluição de 1:9 não apresentou incremento de absorbância detectável. Os valores de absorbância do complexo Fe III-laranja de xilenol foram estabilizados após 150 min de incubação à temperatura ambiente, apresentando os valores médios 0.011, 0.023, 0.037 e 0.051 para os volumes de amostra 20, 30, 40 e 50  $\mu$ L, respectivamente.

Deste modo, para o poliqueta *N. abiuma*, o tempo de incubação necessário para a estabilização da leitura foi de 150 min e o volume selecionado para a dosagem foi de 30  $\mu$ L.

1: Incremento da absorbância líquida a 550 nm ao longo do tempo de incubação nos distintos volumes de amostra testados para o ensaio de peroxidação lipídica pelo método de FOX. Em destaque o tempo de incubação onde ocorre a estabilização da absorbância.

