

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Rosangela Almeida Victor

**RESPOSTA METABÓLICA AERÓBIA, ANAERÓBIA E
ARGININOLÍTICA DO BAGRE *Genidens genidens*, (CUVIER, 1829),
PRESENTES EM ESTUÁRIOS DO MUNICÍPIO DE UBATUBA**

**Taubaté – SP
2009**

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Rosangela Almeida Victor

**RESPOSTA METABÓLICA AERÓBIA, ANAERÓBIA E
ARGININOLÍTICA DO BAGRE *Genidens genidens*, (CUVIER, 1829),
PRESENTES EM ESTUÁRIOS DO MUNICÍPIO DE UBATUBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais da Universidade
de Taubaté, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Ambientais Área de Concentração Ciências
Ambientais.

Orientador: Profº DrºEdson Rodrigues

**Taubaté – SP
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

V644r Victor, Rosangela Almeida
Resposta metabólica aeróbia, anaeróbia e arginínolítica do bagre
Genidens genidens, (Cuvier, 1829), presentes em estuários do município
de Ubatuba / Rosangela Almeida Victor. - 2009.
50 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-
graduação em Ciências Ambientais, 2009.
Orientação: Prof. Dr. Edson Rodrigues, Departamento Instituto Básico
de Biociências.

1. Arginase. 2. Biomarcadores. 3. Estuários. 4. *Genidens genidens*.
5. Malato desidrogenase. I. Título.

RESPOSTA METABÓLICA AERÓBIA, ANAERÓBIA E ARGININOLÍTICA DO BAGRE *Genidens genidens*, (CUVIER, 1829), PRESENTES NOS ESTUÁRIOS DO MUNICÍPIO DE UBATUBA

ROSANGELA ALMEIDA VICTOR

Dissertação aprovada em 27/03/2009

Comissão Julgadora

Membro	Instituição
Profº Drº Edson Rodrigues	Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Profº Drº Valter José Cobo	Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Profª Drª Wilma Pereira Bastos-Ramos	UNESP – Faculdade de Odontologia SJC – CEBAPE – Centro de Bioc. Aplic. Pacientes com Necessidades Especiais

Profº Drº Edson Rodrigues
Orientador

Dedico esse trabalho à minha mãe, recentemente falecida, mas que deixou muitos exemplos de dignidade, ética, trabalho, dedicação e honra para seus filhos e netos. Sentimos muitas saudades.

Sei que ela estaria muito orgulhosa por mim, nesse momento.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Edson Rodrigues pelo muito que aprendi e pelo seu empenho e incentivo para que eu ultrapassasse os desafios.

À amiga Prof^a Msc Teresinha Cristina Alvisus Fernandes Cunha Falci pelo estímulo para que eu ousasse enfrentar toda essa empreitada.

Ao meu marido Osmar Victor que participou do começo ao fim tanto com persistência e habilidade para pescar os bagres, quanto com compreensão, atenção e disponibilidade.

Às funcionárias do laboratório de Bioquímica pela atenção e colaboração.

À Prof^a Dr^a Débora Pallos pelas informações no manejo do nitrogênio líquido.

Ao Prof^o Dr^o Itamar Alves Martins pelas instruções para que eu pudesse identificar corretamente os bagres *Genidens genidens*.

Ao Prof^o Dr^o Valter José Cobo pela autorização para a utilização do Laboratório de Biologia Marinha de Ubatuba – Unitau e pelas sugestões como relator, como membro da Banca na Qualificação e na Defesa desta Dissertação de Mestrado.

À Prof^a Dr^a Ana Aparecida da Silva Almeida pelas sugestões por ocasião da Qualificação.

À Prof^a Dr^a Wilma Pereira Bastos-Ramos pelas sugestões durante a Defesa desta Dissertação de Mestrado.

À Administração e Coordenação do Colégio Unitau – Escola “Dr. Alfredo José Balbi” que, na medida do possível, autorizou a utilização de “banco de horas”.

Agradeço aos meus filhos Rafael e Carolina, à minha nora Tatiane e ao meu netinho Pedro Henrique, por terem compreendido os vários momentos em que não pude dedicar-lhes mais atenção.

**RESPOSTA METABÓLICA AERÓBIA, ANAERÓBIA E ARGININOLÍTICA
DO BAGRE *Genidens genidens*, (CUVIER, 1829), PRESENTES NOS
ESTUÁRIOS DO MUNICÍPIO DE UBATUBA**

RESUMO

A resposta metabólica do bagre *Genidens genidens* de três estuários (rios Grande, Indaiá e Escuro) do município de Ubatuba – SP foi estudada comparativamente em relação ao impacto da atividade humana na região. Encéfalo, fígado e músculo epaxial foram utilizados para determinar a atividade específica das enzimas lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e arginase, como prováveis marcadoras desse impacto. As diferenças entre os níveis teciduais de LDH dos bagres coletados nos três estuários não foram significativamente diferentes, provavelmente devido a sua capacidade adaptativa, associada à sazonalidade das concentrações de oxigênio nas águas estuarinas. Os níveis de arginase hepática e muscular dos bagres coletados nos estuários dos rios Escuro e Indaiá, respectivamente, foram diferentes em relação aos dois outros estuários. Comportamento semelhante a esse foi constatado em relação aos níveis da enzima MDH, marcadora do potencial gerador de ATP desses tecidos. Nesse sentido, os níveis de arginase e MDH do fígado e músculo epaxial podem estar refletindo o esforço adaptativo metabólico desse bagre às condições ambientais dessas regiões estuarinas.

PALAVRAS-CHAVE: Ubatuba, estuário, bagre, *Genidens genidens*, metabolismo energético, biomarcadores, arginase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase.

**AEROBIC, ANAEROBIC AND ARGININOLITIC METABOLIC RESPONSE
OF THE CATFISH *Genidens genidens* (CUVIER, 1829), PRESENT IN
ESTUARIES OF THE MUNICIPALITY OF UBATUBA**

ABSTRACT

The metabolic response of catfish *Genidens genidens* of the three estuaries (Grande, Indaia and Escuro rivers) in the municipality of Ubatuba - SP was studied in comparison to the impact of human activity in the region. Brain, liver and epaxial muscle were used to determine the specific activity of the enzymes lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH) and arginase, as probable markers of that impact. The differences between the tissues levels of LDH of the catfishes collected in the three estuaries were not significantly different, probably due to its adaptive capacity, associated with the seasonality of the oxygen concentrations in estuarine waters. Arginase levels of liver and muscle of the catfishes collected in estuaries of rivers Escuro and Indaia, respectively, were different in the relation to the other two estuaries. Behavior was similar to that observed in the levels of the enzyme MDH, marker of the potential generator of ATP of those tissues. Accordingly, the levels of arginase and MDH of the liver and epaxial muscle might reflect the effort of that adaptive metabolic catfish to environmental conditions such estuarine areas.

