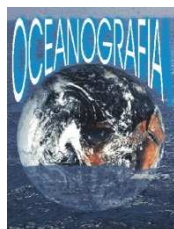




**Universidade Federal do Pará**



**Faculdade de Oceanografia**



**Instituto de Geociências**

## **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CAMILA CARNEIRO DOS SANTOS**

# **VARIAÇÃO SAZONAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE E A QUALIDADE HÍDRICA DA BAÍA DE GUAJARÁ (BELÉM-PA-AMAZÔNIA)**

**BELÉM – PARÁ  
DEZEMBRO – 2011**

CAMILA CARNEIRO DOS SANTOS

VARIAÇÃO SAZONAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA  
GLUTATIONA-S-TRANSFERASE E A QUALIDADE HÍDRICA  
DA BAÍA DE GUAJARÁ (BELÉM-PA-AMAZÔNIA)

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> Silvia Keiko Kawakami.

Belém

2011

CAMILA CARNEIRO DOS SANTOS

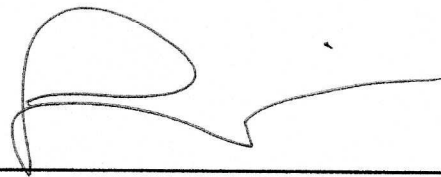
VARIAÇÃO SAZONAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA  
GLUTATIONA-S-TRANSFERASE E A QUALIDADE HÍDRICA  
DA BAÍA DE GUAJARÁ (BELÉM-PA-AMAZÔNIA)

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: 13 / 12 / 2011

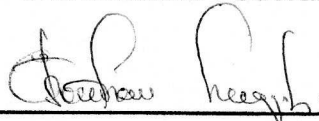
Conceito: EXCELENTE

Banca examinadora:



---

Prof.<sup>a</sup>. Silvia Keiko Kawakami - Orientadora  
Doutora em Oceanografia Química  
Universidade Federal do Pará



---

Prof. Estanislau Luczynski  
Doutor em Energia  
Universidade Federal do Pará



---

César França Braga  
Doutor em Biologia Ambiental  
Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Geólogo Raimundo Montenegro Garcia de Montalvão

---

- S237v Santos, Camila Carneiro dos  
Variação sazonal da atividade enzimática da Glutathione-S-  
Transferase e a qualidade hídrica da Baía de Guajará  
(Belém-PA-Amazônia) / Camila Carneiro dos Santos;  
Orientador: Silvia Keiko Kawakami – 2011  
54 f. : il.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em  
oceanografia) – Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Geociências, Faculdade de Oceanografia, Belém, 2012.
1. Poluição - Aspectos ambientais. 2. Biomarcadores. 3.  
Amazonia Oriental. 4.. I. Kawakami, Silvia Keiko, *orient.* II.  
Universidade Federal do Pará. IV. Título.  
CDD 20ª ed.: 577.2709811
-

Aos meus pais,  
meus eternos companheiros e educadores.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus que sempre iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Galeze e Maria Amélia, irmã, Nat, e amiga irmã, Dani, pela forma especial de me darem força e coragem, incentivando nos momentos de dificuldades.

À Profª e Orientadora Silvia K. Kawakami pela ajuda, bolsa de IC e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oceanografia Química que ajudaram nas coletas e no tratamento das amostras em laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA 205/2009), pelo apoio financeiro e bolsa de IC.

Aos professores do Instituto de Geociências que participaram de minha formação, pelos ensinamentos e contribuições científicas à minha profissão.

À Profª Lucinice Belúcio e Biólogo Alberto Farias pelo acolhimento e ensinamentos transmitidos ao longo de meu estágio no Laboratório de Biologia Aquática.

À Profª Susy Eli Gouveia pela amizade e oportunidade de trabalhar como monitora em duas disciplinas.

Aos funcionários do Instituto de Geociências pela atenção e ajuda recebidas.

À minha turma, oceano 2008, alguns pela amizade e por me tornarem uma pessoa mais confiante e profissional. Sorte e perseverança para todos nós oceanógrafos!

A todos os amigos e amigas que fiz ao longo do curso, em especial ao meu companheiro Ellery.

*"Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho."*

Thomas Jefferson

## RESUMO

A Baía do Guajará, um sistema fluvial com influência marinha, é a principal receptora da drenagem natural e de esgotos da cidade de Belém (Pará, Brasil). O material particulado tem importante papel em estuários, pois constitui a base da cadeia trófica (fração orgânica), além de servir como superfície de adsorção para agentes poluidores. Um conjunto de enzimas antioxidantes, incluindo a glutathione-S-transferase (GST), desempenha funções consideráveis na desintoxicação celular e tem sido usado como biomarcadores de estresse. Neste trabalho, determinou-se a concentração de proteínas totais e a atividade da GST no material particulado planctônico durante as estações menos chuvosa (ou seca) e chuvosa em quatro áreas ao longo da margem urbanizada do estuário guajarino: Parque Ecológico Mangal das Garças (P1), Mercado do Ver-o-peso (P2), Aeroporto Val de Cães (P3) e baixo curso do rio Maguari (P4). As amostras de material particulado foram coletadas através de arrastos horizontais com rede de plâncton (40 µm). A variação sazonal dos parâmetros hidroquímicos temperatura, salinidade, condutividade elétrica, pH e potencial redox também foi considerada. O teste *t* de Student foi empregado para comparar a atividade enzimática da GST entre as estações de coleta, e entre os períodos de amostragem. Os padrões apresentados pelas variáveis abióticas refletem uma considerável influência marinha no estuário guajarino durante o período menos chuvoso. As áreas de coleta P2 e P3 destacaram-se com maior atividade enzimática durante ambas as estações estudadas. Maior atividade da GST foi observada durante a estação seca, possivelmente devido ao menor efeito de diluição de esgotos. Tais resultados sugerem que a pressão ambiental causada pela contaminação por agentes xenobióticos provenientes de esgotos e outras fontes de contaminação estimulam a atividade antioxidante. Trabalhos complementares envolvendo a identificação das espécies planctônicas no material coletado estão em andamento e poderão auxiliar na interpretação dos resultados e na utilização do biomarcador GST na fase particulada para avaliar a qualidade hídrica da baía.

Palavras-chave: Poluição - Aspectos ambientais. Biomarcadores. Amazônia oriental.

## ABSTRACT

The Guajará Bay, a river-dominated coastal system, is the main recipient of natural and sewage drainages from the Belém city (Pará, Brazil). Particulate matter has an important role as base of food chain in aquatic environments (the organic fraction), and also serves as an adsorptive surface for pollutants. One way to detect and assess the impacts of pollutants in the environment is through the use of biomarkers. A set of antioxidant enzymes, including glutathione-S-transferase (GST), plays a significant function in cellular detoxification and has been used as stress biomarkers. In this work, we determined the concentration of total proteins and GST activities in the particulate matter during the wet and dry seasons at four stations along the urbanized margin of the Guajará Estuary: Mangal das Garças Ecological Park (P1), the fishery market Ver-o-peso (P2), Val de Cães Airport (P3) and the mouth of Maguari river (P4). Samples of particulate matter were collected along horizontal hauls using a plankton net (40  $\mu$ m). The seasonal variation of the hydrochemical parameters temperature, salinity, conductivity, pH and redox potential was also considered. Student's *t* test indicated statically significant differences in the GST activity for the sampling stations and between rainy and dry seasons. The abiotic variables reflect a significant marine influence in the Guajará Estuary during the dry season. The sampling sites P2 and P3 presented an enhanced enzymatic activity during both seasons, which seems to be linked to an environmental pressure caused by sewage contamination and other sources of pollution. Highest GST activity was also observed during dry season, possibly due to a decrease in the dilution of sewage effluents. Ongoing complementary studies involving plankton species identification will help the interpretation of the results and also to elucidate the use of GST as biomarker in the assessment of the water quality of the bay.

Key words: Pollution - Ambiental aspects. Biomarkers. Eastern Amazon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                    |                                                                                                                                                              |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01 -</b> | Reação de conjugação da GSH com um xenobiótico catalisada pela GST .....                                                                                     | 22 |
| <b>Figura 02 -</b> | Área de estudo, Baía de Guajará, com a localização dos pontos de coleta (P1- Mangal das Garças, P2- Ver-o-Peso, P3- Aeroporto e P4- Maguari) .....           | 28 |
| <b>Figura 03 -</b> | Parque Ecológico Mangal das Garças (P1) .....                                                                                                                | 28 |
| <b>Figura 04 -</b> | Mercado do Ver-o-peso (P2) .....                                                                                                                             | 29 |
| <b>Figura 05 -</b> | Proximidades do Aeroporto Internacional Val de Cães (P3).....                                                                                                | 29 |
| <b>Figura 06 -</b> | Baixo curso do rio Maguari (P4) .....                                                                                                                        | 30 |
| <b>Figura 07 -</b> | Coleta de material particulado através de arrastos horizontais com rede (40 µm) .....                                                                        | 32 |
| <b>Figura 08 -</b> | Amostras armazenadas em potes de polietileno (120 mL) e eppendorfs (1,5 mL) .....                                                                            | 32 |
| <b>Figura 09 -</b> | Registro dos dados hidroquímicos com o analisador multiparâmetros .....                                                                                      | 32 |
| <b>Figura 10 -</b> | Ultrassom e mini centrífuga utilizados para fazer a extração de proteínas e enzimas das amostras .....                                                       | 33 |
| <b>Figura 11 -</b> | Gráfico de calibração para a determinação das concentrações de proteínas totais a partir da absorbância das mesmas em um comprimento de onda de 595 nm ..... | 35 |
| <b>Figura 12 -</b> | Procedimento de laboratório durante o ensaio enzimático da GST .....                                                                                         | 36 |
| <b>Figura 13 -</b> | Absorbâncias das amostras durante o ensaio enzimático em função do tempo referentes ao período chuvoso .....                                                 | 41 |
| <b>Figura 14 -</b> | Absorbâncias das amostras durante o ensaio enzimático em função do tempo referentes ao período menos chuvoso (ou seco) .....                                 | 41 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 15 -</b> | Concentração de proteínas totais observada para as áreas estudadas .....                                                                                                                                                     | 42 |
| <b>Figura 16 -</b> | Atividade média da GST observada para as áreas estudados com os respectivos desvios à media. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre para cada um dos períodos estudados ( $p < 0,0001$ )..... | 43 |

## LISTA DE TABELAS

|                    |                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 01 -</b> | Tábua de maré utilizada nos períodos chuvoso e seco para definir os horários de coleta ocorridos durante a vazante (em destaque) .....                                                                                     | 31 |
| <b>Tabela 02 -</b> | Volumes utilizados na diluição da solução trabalho (0,2 mg/mL) para a construção do gráfico de calibração das concentrações de proteína .....                                                                              | 35 |
| <b>Tabela 03 -</b> | Parâmetros hidroquímicos observados nas estações de coleta referentes ao período chuvoso (1) e menos chuvoso (2) .....                                                                                                     | 39 |
| <b>Tabela 04 -</b> | Comparação, através do teste $t$ de Student, entre as atividades da GST observadas durante o período chuvoso nas diferentes estações de coleta (P1-Mangal, P2-Ver-o-peso, P3-Aeroporto e P4-Maguari) .....                 | 43 |
| <b>Tabela 05 -</b> | Comparação, através do teste $t$ de Student, entre as atividades da GST observadas durante o período menos chuvoso (ou seco) nas diferentes estações de coleta (P1-Mangal, P2-Ver-o-peso, P3-Aeroporto e P4-Maguari) ..... | 44 |
| <b>Tabela 06 -</b> | Resultados do teste $t$ de Student quando comparadas as atividades da GST observadas dentro de um mesmo ponto de coleta em diferentes condições sazonais .....                                                             | 44 |

## SUMÁRIO

|              |                                                                     |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                             | <b>13</b> |
| 1.1          | OBJETIVOS .....                                                     | 15        |
| 1.1.1        | <b>Objetivo geral</b> .....                                         | <b>15</b> |
| 1.1.2        | <b>Objetivos específicos</b> .....                                  | <b>15</b> |
| <b>2</b>     | <b>CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ÁREA DE ESTUDO</b> .....               | <b>16</b> |
| 2.1          | BAÍA DO GUAJARÁ .....                                               | 16        |
| 2.2          | CLIMA .....                                                         | 17        |
| 2.3          | HIDRODINÂMICA .....                                                 | 18        |
| <b>3</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                  | <b>19</b> |
| 3.1          | MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO NOS ESTUÁRIOS<br>AMAZÔNICOS ..... | 19        |
| 3.2          | COMUNIDADE PLANCTÔNICA .....                                        | 20        |
| 3.3          | GLUTATIONA-S-TRANSFERASE .....                                      | 22        |
| 3.4          | PARÂMETROS HIDROQUÍMICOS .....                                      | 24        |
| <b>3.4.1</b> | <b>Temperatura</b> .....                                            | <b>24</b> |
| <b>3.4.2</b> | <b>Salinidade</b> .....                                             | <b>24</b> |
| <b>3.4.3</b> | <b>Condutividade</b> .....                                          | <b>25</b> |
| <b>3.4.4</b> | <b>Potencial hidrogeniônico (Ph)</b> .....                          | <b>26</b> |
| <b>3.4.5</b> | <b>Potencial redox (Eh)</b> .....                                   | <b>26</b> |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                    | <b>28</b> |
| 4.1          | LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....                                 | 28        |
| 4.2          | AMOSTRAGEM .....                                                    | 31        |
| 4.3          | MÉTODOS DE ANÁLISE .....                                            | 33        |
| <b>4.3.1</b> | <b>Técnicas de extração</b> .....                                   | <b>33</b> |
| <b>4.3.2</b> | <b>Proteínas totais</b> .....                                       | <b>34</b> |
| <b>4.3.3</b> | <b>Ensaio enzimático da glutaciona-s-transferase</b> .....          | <b>36</b> |
| <b>4.3.4</b> | <b>Análise estatística: <i>Teste t de Student</i></b> .....         | <b>38</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                 | <b>39</b> |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                              | <b>46</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                            | <b>48</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Estuários são corpos de água costeiros semifechados com livre conexão com o oceano, estendem-se rio acima até o limite da influência da maré e em seu interior a água do mar é mensuravelmente diluída pela água doce oriunda da drenagem continental (PRITCHARD, 1981). Os estuários constituem os únicos sistemas aquáticos onde ocorre a interação dinâmica entre as águas marinhas, as águas doces, o sistema terrestre e a atmosfera (DAY JR et al., 1989).

Este ambiente transicional representa um ecossistema de elevada importância biológica e socioeconômica. Sua abundante e diversificada comunidade assim como a capacidade de renovação periódica de suas águas faz com que esses ecossistemas sejam altamente produtivos (KNOX, 1986). Pela proximidade da costa, os estuários têm sido intensamente povoados e influenciados direta ou indiretamente por diversas atividades antrópicas (KNOX, 1986; KENNISH, 1986), a exemplo da introdução de poluentes que podem acarretar em sua contaminação (MIRANDA; CASTRO; KJERFVE, 2002).

A Baía de Guajará situada na região flúvio-estuarina do Golfão Marajoara, foz do Rio Amazonas, recebe contribuição hídrica e sedimentar dos rios Guamá, Acará e Pará. Em suas margens localiza-se a capital do estado do Pará (Belém) e sua região metropolitana. O fato de a fundação da cidade de Belém ter acontecido às margens da Baía do Guajará fez com que essa área funcionasse como o principal polo econômico, social e industrial da cidade durante séculos, motivo pelo qual seu histórico estar relacionado com uma degradação ambiental (BERREDO et al., 2003).

Há na área de estudo um intenso tráfego de embarcações assim como transporte e venda de combustíveis em postos flutuantes, atividades relacionadas ao armazenamento e transporte de derivados de hidrocarbonetos no Terminal Petroquímico de Miramar (MIRANDA, 2006). Pequenos derrames e descartes de produtos derivados de petróleo na água podem servir como fontes pontuais de poluição por hidrocarbonetos e metais pesados comprometendo à biota existente na área devido à indução de efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos sobre organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

Este corpo aquático é o principal receptor da drenagem natural e de esgotos da cidade de Belém. Os efluentes chegam até a Baía do Guajará por meio de pequenos rios, igarapés e furos que antigamente drenavam toda a área continental

da cidade, mas que atualmente encontram-se contaminados e muitos deles são canais de esgoto a céu aberto (MIRANDA, 2007).

Efluentes domésticos possuem elevadas concentrações de compostos fosfatados que normalmente são assimilados como nutrientes pelo fitoplâncton acarretando em um crescimento anômalo desta comunidade e, posteriormente, a decomposição deste excesso de matéria orgânica consumirá grande parte do oxigênio biodisponível afetando o restante da cadeia trófica do ambiente aquático (BAIRD; CANN, 2011).

O material particulado tem importante papel em estuários, pois sua fração orgânica constitui a base da cadeia trófica deste ecossistema, além de servir como superfície de adsorção e transporte para agentes poluidores (BAPTISTA NETO; WALLNER-KERSANACH; PATCHINEELAM, 2008). As descargas consideráveis durante e logo após o período chuvoso aumentam o transporte e a concentração de material particulado em suspensão. Uma forma de detectar e avaliar o impacto de poluentes em um ambiente é através do uso de biomarcadores. A monitorização biológica da exposição aos agentes químicos significa a medida da substância xenobiótica ou seus metabólitos em vários meios (AMORIM, 2003), um deles seria a própria célula de pequenos organismos como a comunidade planctônica.

A avaliação biológica da exposição às substâncias químicas só é possível quando estiverem disponíveis suficientes informações toxicológicas referentes ao mecanismo de ação e/ou à toxicocinética dos agentes químicos citotóxicos aos quais os indivíduos estão expostos (AMORIM, op. cit.). A atividade de enzimas antioxidantes diante de contaminantes pode fornecer provas de toxicidade ecologicamente relevantes (MARTÍN-DÍAZ et al., 2004). A enzima glutathione-S-transferase (GST) desempenha ações consideráveis na desintoxicação de xenobióticos por catalisar a conjugação da proteína glutathione reduzida a uma variedade de substratos citotóxicos (MACDONALD; JONES; KING, 1991) mais facilmente eliminados das células.

O presente trabalho objetiva investigar a atividade da enzima GST visando relacionar tal biomarcador com a qualidade hídrica do estuário guajarinense e fornecer linha de base para a composição antioxidante do material particulado da região.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Contribuir na avaliação da qualidade hídrica da Baía de Guajará (Belém-PA) através do uso de biomarcadores e material particulado em suspensão, e no estabelecimento de linhas de base para a composição de antioxidantes deste estuário amazônico.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Adequar o protocolo analítico para proteínas totais em material particulado em suspensão;
- Adequar o protocolo de ensaio enzimático da glutathione-S-transferase (GST) para material particulado;
- Investigar a variação sazonal dos parâmetros hidroquímicos temperatura, salinidade, condutividade, pH e EH;
- Determinar a variação sazonal da concentração de proteínas totais da Baía de Guajará;
- Investigar a variação sazonal da atividade da enzima glutathione-S-transferase no material particulado da Baía do Guajará;
- Relacionar a atividade enzimática da GST com a qualidade hídrica da Baía de Guajará.

## 2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ÁREA DE ESTUDO

### 2.1 BAÍA DO GUAJARÁ

A desembocadura do rio Amazonas abrange uma área de cerca de 60.000 km<sup>2</sup>, onde na parte sul forma-se um estuário com mais de 200 km de extensão, que inclui a baía do Marajó e a porção sul do estuário do rio Pará, no qual está inserida a baía do Guajará, com aproximadamente 35 km de extensão (PINHEIRO, 1987).

Várias bacias hidrográficas sofrem influência da baía do Guajará dentre elas destacam-se as bacias Tamandaré, Comércio Reduto, Armas, Una, Val-de-cães, Cajé, Tapanã e do Paracuri (BELÉM, 1997). O estuário Guajarino recebe efluentes de 30 km de drenagens naturais, em parte transformadas em canais, como o Una que é o mais longo dentre todos.

O estuário Guajarino é constituído por uma parte continental e uma região insular separadas por inúmeros rios, furos, igarapés e canais de maré. Na margem esquerda da Baía do Guajará situam-se uma grande quantidade de ilhas, como a Ilha das Onças, Jararaca, Mirim, Combú e Jutuba, enquanto que na margem direita, está a cidade de Belém (PINHEIRO, op. cit.).

A Baía do Guajará apresenta-se como um corpo de águas ligeiramente ácidas, raramente chegando a alcalinas, com temperaturas elevadas, de pouca transparência e estreita faixa de variação nos teores de sais dissolvidos (PAIVA, 2006), além de ser dominada por mesomarés semi-diurnas com alcance médio de 3 m (SOUZA FILHO et al., 2004).

## 2.2 CLIMA

O clima da área estudada é classificado como tropical úmido sem estação fria, com temperaturas médias anuais que variam entre 29°C e 34°C, baixas amplitudes térmicas diárias, os índices de umidade relativa do ar raramente são menores que 70% (oscilando em torno de 90%), a menor precipitação mensal é sempre superior a 60 mm e o total pluviométrico superior a 2.500 mm. Esses dados são indicativos de uma região com bastante calor e umidade (BASTOS; PACHECO, 2001).

São comuns precipitações pluviométricas, ditas de convecção, trazidas pelos ventos NE sobre a Baía do Guajará e ilhas adjacentes (OLIVEIRA et al., 2002). A região não apresenta meses secos bem definidos, além de não existir uma repartição muito uniforme das chuvas durante o ano; o que ocorre é uma sensível diminuição mensal das precipitações a partir do mês de junho, geralmente atingindo índices mínimos em torno de outubro e novembro (SUDAM, 1984). O regime das chuvas exerce uma grande influência sobre os rios da região, que por sua vez interferem particularmente no estuário de Guajará (MORAES et al., 2005).

### 2.3 HIDRODINÂMICA

O estuário Guajará representa um ambiente caracterizado por uma alta energia, e como consequência não apenas a fisiografia como ainda o próprio relevo da calha estuarina está sujeito às modificações periódicas relativamente rápidas (PINHEIRO, 1987). A superfície das águas guajarinas, mesmo em condições de ventos fracos, caracteriza-se como um sistema relativamente agitado, sobretudo pela ação das correntes de marés que com a presença frequente de ondulações irregulares define um regime de fluxo turbulento (MONTEIRO, 2006).