KEY WORDS: Ubatuba, estuary, catfish, *Genidens genidens*, energy metabolism, biomarkers, arginase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Distribuição mundial dos manguezais	16
Figura 2. Espécime de <i>Genidens genidens</i>	21
Figura 3. Mapas e imagem de satélite de Ubatuba	24
Figura 4. Imagem do Google de Ubatuba e fotos rio Grande	25
Figura 5. Estuário do rio Indaiá	26
Figura 6. Imagem de satélite e fotos rios Comprido e Escuro	27
Figura 7. Atividade específica LDH do fígado	32
Figura 8. Atividade específica LDH do músculo	33
Figura 9. Atividade específica LDH do encéfalo	33
Figura 10. Atividade específica MDH do fígado	34
Figura 11. Atividade específica MDH do músculo	34
Figura 12. Atividade específica MDH do encéfalo.....	35
Figura 13. Atividade específica da arginase do fígado	36
Figura 14. Atividade específica da arginase do músculo	36
Figura 15. Atividade específica da arginase do encéfalo	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CT	-	comprimento total do corpo
HEPES	-	N-2-Hidroxietilpiperazina-N-ácido-2-etanossulfônico
LDH	-	Lactato desidrogenase
MDH	-	Malato desidrogenase
NADH ⁺ H ⁺	-	Nicotinamida-adenina-dinucleotídio reduzida
NAD	-	Nicotinamida-adenina-dinucleotídio
SEM	-	Erro padrão da média
TDMU	-	Reagente Tiosemicarbazida-Diacetilmonoxima-Ureia
TRIS	-	Tris-hidroximetil-aminoacetato

SUMÁRIO

Página

RESUMO	06
ABSTRACT	07
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	09
SUMÁRIO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Espécie em estudo	20
3.2 Locais de coleta	22
3.3 Obtenção de Extratos Livres de Células.....	28
3.4 Métodos Analíticos.....	29
3.5 Análises Estatísticas	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são um ecossistema único e especializado, que se distribuem ao longo dos litorais e das ilhas, em aproximadamente 75% da faixa intertropical do planeta, em locais com temperaturas médias superiores a 20°C, a precipitação pluvial ideal é acima de 1.500 mm/ano e sem períodos de seca prolongada (FERNANDES e PEREIRA, 1995; VISNADI, 2008). São considerados ecossistemas únicos porque todas as espécies de plantas e de animais integrantes vivem muito perto dos limites de tolerância a condições ambientais extremas (VANNUCCI, 2001).

Manguezal é um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, formado por uma associação de animais e plantas que vivem na faixa entremarés das regiões costeiras tropicais e subtropicais baixas, em estuários, deltas, águas salobras interiores, lagoas e lagoas (VANNUCCI, 2003; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Sua vegetação é considerada importante transformadora de nutrientes em matéria orgânica na proteção da linha costeira contra a erosão, assoreamento dos corpos d'água adjacentes, prevenção de inundação e proteção contra tempestade (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999).

Regiões estuarinas abrigam pântanos salgados, manguezais e rios na zona entremarés e litorânea, reunindo condições favoráveis para o crescimento e sobrevivência de peixes. As águas estuarinas, normalmente, são ricas em alimentos (quantidade e variedade), apresentando condições propícias para alimentação, contemplando áreas protegidas contra predadores e funcionando como berçário para diversas espécies, incluindo espécies de valor comercial e recreativo (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; PATERSON e WHITFIELD, 2000; HAJISAMAE e CHOU, 2003).

É constituído de espécies vegetais lenhosas típicas, além de micro e macroalgas, adaptadas à flutuação de salinidade e caracterizadas por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixo teor de oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). A vegetação é relativamente pobre em número de espécies vegetais fanerogâmicas típicas e há espécies com viviparidade, cujas sementes só caem após o desenvolvimento, são conhecidas como propágulos e podem flutuar pelo estuário por longos períodos até encontrarem condições favoráveis para se fixarem e se desenvolverem (VANNUCCI, 2001). São plantas halófilas e heliófilas, com adaptações que as favorecem na competição pelo espaço litorâneo, o sucesso adaptativo dessas plantas está necessariamente ligado a sua lábil e rápida capacidade adaptativa genotípica a uma grande variedade de situações ambientais (VANNUCCI, 2001; SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2004).

Os manguezais também têm importância na manutenção da biodiversidade da região costeira, na absorção e imobilização de produtos químicos, atuando como filtro de poluentes e sedimentos, além de tratamento de efluentes em seus diferentes níveis (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999). O manguezal é um dos mais produtivos e também o mais vulnerável, dos ecossistemas costeiros, aos efeitos do desenvolvimento econômico e do crescimento desordenado da população humana (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2004). Estuários e águas costeiras adjacentes são ambientes geralmente vulneráveis à presença de compostos xenobióticos e de matéria orgânica em geral, que têm apresentado níveis crescentes de contaminação como consequência das atividades antropogênicas, seja por meio de resíduos industriais, urbanos, deposição atmosférica ou drenagem terrestre (KENNISH, 1992).

A detecção desses contaminantes e a avaliação dos seus efeitos sobre a vida dos organismos marinhos que habitam as regiões costeiras são consideradas de vital importância para preservação ambiental. Entre as técnicas de avaliação, o uso integrado de análises químicas e bioquímicas, assim como as respostas celulares a poluentes, são os procedimentos mais usuais para a detecção do impacto de contaminantes em ecossistemas aquáticos (FERNANDES *et al.*, 2007).

Embora as respostas metabólicas possam diferir em relação à espécie de peixe, habitat e hábito alimentar, a ação de compostos tóxicos e alterações da composição do meio físico-químico, podem promover respostas metabólicas quantitativas como, por exemplo, a alteração dos níveis teciduais de enzimas, as quais podem proporcionar valiosas informações de relevância ecológica, indicando a condição de poluição aguda ou crônica de ambientes aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A hipóxia causada pela eutrofização e poluição orgânica de ambientes marinhos litorâneos está entre os principais problemas de poluição do planeta. O aumento dessas áreas de hipóxia nos oceanos tem reduzido os estoques de peixes e proporcionado prejuízos econômicos (WU, 2002). Essa redução do pescado tem sido relacionada com a resposta ecológica dos organismos marinhos à hipóxia que demanda ajustes moleculares e fisiológicos nos diversos níveis de organização biológica. A capacidade de utilizar o oxigênio molecular como agente oxidante tem sido avaliada pelos níveis teciduais de enzimas do metabolismo energético, em especial no que diz respeito aos níveis da lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH). Estudos com peixes pelágicos coletados em diferentes profundidades revelaram que os níveis dessas enzimas decrescem exponencialmente em relação ao aumento da profundidade em que as espécies foram coletadas, bem como em relação ao decréscimo do seu consumo de oxigênio (CHILDRESS e SOMERO, 1979; TORRES e SOMERO, 1988 a, b).

Trabalhando com *Hoplosternum littorale*, Falci e Rodrigues (2007) encontraram níveis baixos de LDH no fígado dos peixes coletados em ambiente eutrofizado comparado àqueles coletados em ambiente não eutrofizado. Em relação aos níveis de arginase hepática, não foram encontradas alterações significativas entre os peixes coletados nesses dois ambientes. Contudo, o comportamento cinético da arginase hepática foi diferente em relação ao efeito ativador dos cátions metálicos Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} , como possível mecanismo compensatório à ação inibitória de metais pesados não essenciais.

As arginases são metaloenzimas amplamente distribuídas na natureza, catalisam a reação terminal do ciclo da ureia, no tecido hepático dos animais ureotélicos, e controlam os níveis do aminoácido L-arginina nos tecidos extra-hepáticos (JENKINSON *et al.*, 1996). A importância do aminoácido L-arginina reside na síntese de diversos compostos nitrogenados como as poliaminas e o óxido nítrico que participam como moduladores de diversas respostas biológicas (WU e MORRIS JR., 1998; LI *et al.*, 2001), tais como controle da divisão celular, síntese de colágeno e nos processos inflamatórios envolvendo a regeneração tecidual (LARQUÉ *et al.*, 2007; MOINARD *et al.*, 2005). A presença de arginase em tecidos extra-hepáticos tem sido associada às necessidades específicas e a adaptação de organismos às condições extremas (RODRIGUES *et al.*, 2009; MINIC e HERVE, 2003).

Os bagres da família *Ariidae* apresentam distribuição circumbglobal, habitando regiões litorâneas e estuarinas, assim como rios de regiões tropicais e temperadas. A maioria das espécies ocorre em áreas costeiras rasas e em estuários (MARCENIUK, 2005). Estudo sobre a variação sazonal da biomassa, número de espécies e densidade de peixes em três áreas da baía de Paranaguá – PR, revelou o bagre *Genidens genidens* como uma das espécies mais abundantes. Também ficou evidente que a salinidade e o teor de oxigênio da água interferem com a distribuição das espécies nesse ambiente estuarino. Durante o período chuvoso, quando a salinidade e o teor de oxigênio na água sofrem sensível redução na região anterior do estuário, diversas espécies de peixes procuram a região média do estuário onde as condições abióticas são mais estáveis. Todavia, as formas juvenis de *G. genidens* permanecem concentradas na parte anterior do estuário evitando a alta concentração de espécies na parte média e conseqüentemente a competição e a predação que ocorrem entre as espécies de peixes que se deslocaram para a parte média do estuário (BARLETTA *et al.*, 2008).

O município de Ubatuba – SP congrega pequenos estuários ao longo da sua região litorânea. O bagre *G. genidens* apresenta ampla distribuição nos estuários dessa região e, inclusive, tem causado lesões em pescadores amadores, profissionais e nadadores, totalizando 48 pacientes num período de 8 anos (HADDAD JR. e

MARTINS, 2006). O estuário do rio Grande, localizado próximo ao mercado de peixes de Ubatuba, recebe o efluente de uma estação de tratamento de esgoto (CETESB, 2007) e os dejetos inerentes às atividades do comércio de peixes. Esse estuário também é utilizado como atracadouro de pequenas embarcações responsáveis pela contaminação ao ambiente estuarino com óleos lubrificantes e combustíveis. O bagre *G. genidens* também ocorre no estuário do rio Indaiá e no estuário formado pelas barras dos rios Comprido e Escuro onde o impacto antropogênico é bem menor (CETESB, 2007).

Assim, o presente estudo objetivou comparar os níveis das enzimas LDH, MDH e arginase, do fígado, músculo epaxial e encéfalo do bagre *G. genidens*, coletados nos estuários do rio Grande de Ubatuba, rio Indaiá e o estuário da praia Dura formado pela confluência do rio Comprido com o rio Escuro, como possíveis marcadores da condição ambiental desses estuários, no contexto dos metabolismos aeróbio, anaeróbio e do aminoácido L-arginina. A escolha dos tecidos levou em consideração a importância dos sistemas digestório, locomotor e nervoso na manutenção de funções vitais, tais como a alimentação, predação e coordenação de funções fisiológicas. A escolha do bagre *G. genidens* como espécie alvo do presente estudo levou em consideração a sua abundância na região e o fato dos peixes apresentarem mais vantagens do que desvantagens quando comparados com muitos invertebrados como bioindicadores ambientais (WHITFIELD e ELLIOT, 2002).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Há referências sobre plantas de mangue em 325 a. C., em um relatório do General Nearco, que acompanhou Alexandre Magno ao Delta do rio Indo no Golfo Pérsico, ele registrou árvores com raízes semelhantes a candelabro. Em 1526, Oviedo fez a primeira descrição dos manguezais americanos e o historiador português Gabriel Soares de Souza em seu trabalho descritivo do Brasil, que foi impresso em 1587, fez uma das referências mais antigas sobre os manguezais brasileiros (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

A distribuição mundial de manguezais segundo Chapman 1975, alcança 162.000 km², tendo maior desenvolvimento entre o trópico de Câncer e de Capricórnio (23°27'N e 23°27'S), pois seu desenvolvimento máximo tende a ser próximo ao Equador, como pode ser observado na figura 1 (YOKOYA, 1995).

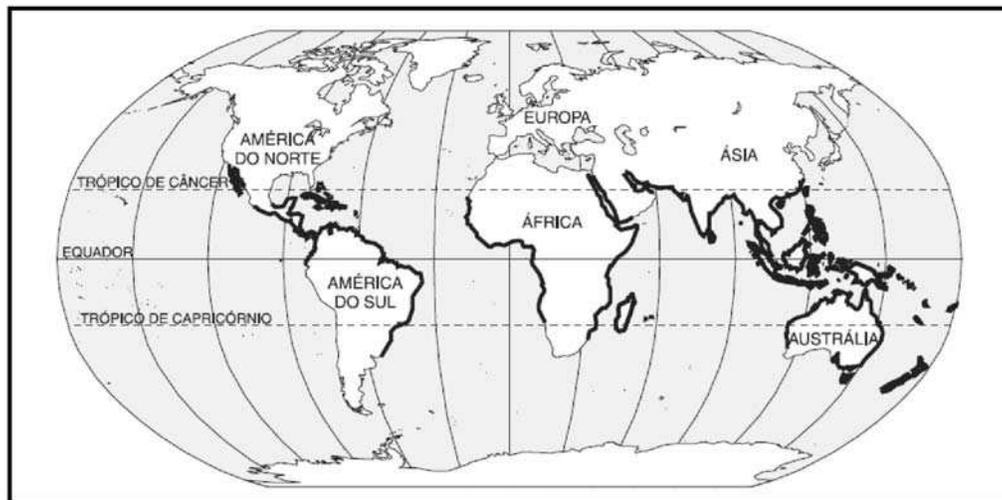


Figura 1. Distribuição mundial dos manguezais, indicada pelas linhas grossas, segundo Chapman (1975), citado por Yokoya (1995).