Apesar da forte imposição das correntes e das marés, as ondas, de até 1,5 m, geradas pelos ventos representam um importante agente na dinâmica deste sistema, o qual propicia a mistura das águas e constante ressuspensão dos sedimentos de fundo nos bancos e margens (CORDEIRO, 1987). Além disso, promovem degradação, principalmente, na margem urbanizada do estuário e, por outro lado, criam situações agradação em locais específicos.

O sistema hidrodinâmico da Baía do Guajará segue um padrão de circulação uniforme, que no período entre a preamar e baixa-mar tende a ser homogêneo (PINHEIRO, op. cit.). Neste sistema de elevada energia, a dinâmica das águas, a sazonalidade e, sobretudo a entrada da maré salina provocam alterações nas propriedades físico-químicas dessas águas, modificando também a concentração e composição do material particulado em suspensão (CORDEIRO, op. cit.; PINHEIRO op. cit.).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO EM ESTUÁRIOS AMAZÔNICOS

De acordo com Sioli (1985), as águas amazônicas diferem em sua composição, sendo possível dividi-las em três classes: rios de águas brancas, rios de águas pretas e rios de águas claras.

A Baía do Guajará apresenta características que a incluem na classe de águas brancas. Nestas águas é observada uma intensa produção primária devido a sua riqueza em cátions, principalmente cálcio e magnésio, e a grande carga de sedimentos argilosos em suspensão é advinda dos Andes, conferindo a essas águas uma tonalidade “café com leite” (SIOLI, op. cit.).

Esse tipo de água é caracterizado por elevada condutividade e pH de neutro à levemente alcalino devido à composição das rochas do terreno de drenagem, porém as características dessas águas vêm sendo alteradas pela ação do homem ao longo dos anos devido ao crescimento urbano industrial de Belém (AGOSTINHO, 2005).

Egler e Shwassmann (1962) baseiam-se em duas possibilidades para explicar a proveniência do material em suspensão no estuário Guajarino: o mesmo é originado no baixo curso do rio Guamá e é colocado em suspensão pelo fluxo de entrada das águas de maré em seu curso; ou é proveniente das margens deste rio quando estas são inundadas durante as marés altas.

Além da natureza geológica da bacia de drenagem dos rios brasileiros, as das fortes chuvas tropicais contribuem para lixiviação dos componentes de solos expostos erodidos ou agricultados, transportando partículas de argila, silte, fragmentos de rocha e óxidos metálicos do solo para dentro dos ambientes aquáticos, o que eleva o valor da fração inorgânica do material particulado em suspensão (BRIGANTE, 2003). Dificilmente a Baía do Guajará pode ser considerada fonte de material em suspensão, a partir de enchentes nas suas margens, devido a sua expressiva largura (MONTEIRO, 2006).

### 3.2 COMUNIDADE PLANCTÔNICA

O material particulado em suspensão – além de apresentar partículas de argila, silte, e óxidos metálicos – é constituído também por uma fração orgânica. Segundo Vinay, Abbas e Nelson (2005), os microrganismos estão muito distribuídos na natureza e sua abundância e diversidade podem ser usadas como indicador para inferir a situação da qualidade da água.

A maioria dos filos de animais marinhos está representada no zooplâncton, seja ao longo de todo o ciclo de vida ou apenas na fase larvar (BONECKER, 2006). Além do papel central na dinâmica de um ecossistema aquático, o zooplâncton pode ser um eficiente bioindicador de condições ambientais. O tamanho pequeno de suas espécies favorece sua distribuição pelas correntes e facilita o reconhecimento de problemas em áreas adjacentes, enquanto seus ciclos de vida curtos fornecem respostas rápidas às modificações ambientais (ARORA, 1966; DAY JR et al., 1989).

Levantamentos da comunidade zooplanctônica realizados por Lobato et al. (2009) na Baía do Guajará, proximidades do rio Maguari, durante o período de menor pluviosidade identificaram os grupos Rotifera, Mollusca Gastropoda (larvas), Cladocera, Copepoda Cyclopoida e Calanoida e Insecta (larvas). Destacando-se em termos de abundância os copépodos ciclopóideos dos gêneros *Thermocyclops* e *Oithona*.

Durante o período chuvoso, Rodrigues, Góes da Silva e Belucio (2008) identificaram no estuário guajarino os seguintes grupos: Protista Ciliophora, Rotifera, Mollusca Gastropoda (larvas), Polychaeta (larvas), Cladocera e Copepoda Cyclopoida e Calanoida. Os gêneros mais representativos pertenciam também aos copépodos ciclopóideos, com destaque para *Thermocyclops* e *Microsetella*. As espécies *Thermocyclops minutus* (Copepoda Cyclopoida) e *Moina minuta* (Cladocera) são espécies oligohalinas e se destacaram como grupos característicos na área durante todo o ano (LOBATO, op. cit.).

A população fitoplanctônica do estuário guajarino mostrou-se semelhante àquela já observada em outros estuários brasileiros, ou seja, uma presença considerável de diatomáceas marinhas eurialinas, as quais dominam durante todo o ano sobre os demais grupos. De acordo com Ryley (1967) e Smayda (1983), as diatomáceas destacam-se como os principais organismos do microfitoplâncton estuarino e, na maioria dos casos, elas constituem a maior percentagem das

microalgas presentes. A composição específica do microfítoplâncton da Baía do Guajará revelou as diatomáceas como o grupo de maior representação, as quais apresentaram uma participação de 56,2% na composição florística (PAIVA et al., 2006).

Entre os gêneros de diatomáceas que compõe a comunidade fitoplanctônica do estuário do Guajará, destacam-se, em termos de diversidade, *Coscinodiscus*, *Surirella*, *Actinoptychus*, *Biddulphia*, *Actinocyclus*, *Triceratium*, *Bacteriastrum*, *Cyclotella*, *Eunotia*, *Melosira*, *Pinnularia* e *Rhaphoneis* (PAIVA et al., op. cit.; MONTEIRO et al., 2009). Levando-se em consideração as características ecológicas da comunidade diatomológica, tem-se que 84,4% das espécies são marinhas, 11,3% são dulcícolas e 4,3% são verdadeiramente estuarinas, um indicativo da considerável penetração das espécies marinhas ao longo do estuário Guajarino.

O segundo grupo melhor representado qualitativamente no estudo de Paiva et al. (op. cit.) e Monteiro et al. (op. cit.) foi o das clorofíceas, com 45 espécies, compondo 38,8% da flora. Destacam-se os gêneros, em termos de diversidade, *Staurastrum*, *Pediastrum*, *Staurodesmus*, *Hyalotheca*, *Micrasterias*, *Desmidium*, *Dictyosphaerium* e *Xantithidium*.

As cianofíceas são as algas de menor representatividade dentro da comunidade, cerca de 5%, e apenas 6 gêneros foram identificados *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Phormidium*, *Anabaena* e *Hapalosiphon* (PAIVA et al., op. cit.; MONTEIRO et al., op. cit.). A menor contribuição das cianobactérias dentro da comunidade fitoplanctônica é um indicativo de que o corpo aquoso não está em estágio avançado de eutrofização, pois as mesmas dominam e persistem em ambientes com este tipo de condição (CARMICHAEL, 1992).

Estes organismos são capazes de sintetizar uma série de compostos nocivos à qualidade hídrica, entretanto os excretam sob a forma de substâncias tóxicas chamadas de cianotoxinas. Os gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* são os mais potencialmente produtores de cianotoxinas (AZEVEDO et al., 1994) e, como mencionado anteriormente, dois dos mesmos foram identificados na Baía do Guajará.

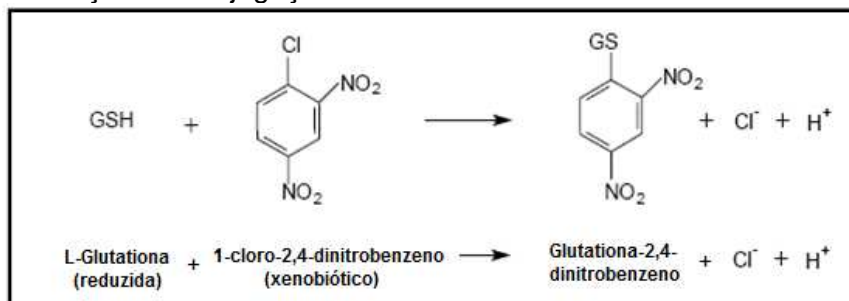
### 3.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A glutationa é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que existe nas células sob as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e, principalmente, proteção celular (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Glutationa-S-transferases (GSTs) são um grupo de enzimas de desintoxicação de xenobióticos, localizadas principalmente no citosol, que catalisam a conjugação da GSH com uma ampla gama de compostos citotóxicos (MACDONALD; JONES; KING, 1991) aumentando a sua solubilidade em água e fornecendo uma importante via de desintoxicação (Figura 01). O aumento da atividade da GST sugere maior estresse celular a poluentes através da indução da expressão de GST a fim de proteger tecidos de danos (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

Estudos realizados por Deneke e Fanburg (1989), Navarro et al. (1999) e Rover Jr., Höehr e Vellasco (2001) demonstraram que a existência de compostos xenobióticos, compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico (BAPTISTA NETO; WALLNER-KERSANACH, PATCHINEELAM, 2008), potencialmente carcinogênicos, bem como outras substâncias que levam ao estresse oxidativo celular está relacionada aos níveis de glutaciona e das enzimas que atuam no seu metabolismo, a exemplo da glutaciona-S-transferase (GST).

**Figura 01** - Reação de conjugação da GSH com um xenobiótico catalisada pela GST.



Alguns autores já utilizaram a atividade da glutaciona-S-transferase em organismos bio-indicadores como um dos parâmetros para avaliar ou monitorar a qualidade hídrica com relação a compostos organoclorados e outros xenobióticos.

García, Porte e Albaigés (2000) caracterizam sistemas enzimáticos responsáveis pela ativação e/ou detoxificação de xenobióticos em peixes do Mar Mediterrâneo, Jena, Verlecar e Chainy (2009) descrevem mudanças nas respostas ao estresse oxidativo em *Perna viridis* (molusco bivalve) coletados em locais com diferentes status de poluição nas águas costeiras de Goa (Índia), Oosterom et al. (2010) avalia biomarcadores em *Scylla serrata* (caranguejo) de quatro bacias hidrográficas australianas como potenciais indicadores da qualidade da água e condições ecológicas de ecossistemas aquáticos de regiões costeiras tropicais da Austrália e Carvalho-Neta (2011) valida a atividade da GST como biomarcador de contaminação aquática no peixe *Sciades herzbergii* (bagre) em duas áreas diferenciadas da Baía de São Marcos (MA) correlacionando-a com dados biométricos e estágios de maturação gonadal da espécie.

Estudos de biomarcadores na baía do Guajará são realizados por Silva et al. (2011) que revela a eficiência de organismos da espécie bentônica *Namalicastys abiuma* (poliqueta) como biomonitor diante a estresses oxidativos, já utilização de material particulado planctônico para se estimar a atuação de poluentes na água ainda é incipiente e foi iniciada para o estuário guajarino por Santos et al. (2011).

O biomarcador, indução de GST, é um informativo de possíveis áreas de contaminação e indicador da qualidade da água, e funciona como ferramenta auxiliar no monitoramento de ecossistemas (GARCÍA; PORTE; ALBAIGÉS, op. cit.).

## 3.4 PARÂMETROS HIDROQUÍMICOS

### 3.4.1 Temperatura

A temperatura mensura a energia cinética média de cada grau de liberdade das partículas de um sistema em equilíbrio térmico em determinado instante. Variações na temperatura ocorrem de acordo com a transferência de calor por radiação, condução e convecção, a análise deste parâmetro deve ser realizada imediatamente após a amostragem da água (BAUMGARTEN; POZZA, 2001).

Nos estuários o intercâmbio térmico é processado entre a água salgada que penetra no ambiente estuarino na preamar e a descarga de água doce do rio. Sendo, portanto as variações de temperatura neste ambiente transicional, função da temperatura da água do rio, do fluxo de água salgada, da profundidade do estuário, da taxa pluviométrica na bacia e da latitude de local (LIRA, 1978).

A temperatura torna-se importante pelo fato de funcionar como catalisadora de reações químicas e biológicas e determinar a taxa de solubilidade dos gases na coluna d'água, tanto na interface oceano-atmosfera quanto sedimento-água (CUNHA, 1982).

### 3.4.2 Salinidade

A salinidade é a quantidade, em gramas, de sais inorgânicos dissolvidos em 1 kg de água. Os formadores destes sais na água do mar são primariamente os cátions sódio, cálcio, magnésio e potássio, e os ânions cloretos, sulfatos e bicarbonatos.

Os ambientes aquáticos podem ser classificados, segundo a resolução nº 357 do CONAMA (2005), de acordo com a salinidade em:

- Águas doces – salinidade  $\leq$  a 0,5;
- Águas salobras –  $0,5 <$  salinidade  $<$  30;
- Águas salinas – salinidade  $\geq$  30.

A salinidade é importante tanto no sentido de delimitar o início e o fim de um estuário, como na distribuição dos organismos nesse ambiente, sendo muitas vezes considerada como uma barreira ecológica. A interação entre o rio e o oceano,

estabelece diversos processos de mistura, seja sob o ponto de vista físico ou sob uma perspectiva ecobiológica (FEITOSA, 1988).

Grande parte da energia que determina a intensidade da mistura das diferentes massas de água nos estuários é gerada pelas correntes de maré, que atuam em conjunto com outros fatores como: a correnteza, a vazão do rio e a ação dos ventos (KETCHUM, 1983 apud MOREIRA, 1994).

A salinidade das águas interiores não raramente pode apresentar grandes diferenças de salinidade no decorrer do ano (ESTEVES, 1988). Em regiões estuarinas, de acordo com Smayda (1983) apud Moura (1992), as condições locais de chuva, evaporação, drenagem e o grau de mistura entre água fluvial e costeira, influenciam a amplitude e o gradiente salino.

### **3.4.3 Condutividade elétrica**

A condutividade elétrica é capacidade de uma substância ou solução de conduzir corrente elétrica, tal propriedade, no caso de amostras de água, está relacionada à quantidade de íons dissolvidos na mesma e estreitamente relacionada com a salinidade. Esse fator hidroquímico pode auxiliar em avaliações de possíveis impactos ambientais que ocorram na bacia de drenagem ocasionados por influências antrópicas como despejo de efluentes (BAUMGARTEN; POZZA, 2001).

A condutividade elétrica pode variar de acordo com a temperatura e com o total de substâncias ionizáveis dissolvidas. Em águas onde o pH apresenta-se com valores extremos ( $\text{pH} > 9$  ou  $\text{pH} < 5$ ), os valores da condutividade se deve às altas concentrações das espécies iônicas  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$  em solução.

Na Baía do Guajará estudos químicos, físico-químicos e microbiológicos de Berredo et al. (2003) verificaram uma variação de 31,2 a 80,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na condutividade elétrica das águas deste estuário. O menor valor é referente a porções interiores da baía enquanto que uma maior condutividade é verificada na parte exterior do estuário Guajarino onde ocorre maior influência dos sais marinhos.

#### 3.4.4 Potencial hidrogeniônico (Ph)

O potencial hidrogeniônico consiste na atividade de prótons (íons  $H^+$ ) livres na água, provenientes tanto de fontes antrópicas quanto naturais. O pH juntamente com o potencial redox, que será detalhadamente discutido posteriormente, são capazes de alterar o estado químico de um corpo aquático, se sofrerem alterações (BAUMGARTEN; POZZA, 2001).

A resolução nº 357 (CONAMA, 2005) determina, de maneira geral, que águas doces devem apresentar pH entre 6 e 9; águas salinas, salobras e efluentes devem apresentar pH entre 5 e 9. O potencial hidrogeniônico em águas naturais constitui um dos fatores ecológicos que age como controlador e regulador dos principais processos metabólicos nos organismos (SANTOS, 1986).

Determinadas condições de pH contribuem para a precipitação de elementos químicos tóxicos e influenciam a solubilidade de nutrientes. Nos processos biológicos de tratamento de esgoto, o pH é um fator crítico para o desenvolvimento de microrganismos e em ambientes onde há atividade antrópica o pH torna-se mais ácido (SANTOS, op. cit.).

As águas superficiais amazônicas são, quase sempre, ácidas (DIAS, 1995). Essa acidez está diretamente relacionada com as elevadas concentrações de ácidos orgânicos dissolvidos tanto de origem alóctone quanto autóctone (ESTEVES, 1988). Vale ressaltar também que os argilominerais, ricos em matéria orgânica, podem produzir aumento da acidez em águas onde se encontram em grande concentração (DREVER, 1988; LEVINSON, 1974). No estuário Guajará o fator controlador das variações do pH das águas é o regime sazonal de chuvas (PINHEIRO, 1987).

#### 3.4.5 Potencial redox (Eh)

Potencial redox (Eh) ou potencial eletroquímico é a capacidade de uma solução doar ou receber elétrons. Ambientes que apresentam valores de Eh negativos são caracterizados como potencialmente redutores e os de valores positivos de Eh são tidos como potencialmente oxidantes (CYPRIANO, 2009). O potencial redox tem uma estreita relação com o aporte excedente de matéria orgânica, onde pequenas variações na entrada e degradação podem alterar o estado químico do ambiente (PERDEZOLLI, 2009).

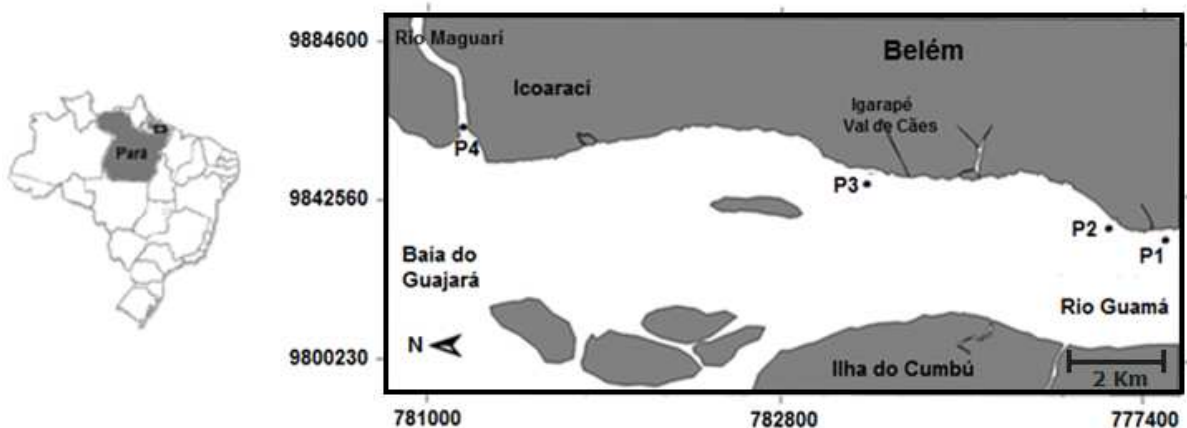
A poluição orgânica de um curso d'água pode ser avaliada pelo decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido e/ou pela concentração de matéria orgânica em termos de concentração de oxigênio necessário para oxidá-la (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997), por isso o potencial redox é uma variável importante em estudos de avaliação da qualidade hídrica. Berredo et al. (2003) encontrou valores de oxigênio dissolvido, ao longo da Baía do Guajará, que variaram sazonalmente entre 5,26 e 7,37 mg/L indicando uma característica primariamente oxidativa das águas deste estuário.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

No presente trabalho foram coletadas amostras de água superficial em 4 pontos distribuídos no Rio Guamá e na Baía do Guajará; com o último ponto localizado no baixo curso do rio Maguari em Icoarací, distrito de Belém (Figura 02).

**Figura 02** - Área de estudo, Baía de Guajará, com a localização dos pontos de coleta (P1- Mangal das Garças, P2- Ver-o-Peso, P3- Aeroporto e P4- Maguari).



O ponto P1 (zona 22 S, 777306 N e 9838385 L) está localizado próximo ao Parque Ecológico Mangal das Garças, um complexo turístico, inaugurado em janeiro de 2005, que se espalha por uma área verde de 40.000 m<sup>2</sup> (VEJA BELÉM, 2011) (Figura 03).

**Figura 03** - Parque Ecológico Mangal das Garças (P1).



O segundo ponto de coleta (zona 22 S, 777685 N e 9839337 L), P2, localiza-se nas proximidades do porto da Feira do Ver-o-Peso (Figura 04) onde ocorre uma

intensa atividade antrópica ligada à feira de pescado na margem do rio e ao constante tráfego de embarcações que liberam nesta área seus resíduos. Além disso, nesse local encontram-se postos de abastecimento flutuantes de gasolina e diesel.

**Figura 04** – Mercado do Ver-o-peso (P2).



A terceira estação de amostragem (zona 22 S, 778794 N e 9843748 L), P3, está localizado próximo ao igarapé Val de Cães, nesta área situam-se o Aeroporto Internacional Val de Cães e Terminal Petroquímico de Miramar onde é feito armazenamento e transporte de derivados de hidrocarbonetos (MIRANDA, 2006) (Figura 05).

**Figura 05** – Proximidades do Aeroporto Internacional Val de Cães (P3).



O último ponto de coleta (zona 22 S, 780994 N e 9857469 L), P4, localiza-se no baixo curso do rio Maguari (Figura 06) próximo à Icoarací, complexo portuário da cidade de Belém. É dentre as áreas estudadas a de menor influência antrópica.

**Figura 06** – Baixo curso do rio Maguari (P4).



## 4.2 AMOSTRAGEM

Durante os períodos chuvoso (março de 2011) e seco ou menos chuvoso (novembro de 2011) – sempre no estado de vazante da maré (Tabela 01) para se trabalhar com uma menor diluição de possíveis poluentes – foram realizadas coletas em quatro estações, marcadas com o uso de GSP (Global Positioning System), próximas à margem urbanizada da Baía do Guajará.