Estima-se que o Brasil tem de 10.000 a 25.000 km² de manguezais, que se distribuem desde o Amapá ao longo de quase todo o litoral, margeando estuários, lagunas e enseadas até Laguna em Santa Catarina 28°30'S (YOKOYA, 1995).

Os manguezais são encontrados em clima tropical, mas podem também ocorrer em climas temperados, porém vai sendo gradualmente substituído por outros ecossistemas mais adaptados às altas latitudes, como as marismas. O limite do manguezal é determinado pela distância máxima de penetração da água salgada em direção à terra, o que pode ser dezenas de quilômetros, em direção às nascentes dos grandes rios (FERNANDES e PEREIRA, 1995).

Com relação ao substrato dos manguezais, há aqueles que se originam no próprio ambiente, pela decomposição de folhas, galhos e restos de animais e há substratos que se formam pela decomposição de rochas, de materiais vulcânicos e graníticos, trazidos de fora do ambiente por ondas, ventos, correntes litorâneas ou fluxo dos rios. As condições ambientais, como: chuva, marés, correntes, ondas, aporte dos rios, tormentas, ventos fortes, podem alterar suas características (FERNANDES e PEREIRA, 1995).

Os detritos originados das árvores (folhas, frutos, flores e galhos) de mangue que formam a serrapilheira podem ficar sobre o próprio solo, sendo consumidos por detritívoros enquanto vai se decompondo ou, ainda, podem ser levados pelas marés sofrendo processo de decomposição nas águas costeiras adjacentes, ficando disponível às cadeias alimentares. Em algumas regiões costeiras a produção de espécies de mangue é muito mais importante do que a das algas do fitoplâncton e do fitobento (MENEZES, 1995).

A matéria orgânica dissolvida pode ser usada diretamente ou ser transformada em agregados orgânicos como floculação e coagulação. O material floculado precipita e é importante fonte de alimento para peixes, camarões e outros animais marinhos, capturados pelas frotas pesqueiras (MENEZES, 1995).

Algumas modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas são importantes para que os organismos possam se adaptar às condições ambientais dos manguezais. As interações ecológicas como predador-presa, devem adaptar-se, por

exemplo, a baixa concentração de oxigênio, que pode ter sido provocada por alguma alteração e pode afetar negativamente a habilidade de uma espécie de presa para escapar ao seu predador. As espécies de flora e fauna estão eficientemente adaptadas às mudanças bruscas que ocorrem naturalmente neste ambiente, como a variação da salinidade que pode ser rápida, durante as chuvas fortes, ou pode ser lenta, quando há estiagem prolongada (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

O manguezal é um ecossistema marginal e mantém um grande e variado número de interações com outros ecossistemas, próximos, adjacentes ou remotos no tempo e no espaço. Outra peculiaridade é o fato de ser um sistema altamente dinâmico, muito produtivo e com capacidade de imobilizar sais de metais pesados (VANNUCCI, 2001).

A atividade humana proveniente de comunidades urbanas e industriais tem introduzido nos ambientes aquáticos diversos tipos de compostos orgânicos estranhos, chamados xenobióticos e metais pesados, alterando a sua composição química (SORENSEN, 1991; WU, 2002; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Nesse sentido, a atividade antropogênica tem promovido a eutrofização de diversos ambientes marinhos e, conseqüentemente, aumentado as áreas de hipóxia em milhões de Km², desencadeando a morte de animais marinhos, defaunação bêntica e o declínio da produção de pescado em diversos locais, especialmente no Golfo da China e do México (WU, 2002).

A eutrofização de ambientes aquáticos marinhos e a sua contaminação com xenobióticos e metais pesados são capazes de desencadear respostas metabólicas protetoras e não protetoras em diversos organismos (WALKER *et al.*, 1997). O aumento da atividade de enzimas da família do citocromo P₄₅₀ e do metabolismo antioxidante (catalase, superóxido dismutase), assim como de proteínas quelantes de metais pesados (metalotioneínas), são algumas das respostas protetoras normalmente utilizadas como biomarcadoras de poluição em ambientes aquáticos (WALKER *et al.*, 1997; ABELE e PUNTARULO, 2004; ANSARI *et al.*, 2004).

Como a disponibilidade de oxigênio nos ambientes aquáticos é profundamente influenciada pela carga de matéria orgânica, a qual é capaz de produzir extensas áreas de

hipóxia e desencadear respostas metabólicas nos organismos, diversos estudos foram conduzidos no sentido de entender esses mecanismos (WU, 2002). Nesse caso, a capacidade do metabolismo energético em se adaptar às alterações ambientais tem sido considerada como sendo de extrema importância para o sucesso adaptativo dos organismos que vivem em ambientes com baixo teor de oxigênio. Isso se deve ao papel central desse ramo metabólico na manutenção de funções vitais, tais como o deslocamento e a competência reprodutiva (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie em Estudo

A espécie estuarina escolhida para este estudo foi o *Genidens genidens* da família *Ariidae* que engloba os peixes conhecidos vulgarmente como bagres. Foram coletados nos estuários: da barra do rio Grande de Ubatuba, na barra do rio Indaiá e no encontro das barras dos rios Comprido e Escuro, utilizando-se da pesca artesanal com linha e anzol.

Marceniuk (2005) afirma que os bagres da família *Ariidae* são peixes de tamanho médio a grande (200-1200 mm de CT), possuem cabeça com escudo cefálico conspícuo, barbilhões maxilares e mentais; aberturas nasais anterior e posterior bem próximas entre si, acúleos das nadadeiras dorsal e peitorais bastante desenvolvidos, escamas ausentes. Apresentam morfologia externa bastante uniforme e tem sido realizada a identificação principalmente com base na forma e disposição das placas de dentes relacionadas ao vômer e das placas acessórias.

Segundo Marceniuk (2005) as espécies da família *Ariidae* do sudeste e sul do Brasil são diferenciadas com base na forma das placas de dentes da região do palato e o *G. genidens* pelas placas de dentes não fixas e ligadas às projeções carnosas na região do palato, conforme figura 2.

Marceniuk (2005) ressalta que atualmente os bagres da família *Ariidae* têm despertado um grande interesse tanto na pesca comercial como também em estudos de Ecologia de regiões costeiras e estudos de Biologia.



Figura 2. Espécime de *Genidens genidens*, coletado no estuário da praia Dura pela confluência do rio Escuro com o rio Comprido – Ubatuba (SP), destaque para o conjunto formado pelas placas de dentes relacionadas ao vômer.

3.2 Locais de coleta

O litoral entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina corresponde a somente 5% da área total de manguezais do Brasil, que tem cerca de 6.800 km de costa e a maior área de manguezais do planeta. A Serra do Mar limita as planícies costeiras e os manguezais estão no interior de baías sendo formados por florestas com árvores baixas, raramente com mais de 10 m de altura, sem dominância de espécies (VANNUCCI, 2003).

Segundo Schaeffer-Novelli (1989), a área de manguezal brasileira pode ser dividida em oito unidades, sendo a região do litoral norte do estado de São Paulo classificada na Unidade VII, isto é, entre as latitudes 23°00'S e 29°20'S, de Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro, até Torres, no estado do Rio Grande do Sul.