**Tabela 01** - Tábua de maré utilizada nos períodos chuvoso e seco para definir os horários de coleta ocorridos durante a vazante (em destaque). Fonte: DHN, 2011.

| 01.03.2011 (período chuvoso) |                       | 19.11.2011 (período seco) |                       |
|------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Hora                         | Amplitude de Maré (m) | Hora                      | Amplitude de Maré (m) |
| 04:45                        | 0,6                   | 04:43                     | 3,0                   |
| 09:48                        | 2,9                   | 11:30                     | 0,9                   |
| 16:48                        | 0,9                   | 17:54                     | 2,9                   |
| 21:34                        | 3,1                   | -                         | -                     |

As amostras de água superficial foram coletadas com balde e para a coleta das amostras de material particulado utilizou-se rede de plâncton (40 µm) em arrastos horizontais com 5 min de duração (Figura 07). O material foi armazenado em potes de polietileno com capacidade de 120 ml. As amostras utilizadas para análise de proteínas totais e atividade enzimática da GST foram guardadas em recipiente isolante térmico com gelo até o final da expedição de amostragem.

Ainda no dia da coleta, no Laboratório de Oceanografia Química da UFPA, as amostras armazenadas em ambiente refrigerado foram concentradas em eppendorfs (Figura 08) e preservadas em ultrafreezer a -80°C para posterior análise. Os parâmetros hidroquímicos pH, potencial redox (Eh), condutividade e temperatura foram observados *in situ*, a partir de amostras de água superficial, com analisador multiparâmetros (Figura 09).

**Figura 07** - Coleta de material particulado através de arrastos horizontais com rede (40  $\mu$ m).



**Figura 08** – Amostras armazenadas em potes de polietileno (120 mL) e eppendorfs (1,5 mL).



**Figura 09** – Registro dos dados hidroquímicos com o analisador multiparâmetros.



## 4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

### 4.3.1 Técnicas de extração

Testes para a determinação da eficiência do método de extração assim como da quantidade necessária de extrato da amostra para análise por espectrofotometria, foram realizados.

Dois métodos de extração foram testados: banho em ultrassom UltraCleaner 1450, frequência de 25 kHz, com aumento gradual de 10 min no tempo de extração e maceração manual da amostra por 15 min com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana. Em ambos os métodos, que se mostraram igualmente eficientes, foram acrescentados 500  $\mu$ L de solução tampão de fosfato ajustada a pH 6,5 para obtenção do extrato da amostra.

Optou-se pelo método de extração com ultrassom devido à praticidade. O extrato das amostras foi obtido através da concentração das mesmas em eppendorfs de 1,5 mL acrescidos de solução tampão de fosfato ajustada a pH 6,5 e posterior banho em ultrassom por 40 min, seguidos de 10 min de centrifugação (Figura 10). Estabeleceu-se, após vários testes, a utilização de alíquota de 200  $\mu$ L de extrato para a análise da GST e 500  $\mu$ L para proteína total.

**Figura 10** – Ultrassom e mini centrífuga utilizados para fazer a extração de proteínas e enzimas das amostras.



### 4.3.2 Proteínas totais

A análise da concentração de proteínas totais nas amostras de material particulado em suspensão da Baía do Guajará baseou-se no método de Bradford (1976). Este método parte-se do princípio da ligação do reagente de Bradford (corante *Coomassie brilliant blue*) com uma proteína e compara essa ligação com diferentes concentrações com uma proteína padrão, geralmente Albumina Bovina Sérica, BSA (*Bovine Serum Albumine*). A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm que pode ser acompanhado por espectrofotometria (COMPTON; JONES, 1985).

O método de Bradford é o mais rápido, sensível e está sujeito a um número bem menor de interferentes que os demais métodos espectrofotométricos mais utilizados para a determinação de proteínas totais (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Para a determinação da concentração de proteínas totais das amostras sob forma de duplicatas fez-se necessário a elaboração de um gráfico de calibração através de diluições, na faixa de 10 a 0,8 µg/mL, da proteína padrão (BSA 200 mg/mL) em tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1 M ajustado a pH 6,5. Primeiramente, uma mistura de 500 µL do padrão de proteínas com 500 µL de tampão resultou na solução trabalho de 100 mg/mL.

A solução trabalho foi diluída a 0,2 mg/mL e a partir desta segunda solução foram realizadas diluições, com os volumes utilizados detalhados na Tabela 02, para a construção do gráfico de calibração (Figura 11) utilizado para determinar a concentração das proteínas presentes na amostra através da absorbância das mesmas em 595 nm.

O volume necessário de extrato para a determinação de proteínas nas amostras foi de 500 µL ao qual foram acrescentados 500 µL de tampão de fosfato e 1000 µL do reagente de Bradford em cubeta de vidro de 3 mL de volume e 1 cm de caminho óptico. O cálculo da concentração de proteínas totais (em µg/mL) se deu através da equação obtida a partir do gráfico de calibração:

$$X = (Y - 0,5411) / 0,0592$$

Onde:

X = concentração de proteínas totais (em µg/mL);

Y = absorvância da amostra (em 595 nm).

Como o trabalho objetiva a determinação de proteínas totais no material particulado, fez-se necessário o uso da concentração em  $\mu\text{g}$  de proteína por mg da amostra. Esta concentração foi obtida através da equação:

$$\text{proteínas em } \mu\text{g/mg} = X/(\text{peso seco da amostra})$$

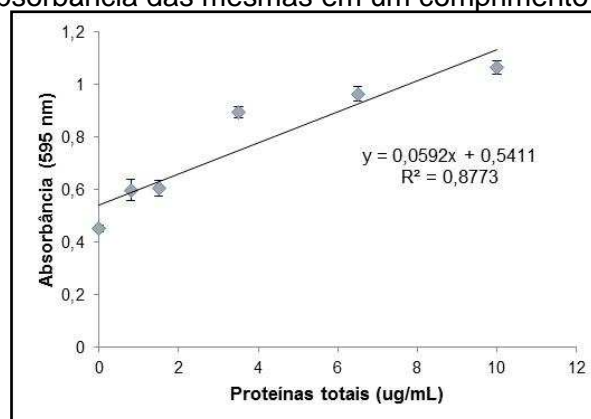
Onde:

X = concentração de proteínas totais (em  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 02** - Volumes utilizados na diluição da solução trabalho (0,2 mg/mL) para a construção do gráfico de calibração das concentrações de proteína.

| Padrão de Proteínas 0,2 mg/mL ( $\mu\text{L}$ ) | Tampão de fosfato 0,1 M ( $\mu\text{L}$ ) | Reagente de Bradford ( $\mu\text{L}$ ) | Concentração proteica ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| 0                                               | 1000                                      | 1000                                   | 0                                          |
| 8                                               | 992                                       | 1000                                   | 0,8                                        |
| 15                                              | 985                                       | 1000                                   | 1,5                                        |
| 35                                              | 965                                       | 1000                                   | 3,5                                        |
| 65                                              | 935                                       | 1000                                   | 6,5                                        |
| 100                                             | 900                                       | 1000                                   | 10                                         |

**Figura 11** - Gráfico de calibração para a determinação das concentrações de proteínas totais a partir da absorvância das mesmas em um comprimento de onda de 595 nm.



### 4.3.3 Ensaio enzimático da glutathiona-s-transferase

A glutathiona-S-transferase (GST) pode ser identificada por ensaios enzimáticos. A reação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathiona reduzida (GSH) com a formação de um conjugado pode ser acompanhada através do aumento na absorção da mistura a 340 nm em espectrofotômetro. Uma unidade da enzima irá conjugar 10 nmol de CDNB com a GSH reduzida por minuto a 25°C (MANNERVIK, 1985).

Para a execução do ensaio enzimático foram preparadas soluções estoque de CDBN 50 mM em etanol e GSH reduzida 100 mM em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M ajustado a pH 6,5. Estas soluções foram mantidas armazenadas em eppendorfs de 1,5 mL e conservadas a -20°C.

A análise do branco, necessária para minimizar possíveis interferentes no método, foi feita através da mistura sem adição de amostra (em uma cubeta de vidro de 3 mL), contendo apenas de 1940  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato (aquecido a 30°C), 20  $\mu\text{L}$  da GSH reduzida e 40  $\mu\text{L}$  do CDBN; a leitura foi observada em espectrofotômetro na faixa de 340 nm por 10 min.

Através de testes com diversas alíquotas do extrato (10 a 500  $\mu\text{L}$ ), observou-se que o melhor volume de extrato para os ensaios enzimáticos foi de 200  $\mu\text{L}$ . Deste modo, para a leitura da atividade enzimática acrescentou-se aos 200  $\mu\text{L}$  de extrato, 1740  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato (aquecido a 30°C), 20  $\mu\text{L}$  da GSH reduzida e 40  $\mu\text{L}$  do CDBN. Assim como o branco, a leitura das amostras foi observada em espectrofotômetro na faixa de 340 nm por 10 min (Figura 12).

**Figura 12** – Procedimento de laboratório durante o ensaio enzimático da GST.



A atividade da GST das amostras sob forma de duplicatas, em U/min, foi obtida através da fórmula descrita por Habig, Pasbt e Jakoby (1974):

$$[(\Delta_{340}/\text{min}) / 0,0096 \mu\text{M}^{-1}/\text{cm}] \times (2,0 \text{ mL}/0,2 \text{ mL}) \times \text{fator de diluição}$$

Onde:

$\Delta_{340}/\text{min}$  é taxa de reação no trecho linear da curva já subtraída do branco;

$0,0096 \mu\text{M}^{-1}/\text{cm}$  é o coeficiente de extinção molar do CDNB para as condições experimentais;

2,0 mL é o volume total utilizado na cubeta para a leitura da absorbância;

0,2 mL (equivalente a 200  $\mu\text{L}$ ) é o volume de estrado da amostra utilizado no ensaio enzimático;

Fator de diluição foi considerado igual a 1, já que inexistiu durante a análise.

Na análise final a atividade da GST é dada em U/min/mg de proteína, por isso a determinação da concentração de proteínas totais nas amostras ser fundamental.

#### 4.3.4 Análise estatística: *Teste t de Student*

Os métodos estatísticos, a partir do século XX, foram desenvolvidos como uma mistura de ciência, tecnologia e lógica para a solução e investigação de problemas em várias áreas do conhecimento humano. A estatística moderna é uma tecnologia quantitativa para a ciência experimental e observacional que permite avaliar e estudar as incertezas e os seus efeitos no planejamento e interpretação de experiências e de observações de fenômenos da natureza e da sociedade (RAMOS, 2004).

O teste *t* de Student é utilizado para verificar se a média entre diferentes grupos é significativamente diferente. O objetivo deste teste estatístico é comparar as diferenças entre as duas situações experimentais com a variabilidade total nos resultados. Quando os mesmos sujeitos são usados em ambas as situações pode-se comparar pares de resultados obtidos por cada indivíduo quando sujeito a ambas as situações (FIGUEIREDO, 2008).

As diferenças previstas são calculadas como uma diferença entre os resultados médios entre os dois grupos. Os valores de *p* são dados na forma de *p* unilateral (diferença para mais ou para menos) e *p* bilateral (diferença para mais e para menos).

A estatística *t* apresenta o tamanho das diferenças entre os resultados dos sujeitos para as duas situações e a variância total, e para a realização desta análise estatística foi utilizado o software BioEstat 5.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores dos parâmetros hidroquímicos referentes às coletas durante os períodos chuvoso e menos chuvoso ou seco encontram-se na Tabela 03. Os parâmetros hidroquímicos observados durante o período menos chuvoso mostraram-se, quando comparados com os dados do período chuvoso, compatíveis com a condição sazonal.