A região litorânea do estado de São Paulo é caracterizada por duas grandes correntes marinhas que influenciam fenômenos físicos, químicos e biológicos: uma corrente mais quente com temperatura superficial de 22° C, chamada Corrente do Brasil e a outra de temperatura superficial mais baixa, a Corrente das Malvinas (SMA/SÃO PAULO, 1996). As massas de água continentais dessa região classificam-se em Água Tropical (AT- alta salinidade e temperatura e baixa concentração de nutrientes), Água Costeira (AC-baixa salinidade, alta temperatura e concentração de nutrientes variável), Água Central do Atlântico Sul (ACAS- baixa temperatura e relativa alta concentração de nutrientes), Água Subtropical (AST) e Água de Plataforma (AP). A penetração da ACAS no verão propicia o aumento da concentração de fitoplâncton na água (SMA/SÃO PAULO, 1996; COSTA *et al.*, 1998).

O clima de Ubatuba ocupa uma porção intermediária ou de transição entre o clima tropical e o subtropical, a cidade é cortada pelo Trópico de Capricórnio, sua área é de 682 km², altitude média 6 m, com picos de 1.200 m de altitude. O clima é considerado tropical úmido e praticamente não existe inverno. Há grande quantidade de chuvas quase diariamente no verão e com grande constância no ano, chove em cerca de 50 % dos dias do ano e a umidade relativa do ar é em média 87,3% (CAMARGO, 1994).

Rossini-Penteado *et al.* (2007) analisaram a cobertura do solo urbano de Ubatuba (SP), constataram que as áreas impermeáveis eram 33,45%: cerâmica (12,51%), concreto-amianto (11,91%), alumínio (1,14%), asfalto (7,89%) e piscinas

(0,08%). Enquanto que as áreas permeáveis eram 65,03%: solo exposto (14,80%), de vegetação arbórea (23,75%) e herbáceo-arbustiva (26,48%) e rios (1,44%). Os bairros que apresentaram as maiores proporções de áreas impermeabilizadas (50% ou mais) foram àqueles localizados na porção central e adjacências, próximas ao mar. A análise individual mostrou a maior proporção de área impermeável (61,3%) na porção norte do bairro Acaraú.

Esta impermeabilização do solo pode estar interferindo no estuário do rio Acaraú o qual foi escolhido inicialmente como um dos pontos de coleta do presente trabalho, mas após várias tentativas de coleta sem sucesso, tomamos a decisão de substituí-lo pelo estuário do rio Indaiá. Percebe-se que há pouca vazão do rio Acaraú, principalmente durante a maré baixa, além disso, há um forte cheiro de esgoto. Segundo a CETESB (2007), há uma ETE – estação de tratamento de esgoto que lança seu efluente neste rio, que é considerado o 5º mais poluído do Litoral Norte, além disso, não há rede coletora em todas as partes do bairro.

O aumento da população nas regiões litorâneas vem se acentuando e trazendo mais ameaças de degradação ambiental, estudos conduzidos em Ubatuba por Giberti e Barbieri (2007) mostraram que em 2006 houve um crescimento nas áreas da escarpa da serra, portanto uma pressão demográfica nas áreas de risco para a ocupação urbana. Novaes *et al.* (1996) também identificaram um aumento populacional na bacia do rio Grande de Ubatuba envolvendo a encosta da Serra do Mar e constataram um intenso crescimento da área antropizada com aceleradas perdas das áreas da Mata Atlântica, tanto com a invasão do Parque Estadual da Serra do Mar como de áreas adjacentes e que também estão sob proteção. Há, ainda, áreas de cobertura vegetal já antropizadas, com o sub-bosque eliminado e perdas para áreas de capoeira.

Os locais de coleta escolhidos para o presente trabalho foram os estuários dos rios Comprido-Escuro, Indaiá e Grande de Ubatuba (na figura 3), considerados como sendo de baixo, médio e elevado impacto antropogênico, respectivamente, conforme informações contidas no Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo Balneabilidade das Praias realizados no período de 1999-2006 (CETESB, 2007).

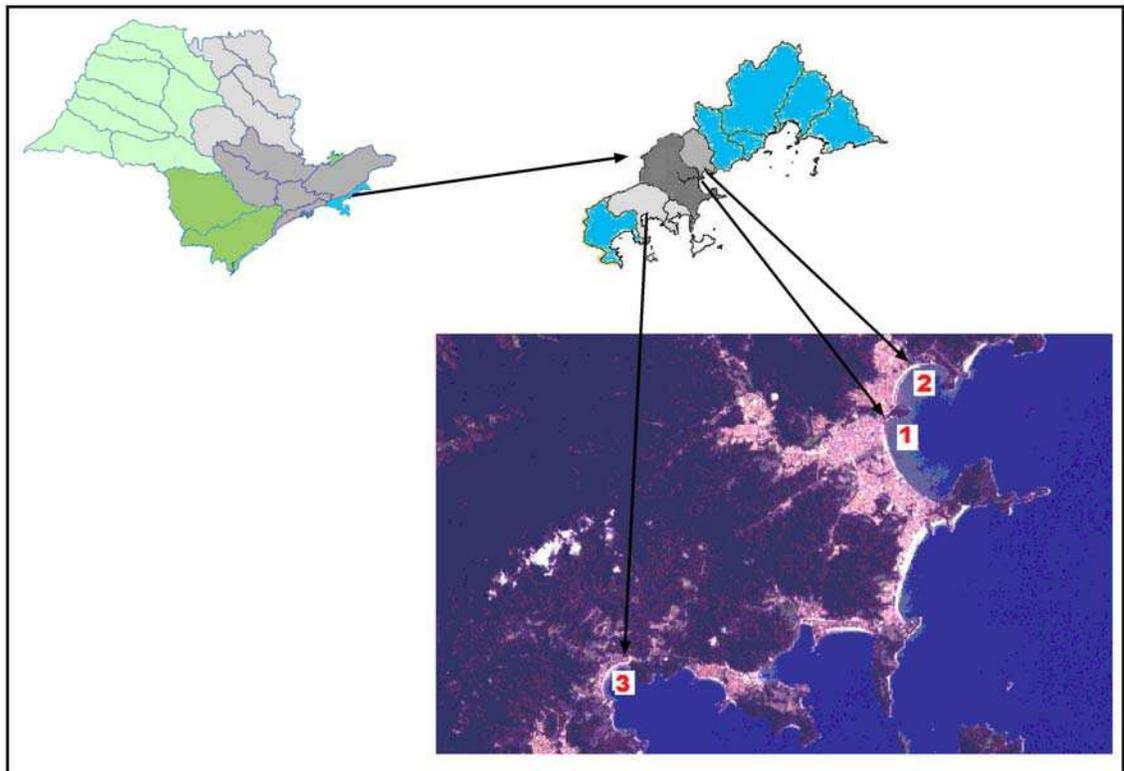


Figura 3. Mapa do Estado de São Paulo, mapa da UGRHI 3 – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da CETESB e imagem de satélite com os estuários do rio Grande de Ubatuba (1), do rio Indaiá (2), e dos rios Comprido e Escuro (3), cedida por Tiago Agostinho do Lageo Unitau: Landsat 7 / ETM Órbita/Ponto: 218/76 Data: 12/03/2002 UTM SAD 69.

O estuário do rio Grande de Ubatuba situa-se no centro da cidade ao final da praia do Cruzeiro onde localiza-se o mercado de peixes e suas coordenadas geográficas são $23^{\circ} 25' 52''$ S e $45^{\circ} 04' 11''$ O (figura 4). Recebe o esgoto de uma ETE - estação de tratamento de esgoto por lodo ativado, localizada no bairro do Ipiranguinha (CETESB, 2007), bem como os dejetos inerentes às atividades do comércio de peixe. O local também é utilizado como atracadouro para pequenas embarcações pesqueiras que servem de moradia temporária aos pescadores, os quais também lançam resíduos da atividade pesqueira e da manutenção destes barcos e podem ser percebidas manchas de óleos lubrificantes e combustíveis na superfície da água.

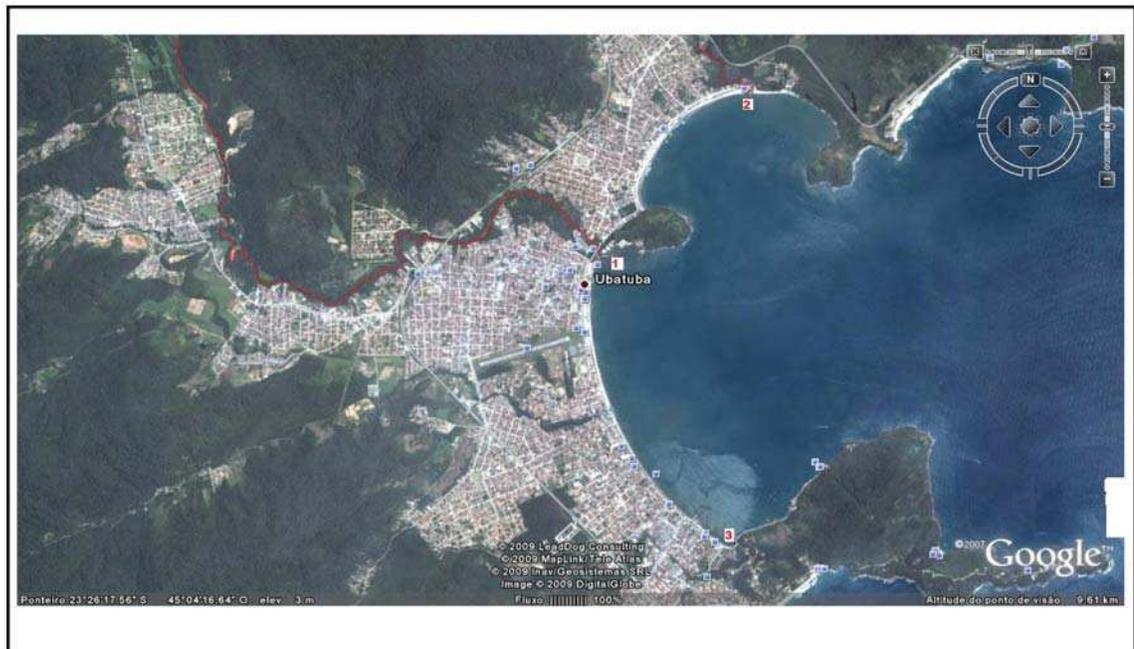


Figura 4. Imagem do *Google Earth* indicando a ocupação urbana em torno dos estuários do rio Grande de Ubatuba e do rio Indaiá. Foto aérea da ilha dos Pescadores no estuário do rio Grande de Ubatuba, foto por Miguel Angel disponível em <http://www.ubaweb.com/ubatuba/pontostur/index.php>, acesso em 10/04/09. Embaixo rio Grande de Ubatuba, fotos em 16/07/08 e 15/07/08 por Rosangela Almeida Victor.

O litoral próximo ao estuário do rio Indaiá, no final da praia do Perequê-açu, cujas coordenadas geográficas são 23° 25' 00" S e 45° 03' 14" O, é frequentado por turistas e pescadores, os quais mantêm residências com descarga de esgoto *in natura* (figura 5).



Figura 5. Estuário do rio Indaiá nas imagens do *Google Earth* acima e em fotos feitas em 17/01/09 por Rosângela Almeida Victor.

O impacto antrópico desse ambiente é considerado de menor intensidade, quando comparado com o estuário do rio Grande de Ubatuba, mas de maior impacto se comparado ao estuário do rio Escuro com o rio Comprido (CETESB, 2007).

O estuário da praia Dura que dista 22 km do centro de Ubatuba, cujas coordenadas geográficas são 23° 29' 34" S e 45° 09' 53" O, é caracterizado pelo encontro do rio Comprido com o rio Escuro (figura 6), tem a vegetação mais preservada e menor densidade populacional em relação aos outros dois estuários.