**Tabela 03** - Parâmetros hidroquímicos observados nas estações de coleta referentes ao período chuvoso (1) e menos chuvoso (2).

| Estação de Coleta | pH   |      | Eh (mV) |     | Salinidade |      | Condutividade (µS/cm) |        | Temperatura da água (°C) |      |
|-------------------|------|------|---------|-----|------------|------|-----------------------|--------|--------------------------|------|
|                   | 1    | 2    | 1       | 2   | 1          | 2    | 1                     | 2      | 1                        | 2    |
| Mangal (P1)       | 5,75 | 5,49 | 78      | 79  | 0          | 0,6  | 31                    | 1.290  | 28,2                     | 29,4 |
| Ver-o-peso (P2)   | 5,62 | 6,24 | 83      | 50  | 0          | 0,7  | 26                    | 1.315  | 28,3                     | 27,7 |
| Aeroporto (P3)    | 5,85 | 7,4  | 71      | 6   | 0          | 1,9  | 38                    | 3.670  | 28,2                     | 32,1 |
| Maguari (P4)      | 5,79 | 7,39 | 74      | -11 | 0          | 11,9 | 38                    | 19.860 | 28,6                     | 30,7 |

A temperatura média da água durante a coleta, 30°C, em novembro de 2011 apresentou-se 2°C mais elevada do que a observada em março do mesmo ano, caracterizando uma pequena e não significativa oscilação da temperatura nas águas superficiais do estuário do Guajará nos períodos seco e chuvoso, fato comum apresentado pelas águas desta região (CORDEIRO, 1987; DIAS, 1995; LIMA; KOBAYASHI, 1988; PINHEIRO, 1987). Os grandes volumes de água descarregada, às turbulências causadas pelos ventos e às correntes de marés, tornam o estuário bastante homogêneo termicamente (CORDEIRO, op. cit.).

As diferenças nas águas amazônicas vão além das cores. Rios de água preta são ácidos (pH 3,7 a 5,8), pobres em íons e ricos em matéria orgânica dissolvida. Por outro lado, rios de água branca, têm pH próximo à neutralidade (6,3 a 7,2), são ricos em sais e em partículas minerais em suspensão. Rios de águas claras possuem uma heterogeneidade com relação ao pH (entre 4,5 e mais de 7) e condutividade elétrica (entre 6 e mais que 50 µS/cm), as formações rochosas por onde estas águas percorrem são antigas e quase não são corroídas por isso a diminuta quantidade de material em suspensão (FURCH; JUNK; KLINGE, 1982).

Os valores de pH não apresentaram variações consideráveis ao longo dos pontos de coleta, os valores relativamente baixos, em se tratando de águas brancas, obtidos para o pH durante a estação chuvosa se deve ao fato do grande aporte de matéria orgânica carregado e inserido na baía pelos rios. Enquanto que os valores menos ácidos, até mesmo próximos a 8 nos pontos 3 e 4, observados durante a estação seca podem estar associados a maior entrada de água marinha na baía do Guajará, o mesmo constatado por Monteiro (2006) que relaciona também relaciona a diluição das águas terrestres pelas chuvas e a redução da quantidade das substâncias tampão provenientes do solo e subsolo.

Sioli (1957) caracteriza, de modo geral, as águas da Amazônia como ácidas devido à presença de ácidos orgânicos provenientes dos solos das cabeceiras, contribuição de argilominerais presentes no material particulado em suspensão e decomposição de substâncias orgânicas naturais.

O potencial redox (Eh), durante a estação chuvosa, variou entre 71 mV (P3) e 83 mV (P2) caracterizando o ambiente como predominantemente antioxidante. Os valores observados no período seco indicam uma tendência à característica menos oxidante, e até mesmo redutora (-11 mV) no P4 que pode estar relacionada à maior penetração de águas salinas na baía do Guajará.

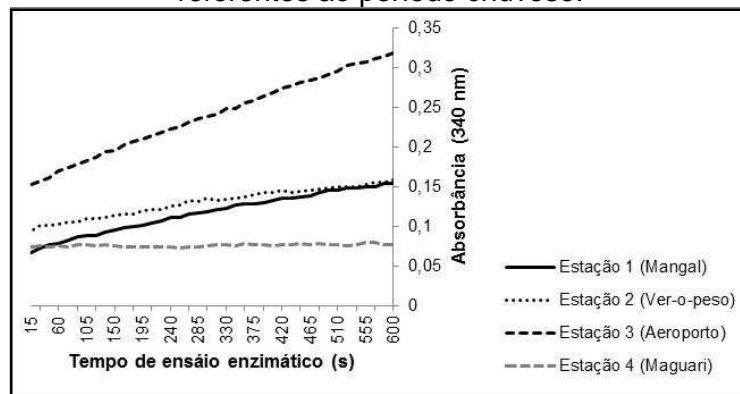
A salinidade, que durante o período chuvoso apresentou valores tão pequenos não podendo ser detectados pelo equipamento, variou de 0,6 a 11,9 ao longo das estações de coleta durante o período seco. Vale ressaltar que ambas as coletas foram realizadas durante o estágio de vazante da maré e que neste período a influência marinha sobre os estuários em geral é menor caso se compare com o estágio de enchente, sendo esperados valores mais elevados tanto da condutividade elétrica quanto da salinidade neste último estágio.

A condutividade elétrica mostrou-se máxima nas estações 3 e 4 durante o períodos menos chuvoso, 38  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . O maior valor deste parâmetro hidroquímico, durante o período menos chuvoso, foi observado no P4, 19.860  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , estação de coleta que mesmo localizada no baixo curso do rio Maguari é mais próxima do oceano. Os valores de pH e condutividade, descritos para a estação chuvosa, podem ser considerados típicos para regiões com influência intensa de rios amazônicos (TUNDISI; TUNDISI, 2008). Os elevados valores de condutividade, principalmente observado na quarta estação de coleta em novembro de 2011, remetem às condições de maior influência oceânica sobre a baía do Guajará durante

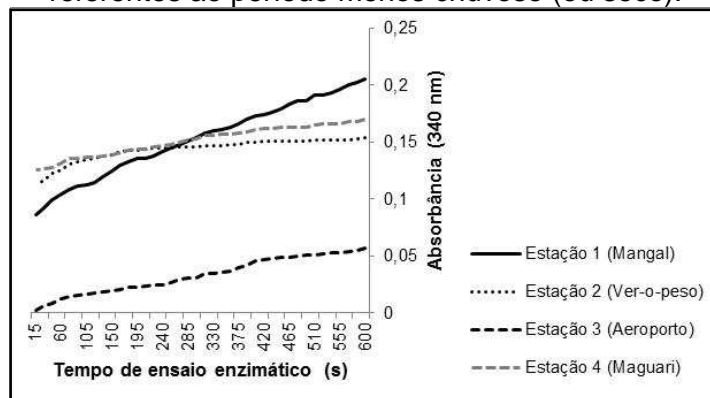
o período menos chuvoso. Os padrões apresentados pelas variáveis salinidade e condutividade colaboram também na ideia sobre uma maior influência marinha no estuário guajarino durante a estação seca, pois apresentaram valores mais elevados durante este período.

A atividade enzimática da GST comportou-se, com relação à absorbância no comprimento 340 nm, como esperado, apresentando um incremento na taxa de absorção da radiação visível conforme o aumento do tempo reacional (Figuras 13 e 14). A GST, no período de maior pluviosidade, apresentou atividade mais elevada (em U/min) para a amostra P3 coincidindo com a maior concentração proteica, 136,14  $\mu\text{g/g}$  (Figura 15). Para o período menos chuvoso observou-se a maior atividade da GST (em U/min) no P1 e concentração proteica no P4.

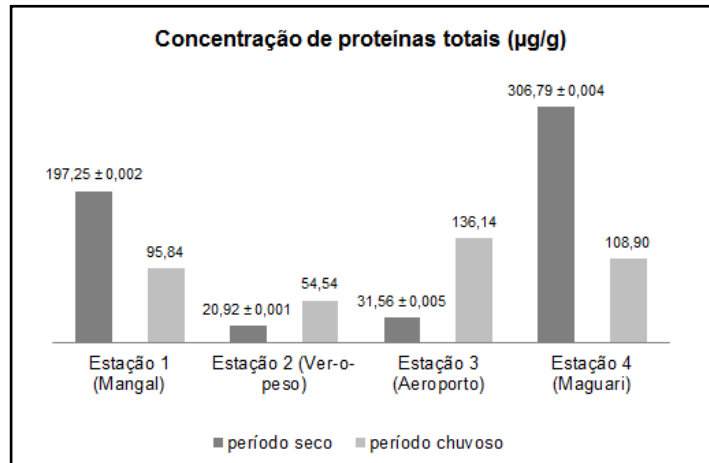
**Figura 13** - Absorbâncias das amostras durante o ensaio enzimático em função do tempo referentes ao período chuvoso.



**Figura 14** - Absorbâncias das amostras durante o ensaio enzimático em função do tempo referentes ao período menos chuvoso (ou seco).



**Figura 15** – Concentração de proteínas totais observada para as áreas estudadas.



A amostras da estação 4 apresentaram baixa atividade enzimática quando comparadas com as das demais estações estudadas (Figura 16), o que é consistente com a ausência de fontes diretas de contaminações para esse local e com a constante mistura e diluição das águas do rio Maguari com as da baía do Guajará. Por outro lado, para a mesma estação foi observada a segunda maior concentração de proteínas totais, 109 µg/g, durante a estação chuvosa.

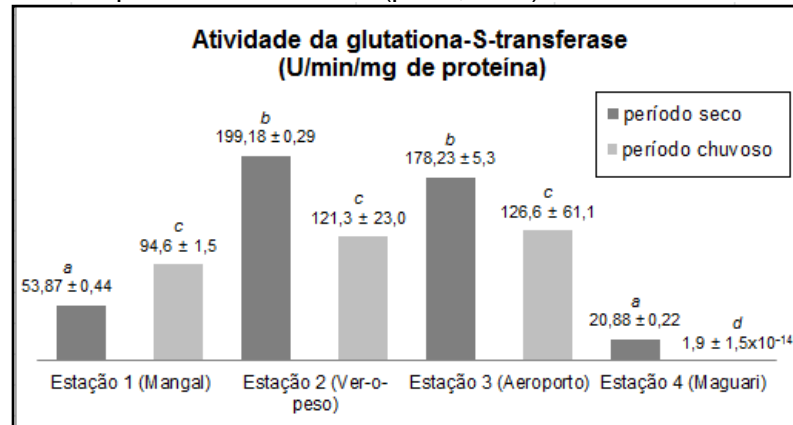
O período menos chuvoso, de maneira geral, apresentou uma tendência ao aumento da atividade da GST nas áreas de amostragem; exceto o P1, onde foi observada uma queda de 94,56 para 53,87 U/min/mg de proteína na taxa da atividade desta enzima. A maior concentração proteica observada, 197,24 µg/g, ocorreu na terceira estação de coleta, assim como no período chuvoso.

A amostra da estação 4, referente à estação seca, novamente apresentou a mais baixa atividade enzimática quando comparada com as das demais estações estudadas, 20,88 U/min/mg de proteína, em contrapartida resultou na maior concentração de proteínas totais.