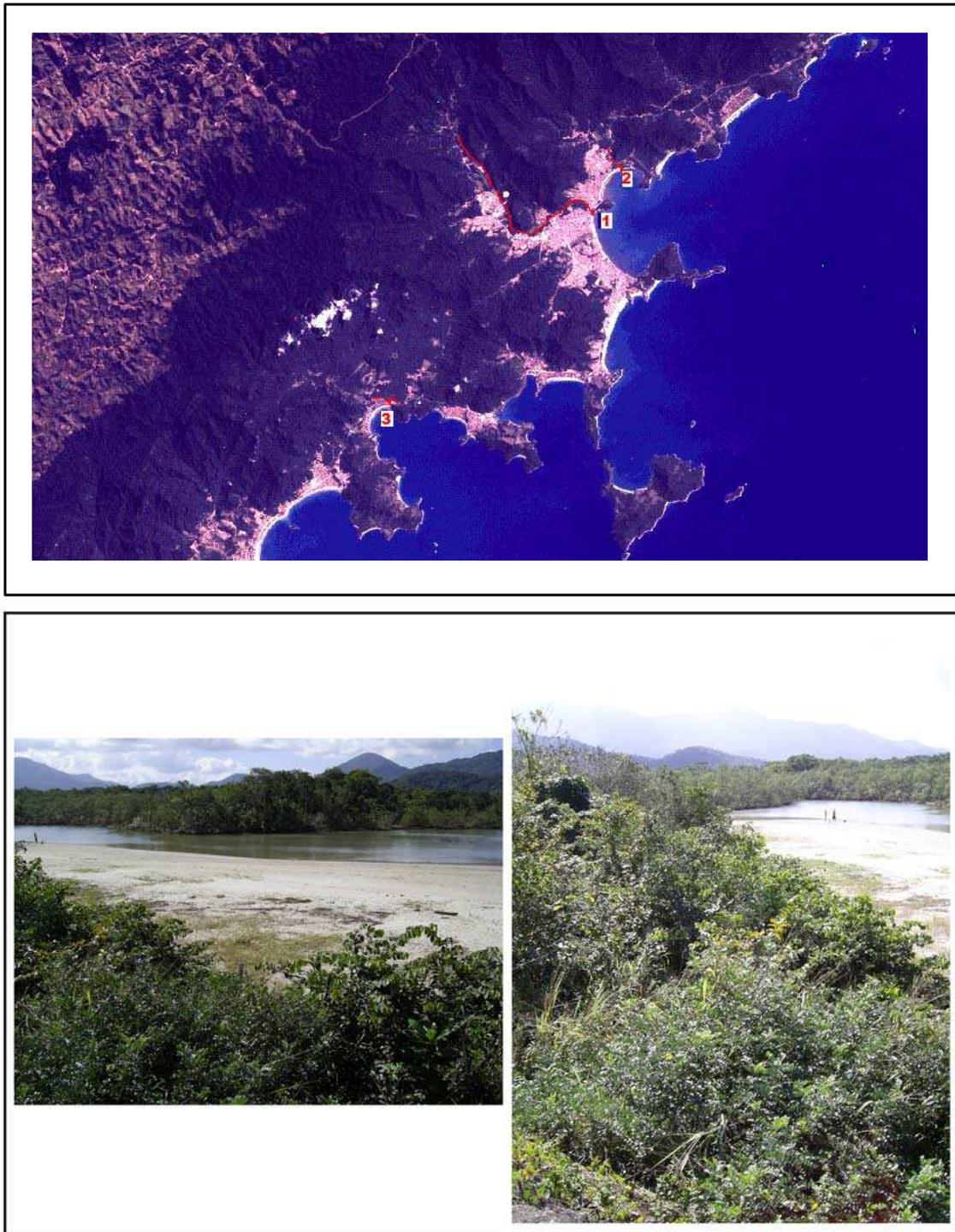


Figura 6. Imagem de satélite com os estuários do rio Grande de Ubatuba (1), do rio Indaiá (2), e dos rios Comprido e Escuro (3), cedida por Tiago Agostinho do Lageo Unitau: Landsat 7 / ETM Órbita/Ponto: 218/76 Data: 12/03/2002 UTM SAD 69. Embaixo estuário do rio Comprido e rio Escuro fotos feitas em 15/07/08 por Rosangela Almeida Victor.

3.3 Obtenção de Extratos Livres de Células

Foram utilizados para obtenção de extratos livres de células 10 espécimes do estuário do rio Grande de Ubatuba, 7 do estuário do rio Indaiá e 7 do estuário dos rios Escuro e Comprido.

Os exemplares de *G. genidens* foram pescados, nos meses de março, maio e julho de 2008, com linha e anzol. Logo após a pesca, rapidamente, os peixes ainda vivos, foram colocados um a um, em uma caixa de isopor com bomba de oxigênio e água do mar. Após cada etapa de coleta em cada um dos estuários, os bagres foram transportados, ainda vivos, para o Laboratório de Biologia Marinha - LabMar da UnitaU em Ubatuba. Os peixes foram mantidos vivos em aquários com aeração até o momento do sacrifício, mediante secção da coluna dorsal, quando então o fígado, músculo epaxial e encéfalo foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (MARTINEZ *et al.*, 2006). Esse material biológico foi transportado, a cada etapa de coleta, para o laboratório de Biologia Molecular da UNITAU e armazenado em freezer com temperatura de -80° C, até a sua análise no laboratório de Bioquímica, ambos no *Campus* do Bom Conselho, Taubaté, SP.

Para a obtenção de extratos livres de células, o fígado, músculo epaxial e encéfalo ainda congelados foram homogeneizados em “Potter-Elvehjem”, na proporção de 1 grama de tecido para 5 mL de tampão HEPES 20 mM (pH 7,4) contendo trimetilamina-N-óxido 1 mM, fosfato monobásico de potássio 5 mM e sacarose 250 mM. Os homogeneizados foram sonicados durante 15 segundos e centrifugados a 11.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante dos homogeneizados foram separados, transferidos para um banho de gelo e imediatamente utilizados para determinação das atividades específicas das enzimas arginase, malato desidrogenase e lactato desidrogenase.

Todas as etapas de obtenção dos homogeneizados foram conduzidas em temperaturas entre 0 e 4° C, como forma de minimizar a ação de proteases sobre as estruturas proteicas das enzimas.

3.4 Métodos Analíticos

A atividade da enzima LDH foi determinada no sentido da oxidação do NADH^+H^+ , em sistema de reação contendo 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM KCl, 140 μM NADH^+H^+ e 1 mM piruvato de sódio. A reação teve início pela adição de uma pequena alíquota do homogeneizado (10 a 50 μL) e a reação enzimática acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm pela oxidação do NADH^+H^+ . A atividade enzimática foi calculada utilizando coeficiente de extinção molar (ϵ) de 6,22 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para o NADH^+H^+ (JAVED *et al.*, 1995).

Uma unidade internacional (U) de LDH foi definida como a quantidade de LDH capaz de converter um μmol de piruvato em lactato no tempo de um minuto à temperatura de 25° C.

A atividade da enzima MDH foi determinada no sentido da oxidação do NADH^+H^+ , em sistema de reação contendo 100 mM de tampão Tris/HCl (pH 7,4), 20 mM MgCl_2 , 0,4 mM oxaloacetato e 150 μM NADH^+H^+ . A reação teve início pela adição de alíquotas dos homogeneizados (10 a 50 μL) e a reação enzimática acompanhada a 340 nm pela oxidação do NADH^+H^+ . A atividade enzimática foi calculada utilizando coeficiente de extinção molar (ϵ) de 6,22 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para o NADH^+H^+ (CHILDRESS e SOMERO, 1979).

Uma unidade internacional (U) de MDH foi definida como a quantidade de MDH que catalisa a transformação de um μmol de oxaloacetato em malato no tempo de um minuto à temperatura de 25° C.

A atividade argininolítica foi determinada em tampão Glicina 20 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM e MnCl_2 5 mM. A reação teve seu início pela adição de uma alíquota do homogeneizado tecidual (10 a 30 μL). O tempo de reação foi fixado em 15 minutos para os homogeneizados hepáticos e de 30 minutos para os homogeneizados de encéfalo e músculo epaxial. A reação foi interrompida pela adição do reativo ácido TDMU e a ureia formada na reação foi quantificada pelo método descrito por Geyer e Dabich (1971).

Uma unidade internacional (U) de arginase foi definida como a quantidade de arginase capaz de converter um μmol de L-arginina em L-ornitina mais ureia no tempo de um minuto à temperatura de 25°C .

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (SAB) como padrão proteico.

As atividades enzimáticas foram calculadas e expressas em U/mL de homogeneizado, bem como na forma de atividade específica (U/mg de proteína).