O teste *t* de Student realizado para comparar a atividade da GST nas diferentes áreas estudadas revelou que no período chuvoso, a atividade enzimática da glutathione-S-transferase no P4 (rio Maguari) mostrou-se estatisticamente diferente ( $p < 0,0001$ ), quando comparado aos demais pontos de coleta. P1, P2 e P3 foram estatisticamente similares (Tabela 04) neste período. Durante a estação seca, a atividade da GST também foi inferior no P4, quando comparado aos pontos P2 e P3, mas não em relação ao ponto P1; ao qual se mostrou estatisticamente semelhante ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 05). P1 e P4 foram

estações de coleta que apresentaram mudanças significativas entre os períodos estudados ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 06).

**Figura 16** - Atividade média da GST observada para as áreas estudadas com os respectivos desvios à media. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre para cada um dos períodos estudados ( $p < 0,0001$ ).



O maior atividade da GST nas estações 2 e 3, em ambos os períodos estudados, assim como elevados concentrações de material particulado orgânico e total em suspensão observados por Aquino *et al.* (2011) em estudo paralelo, sugerem a existência de um maior estresse nos pontos P2 e P3, pois o incremento na atividade desta enzima antioxidante representa um mecanismo de proteção das células aos danos oxidativos causados por xenobióticos.

**Tabela 04** – Comparação, através do teste *t* de Student, entre as atividades da GST observadas durante o período chuvoso nas diferentes estações de coleta (P1-Mangal, P2-Ver-o-peso, P3-Aeroporto e P4-Maguari).

| Estações de Coleta | p (uni)  | p (bi)   |
|--------------------|----------|----------|
| P1 X P2            | 0,12     | 0,24     |
| P1 x P3            | 0,29     | 0,59     |
| P1 X P4            | < 0,0001 | < 0,0001 |
| P2 X P3            | 0,45     | 0,91     |
| P2 X P4            | 0,04     | 0,08     |
| P3 X P4            | 0,10     | 0,21     |

**Tabela 05** - Comparação, através do teste *t* de Student, entre as atividades da GST observadas durante o período menos chuvoso (ou seco) nas diferentes estações de coleta (P1-Mangal, P2-Ver-o-peso, P3-Aeroporto e P4-Maguari).

| Estações de Coleta | p (uni)  | p (bi)   |
|--------------------|----------|----------|
| P1 X P2            | < 0,0001 | < 0,0001 |
| P1 x P3            | 0,24     | 0,48     |
| P1 X P4            | < 0,0001 | < 0,0001 |
| P2 X P3            | 0,37     | 0,74     |
| P2 X P4            | < 0,0001 | < 0,0001 |
| P3 X P4            | 0,20     | 0,41     |

**Tabela 6** – Resultados do teste *t* de Student quando comparadas as atividades da GST observadas dentro de um mesmo ponto de coleta em diferentes condições sazonais.

| Estação de Coleta | p (uni)  | p (bi)   |
|-------------------|----------|----------|
| Mangal (P1)       | < 0,0001 | < 0,0001 |
| Ver-o-peso (P2)   | 0,34     | 0,69     |
| Aeroporto (P3)    | 0,36     | 0,72     |
| Maguari (P4)      | < 0,0001 | < 0,0001 |

Fatores naturais, como o efeito da sazonalidade, podem alterar tanto a densidade quanto a diversidade da biomassa particulada em suspensão e, como consequência, a atividade enzimática da GST. Paiva et al. (2006) demonstrou que o ciclo anual fitoplanctônico da baía do Guajará apresenta aumento considerável da biomassa durante o período seco; característico de ambientes onde a influência terrígena é forte durante o período chuvoso, a ponto de provocar a diminuição da transparência da água (ESKINAZI-LEÇA, 1990).

Mesmo existindo um efeito sazonal sobre a composição da comunidade planctônica, os valores elevados de atividades da GST coincidem com a proximidade de fontes pontuais de poluição. Silva (2006) constatou que variações temporais e espaciais na estrutura de associações macrobentônicas no estuário guajarino podem ser consequências também da degradação ambiental, com observações corroboradas pela presença de indicadores de contaminação como elevada demanda por oxigênio, altas concentrações de compostos orgânicos e metais nos sedimentos.

No segundo ponto estudado, Ver-o-peso, ocorre uma intensa atividade antrópica ligada à feira de pescado na margem do rio e ao constante tráfego de embarcações que liberam nesta área seus resíduos. Além disso, nesse local encontram-se postos de abastecimento flutuantes de gasolina e diesel que representam fontes pontuais de contaminação orgânica.

O terceiro ponto de coleta, aeroporto, localiza-se próximo ao igarapé Val de Cães – supõe-se, através dos dados obtidos, que este corpo d'água aporte resíduos provenientes de outros pontos da cidade de Belém para esta área – e ao terminal petroquímico de Miramar, representando uma possível fonte de contaminação orgânica.

Os dados discutidos para o período menos chuvoso estudado refletem condições anômalas do mesmo, pois Melo (2011) em seu trabalho publicado pelo Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC/INPE) sugere um índice pluviométrico mais elevado que as médias observadas para o período seco na região amazônica durante os anos de 2011 e 2012, baseando-se principalmente na evolução do fenômeno La Niña no oceano Pacífico Equatorial que acarreta em nuvens carregadas sobre os estados da região Norte brasileira.

## 6 CONCLUSÃO

As elevadas medidas de temperatura nos meses amostrados, em geral, apresentaram uma variação de 2°C, confirmando a homogeneidade térmica dessas águas e que durante a variação sazonal apresenta baixas influências na temperatura das águas da baía do Guajará, entretanto, pode ser influenciada pelo horário e a profundidade local.

Os maiores valores de salinidade e condutividade foram registrados durante o mês de novembro, que representa o período de baixa pluviosidade, e em pontos mais próximos da área com influência de águas marinhas. Esses dados sugerem que durante o período chuvoso as águas do estuário guajarino se classificam como águas doces e no período seco podem ser classificadas como águas oligohalinas.

Os resultados obtidos para o potencial hidrogeniônico (pH) e potencial redox (EH) durante os diferentes períodos sazonais também colaboraram para inferir maior e considerável influência oceânica na baía do Guajará no período menos chuvoso (ou seco). Acredita-se que os dados obtidos através deste trabalho para os fatores abióticos possam estar subestimados em relação à situação real da estação seca, pois dados meteorológicos sugerem a influência do fenômeno La Niña que colaborou para índices pluviométricos acima da média prevista para este período.

Os testes de extração e a adequação dos protocolos analíticos de proteínas totais e da atividade enzimática mostraram-se adequados e eficientes em sua aplicação na área de estudo, sendo passíveis de reprodução. Durante os períodos analisados observou-se que atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) sofreu um aumento em locais sujeitos à contaminação durante os períodos seco e chuvoso.

Com base nos resultados obtidos, os dois pontos localizados em áreas de grande contato com resíduos antrópicos (Ver-o-peso e Aeroporto) podem servir como indicativos da toxicidade dos efluentes despejados que comprometem a qualidade hídrica, pois a presença de metais pesados e xenobióticos orgânicos são fatores estimulantes da atividade da GST.

A desembocadura do rio Maguari foi o local que apresentou menor atividade para a GST, mesmo que incrementada durante o período chuvoso, isso se deve ao maior distanciamento deste ponto de coleta das atividades antrópicas além da existência neste local de uma maior mistura de massas de água (do próprio rio

Maguarí, da baía do Guajará e da água oceânica). O aumento, de maneira geral, da atividade enzimática da glutathione-S-transferase durante o período menos chuvoso pode indicar que as chuvas apresentam papel predominante na diluição de poluentes e não na lixiviação dos mesmos para dentro do estuário guajarinó.

A contaminação ambiental dos recursos hídricos superficiais da região metropolitana de Belém estão relacionadas aos numerosos pontos de lançamento de efluentes que carregam resíduos sólidos e líquidos para baía do Guajará. A expansão urbana, industrial e portuária tem intensificado a vazão desses pontos de lançamentos, tornando possível a afirmação de que a região flúvio-estuarina estudada está sofrendo um processo lento, porém constante, de degradação ambiental; e, em consequência, a qualidade de suas águas é afetada.

Embora este ambiente apresente um significativo potencial de recuperação natural diante da contaminação ao qual está sujeito – devido à sua intensa hidrodinâmica – são necessários estudos que monitorem a qualidade deste estuário.

Os resultados deste trabalho são pioneiros para a região e abrem perspectivas para um melhor entendimento dos processos metabólicos do ecossistema. Estudos que envolvam uma estratégia amostral com maior frequência nas coletas, bem como a taxonomia plâncton e investigação de contaminantes na baía do Guajará poderão auxiliar na validação do uso de biomarcadores de estresse para monitorar a qualidade hídrica do estuário.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n.1. p. 70-78. 2005.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 2, p. 158-170. 2003.
- AQUINO, R. F. O.; SANTOS, C. C.; MEDEIROS FILHO, L. C.; ESCHRIQUE, S. A., KAWAKAMI, S. K. Investigação do estado trófico de um estuário amazônico (Pará, Brasil) sob influência antrópica. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14., 2011, Balneário Camboriú – SC. *Anais...* Balneário Camboriú: COLACMAR, 2011. CD-ROM.
- ARORA, H. C. Rotifera as indicator of trophic nature of environments. *Hydrobiology*, v. 27, p. 146-159. 1966.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W. ; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, v. 6, p. 261-265. 1994.
- BAIRD, C.; CANN, M. *Química Ambiental*. São Paulo. Bookman, 2011. 844 p.
- BAPTISTA NETO, J. A.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM. *Poluição Marinha*. Rio de Janeiro. Editora Interciência, 2008. 412 p.
- BASTOS, T. X.; PACHECO, N. A. Informativo agrometeorológico 1998. *Embrapa Amazônia Oriental*. Belém-PA. 2001. 57 p. (Documento, 77).
- BAUMGARTEN, M. G. Z.; POZZA, S. *Qualidade de águas: descrição de parâmetros químicos referidos na legislação ambiental*. Rio Grande: Editora da FURG, 2001. 164 p.
- BELÉM está consumindo água sem flúor. *O Liberal*, Belém, 15 de nov. 1997. Caderno Atualidades, p. 6.
- BERREDO, J. F.; RIBEIRO, H. M. C.; SALES, M. E. C.; SILVA, A. B.; NASCIMENTO, K. A. F.; MARTINS, M. G. M.; DEUS, S. S.; BARBOSA, J. S.; OLIVEIRA, M. L. S. Caracterização química, físico-química e microbiológica da água superficial da Baía do Guajará, Belém-Pará. In: INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO AMAPÁ. [on line]. 2003. Disponível em: [www.iepa.ap.gov.br](http://www.iepa.ap.gov.br). Acesso em: 26 set. 2011.
- BONECKER, S. L. C. *Atlas de zooplâncton da região central da zona econômica exclusiva brasileira*. Rio de Janeiro. Museu Nacional, 2006. 232 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 7, p. 248-254. 1976.

BRIGANTE, J. Caracterização física, química e biológica da água do rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. São Carlos. RiMa, 2003. p. 55-76.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *Applied Bacteriology*, v. 72, p. 445-454. 1992.

CARVALHO, C. M. D. *Météorologie du Brésil*. Londres. John Balr, Sons and Danielsson, 1917. 525 p.

CARVALHO-NETA, R. N. F. Glutathione-S-transferase como biomarcador em uma espécie de bagre da costa maranhense. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14., Balneário Camboriú - SC. *Anais...* Balneário Camboriú: COLACMAR, 2011. CD-ROM.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 151, n. 2, p. 369-374. 1985.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 1995. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 mar. 2005. Disponível em: [www.mma.gov.br/port/conama](http://www.mma.gov.br/port/conama). Acesso em: 1 set. 2011.

CORDEIRO, C. A. *Estudo da salinização do estuário do rio Pará no trecho Belém – Mosqueiro*. 1987. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Petrologia) – INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 1987. 109 p.

CYPRIANO, E. F.; ARAÚJO, C. L.; LACERDA, L. D.; LOUREIRO, D. D. Distribuição Espacial de Mercúrio nos Sedimentos do Complexo Lagunar da Baixada de Jacarepaguá (RJ). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 3., Fortaleza - CE, 2008. *Anais...* Fortaleza: CBO, 2008. CD-ROM.

CUNHA, E. M. S. *Caracterização e planejamento ambiental do estuário Potengi*. 1982. Dissertação (Mestrado em Oceanografia e Limnologia) – CENTRO DE BIOCÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 1982. 211 p.

DAY JR., J. W.; HALL, C. A. S.; KEMP, W. M.; YANEZ-ARANCIBIA, A. *Estuarine ecology*. New York: John Wiley e Sons, inc., 1989. 558 p.

DENEKE, S.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology*, v. 257, p. 163-173. 1989.

DIRETORIA DE HIDROGRAFIA E NAVEGAÇÃO (DHN). *Tábua de Maré do Porto de Belém – PA referente aos meses de março e novembro de 2011*. Disponível em: [www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm](http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm). Acesso em: 28 nov. 2011.

- DIAS, L. M. M. *Balneabilidade das praias estuarinas da Ilha de Mosqueiro – PA: uma visão geoquímica ambiental*. 1995. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) – INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 1995. 131 p.
- DREVER, J. I. *The geochemistry of natural waters*. New Jersey. Prentice Hall, 1988. 437 p.
- EGLER, W. A.; SCHWASSMANN, H. O. Limnological studies in the Amazon Estuary. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Nova Série, Geologia*, n. 1, 25 p. 1962.
- ESKINAZI-LEÇA, E. 1990. Estudos ecológicos do fitoplâncton na plataforma continental de Pernambuco. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PLÂNCTON, 4., Recife. *Anais...* p. 1-54. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- ESTEVES, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro. Interciência, 1988. 575 p.
- FIGUEIREDO, J. P.; POCINHO, M. *Estatística e Bioestatística*. 2008. 139 p. Disponível em: <http://biocistron.blogspot.com/search/label/Bioestat%C3%ADstica>. Acesso em: 30 nov. 2011.
- FEITOSA, F. A. N. *Produção primária do fitoplâncton correlacionada com parâmetros bióticos e abióticos na Baía do Pina*. 1988. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 1988. 270 p.
- FURCH, K., JUNK, W. J.; KLINGE, H. Unusual chemistry of natural waters from the Amazon region. *Acta Científica Venezolana*, v. 33, p. 269-273. 1982.
- GARCÍA, L. M.; PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. Organochlorinated pollutants and xenobiotic metabolizing enzymes in W. Mediterranean mesopelagic fish. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 9, p. 764-768. 2000.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases, the first step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 22, p. 7130-7139. 1974.
- JENA, K. B.; VERLECAR, X. N.; CHAINY, G. B. N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, p. 107–113. 2009.
- KENNISH, M.J. *Ecology of estuaries: physical and chemical aspects*. CRC Press, 1986. 254 p.
- KNOX, G. A. *Estuarine ecosystems: a systems approach*. CRC Press, 1986. 289p.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação da qualidade de águas impactadas por petróleo por meio de sistema-teste biológico (*Allium cepa*) - um

estudo de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 4., Campinas-SP. *Anais...* Campinas: CBPDPG. CR-ROM.

LEVINSON, A. A. *Introduction to exploration geochemistry*. Maywood. Illinois Applied, 1974. 614 p.

LIMA, W. N.; KOBAYASHI, C. N. Sobre o quimismo predominante nas águas do sistema fluvio-estuarino de Barcarena, PA. *Geochimica Brasiliensis*, v. 2, n. 1, p. 53-71. 1988.

LIRA, L. Material em suspensão, temperatura e salinidade no estuário do Rio Mucucaba – PE. *Cad. Omega*, v. 2, n. 1, p. 97-116. 1978.

LOBATO, C. M. C.; BELÚCIO, L. F.; SILVA, L. R. P.; GÓES DA COSTA, E. Análise do zooplâncton da Baía do Guajará junto ao furo do Maguari (Belém, PA, Brasil) em diferentes condições de pluviosidade. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., São Lourenço-MG. *Anais...* São Lourenço: CEB. CD-ROM.

MACDONALD, H.; JONES, A. M.; KING, P. J.. Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 7393-7399. 1991.

MANNERVIK, B. (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol*, v. 57, p. 357- 417.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 66–76. 2007.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, v. 52, p. 711-760. 1983.

MELO, A. B. C. Previsão de chuvas acima da normal para o Norte do Brasil. *Infoclima*, v. 18, n. 11, p. 1-3. 2011.

MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B. *Princípios de oceanografia física de estuários*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 400 p.

MIRANDA, A. G. O. *Dinâmica batimétrica da Baía de Guajará (Belém/PA)*. 2006. Tese (Bacharelado em Oceanografia) – CENTRO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 2006. p. 64.

MIRANDA, A. G. O. *Contribuição à gestão ambiental da Baía de Guajará (Belém – Pará – Amazônia) através de estudo batimétrico e sedimentológico*. 2007. Dissertação (Pós-Graduação em Geociências) – INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2007. p.127.

MONTEIRO, S. M. Avaliação da água superficial da Baía do Guajará (Belém-PA) utilizando indicadores abióticos. 2006. Tese (Bacharelado em Oceanografia) – CENTRO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 2006. 59 p.

- MONTEIRO, M. D. R.; MELO, N. F. A. C.; ALVES, M. A. M. S.; PAIVA, R. S. Composição e distribuição do microfítolâncton do rio Guamá no trecho entre Belém e São Miguel do Guamá, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, v. 4, n. 3, p. 341-351. 2009.
- 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*, v. 35, n. 2, p. 207-214. 2005.
- MOREIRA, M. O. P. *Produção do fitoplâncton em um ecossistema estuarino tropical (estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará)*. 1994. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 1994. 338 p.
- MOURA, R. T. *Biomassa, produção primária do fitoplâncton e alguns fatores ambientais de Baía de Tamandaré, Rio Formosos, Pernambuco, Brasil*. 1992. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 1992. 290 p.
- NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J. M.; Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 410-418. 1999.
- 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). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 12, 2002, Foz do Iguaçu – PR. *Anais...* Foz do Iguaçu: CBMET, 2002. CD-ROM.
- OOSTEROM, J. V.; KING, S. C.; NEGRI, A.; HUMPHREY, C.; MONDON J. Investigation of the mud crab (*Scylla serrata*) as a potential bio-monitoring species for tropical coastal marine environments of Australia. *Marine Pollution Bulletin*, v. 60, p. 283–290. 2010.
- PAIVA, R. S.; ESKINAZI-LEÇA, E.; PASSAVANTE, J. Z. O.; SILVA-CUNHA, M. G. G.; MELO, N. F. A. C. Considerações ecológicas sobre o fitoplâncton da baía do Guajará e foz do rio Guamá (Pará, Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, v. 2, n. 2, p. 133-146. 2006.
- PERDEZOLLI, E. M. *Comparação de áreas submetidas a impacto pelo refino de petróleo (RS)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2006. 71 p.
- PINHEIRO, R. V. L. *Estudo hidrodinâmico e sedimentológico do estuário Guajará (PA)*. 1987. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) – INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 1987. 163 p.

- PRITCHARD, D. W. *Oceanografia: a última fronteira*. São Paulo. Cultrix Ltda, 1981. p. 321-332.
- RAMOS, E. M. L. S. Estatística: poderosa ciência ao alcance de todos. *Jornal Universitário da Universidade Federal do Pará*, ed. 21. 2004. Disponível em: <http://www.ufpa.br/beiradorio>. Acesso em: 30 nov. 2011.
- RILEY, G. A. *Estuaries: the plankton of estuaries*. Washington. American Association for Advantage of Science, 1967. p. 316-326.
- RODRIGUES, M. S., GÓES DA COSTA, E., BELUCIO, L. F. Levantamento do zooplâncton na Baía do Guajará (PA-Brasil). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 3., Fortaleza-CE, 2008. *Anais...* Fortaleza: CBO. CD-ROM.
- ROVER JR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 112-119. 2001.
- SANTOS, A. As águas da Região de Carajás. In: ALMEIDA JR., J. M. G. *Carajás, desafio político, ecológico e desenvolvimento*. São Paulo. Brasiliense/CNPQ, 1986. p. 156-183.
- SANTOS, C. C.; MEDEIROS FILHO, L. C.; AQUINO, R. F. O.; KAWAKAMI, S. K. Glutathione-S-transferase em material particulado e a qualidade hídrica do estuário Guajará, Belém-PA, Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14., 2011, Balneário Camboriú – SC. *Anais...* Balneário Camboriú: COLACMAR, 2011. CD-ROM.
- SILVA, T. C.; DERGAN, A. L. N.; ROSA-FILHO, J. S.; AMADO, L. L. Determinação do ciclo anual de dois biomarcadores de exposição a poluentes utilizando o poliqueta *Namalicastys abiuma* como organismo biomonitor na baía de Guajará (PA). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14., Balneário Camboriú - SC. *Anais...* Balneário Camboriú: COLACMAR, 2011. CD-ROM.
- SILVA, D. E. A. *Variações espaço-temporais das associações macrobentônicas em áreas sujeitas à contaminação ambiental no estuário Guajará (Belém – Pará)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) – Campus de Bragança, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 2006. 108 p.
- SIOLI, H. *Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Rio de Janeiro. Vozes, 1985. 72 p.
- SIOLI, H. Valores de pH de águas Amazônicas. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Série Geologia*, v. 1. 1957.
- SMAYDA, T. J. *Estuaries and Enclosed Seas*. Amsterdam. Elsevier Scientific Publications, 1983. p. 65-101.

SOUZA FILHO, P. W. M.; MIRANDA, F. P.; BEISL, C. H., ALMEIDA, E. F.; GONÇALVES, F. D. Environmental sensitivity mapping for oil spill in the amazon coast using remote sensing and GIS technology. In: INTERNATIONAL GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING SYMPOSIUM, 23., 2004, Anchorage – Alaska. *Anais...* Anchorage: IEEE, 2004. CD-ROM.

SUDAM. *Atlas Climatológico da Amazônia Brasileira*. Belém: Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia, n. 39, 125 p. 1984.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. *Limnologia*. São Paulo. Oficina de textos, 2008. 632 p.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu – SP. *Eclética Química*, v. 22. 1997.

VEJA BELÉM. Restaurantes: Manjar das Garças. *Revista Veja Comer & Beber*. 2011. Disponível em: [www.vejabrasil.abril.com.br](http://www.vejabrasil.abril.com.br). Acesso em: 30 set. 2011.

VINAY, K.; ABBAS, A. K.; NELSON, F. *Patologia: bases patológicas das doenças*, ed. 7. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005. 1592 p.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6. 1998.