Todas as atividades foram determinadas à temperatura de 25°C e os resultados expressos em U/mg de proteína (Unidade Internacional por mg de proteína). Uma Unidade Internacional de LDH e MDH será definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de $1\mu\text{mol}$ de NADH^+H^+ em NAD^+ no tempo de 1 minuto.

3.5 Análise Estatística

As diferenças entre as médias das atividades enzimáticas dos peixes coletados nas enseadas do rio Grande de Ubatuba, do rio Indaiá e do rio Escuro com o rio Comprido, foram comparadas utilizando o teste ANOVA “one-way”, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

As diferenças encontradas entre as atividades específicas da LDH do fígado, músculo epaxial e encéfalo, dos espécimes de *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba, Indaiá e Comprido/Escurro, não foram significativas para $p < 0,05$.

Cabe observar que o nível hepático de LDH foi menor nos bagres coletados no estuário dos rios Comprido e Escuro, em relação aos outros dois estuários (figura 7).

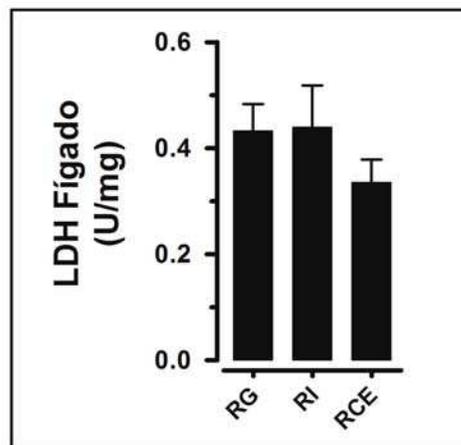


Figura 7. Atividade específica da enzima lactato desidrogenase do fígado do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escurro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

Músculo dos bagres coletados no rio Indaiá apresentou atividade de LDH superior as dos outros dois estuários (figura 8).

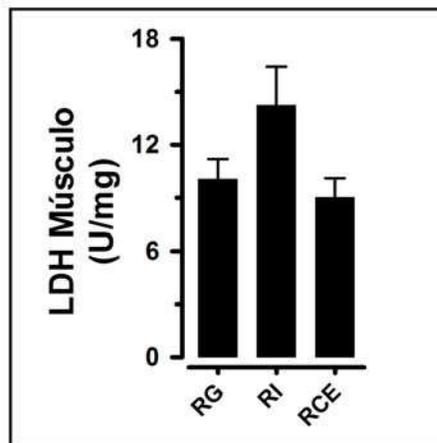


Figura 8. Atividade específica da enzima lactato desidrogenase do músculo, do bagre *G. genidens*. Os espécimes foram coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Esuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

Também o encéfalo dos espécimes do rio Indaiá apresentou atividade específica maior que a dos outros dois estuários (figura 9).

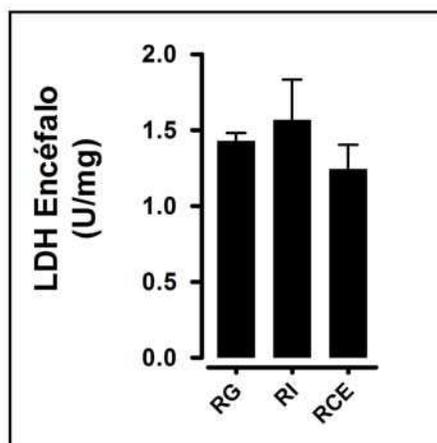


Figura 9. Atividade específica da enzima lactato desidrogenase do encéfalo, do bagre *G. genidens*. Os espécimes foram coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Esuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

Os fígados dos bagres coletados nos três estuários não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos níveis da enzima MDH. Pode-se notar que o fígado dos bagres dos rios Comprido/Esuro apresentou níveis mais elevados

dessa enzima, como uma possível tendência do potencial gerador de ATP mais elevado (figura 10).

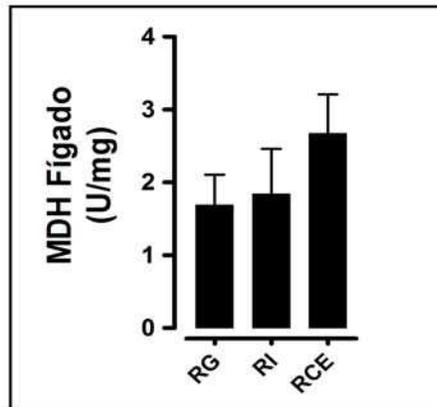


Figura 10. Atividade específica da enzima malato desidrogenase do fígado do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

A atividade específica da MDH muscular dos espécimes coletados no rio Indaiá foi significativamente diferente das atividades encontradas no músculo dos espécimes dos outros dois estuários (figura 11).

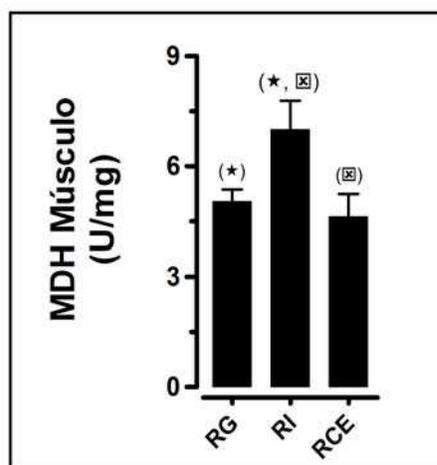


Figura 11. Atividade específica da enzima malato desidrogenase do músculo do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM. Os símbolos de estrela e de caixa marcam os resultados com diferenças significativas.

Embora as diferenças não sejam significativas ($p > 0,05$) o encéfalo dos bagres coletados no rio Grande apresentou níveis de MDH mais elevado em relação aos bagres coletados nos outros dois estuários (figura 12).

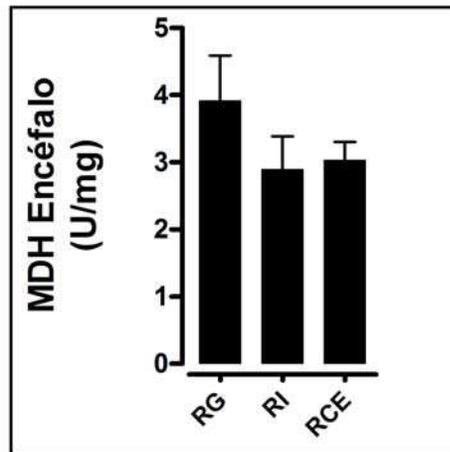


Figura 12. Atividade específica da enzima malato desidrogenase do encéfalo do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

Os níveis de arginase hepática foram significativamente ($p < 0,05$) maiores (4,4 vezes) nos exemplares coletados no estuário do rio Indaiá em relação àqueles coletados no estuário dos rios Comprido/Escuro (figura 13). A diferença entre os níveis de arginase hepática dos bagres coletados no rio Grande de Ubatuba e os outros dois estuários não foi estatisticamente diferente.

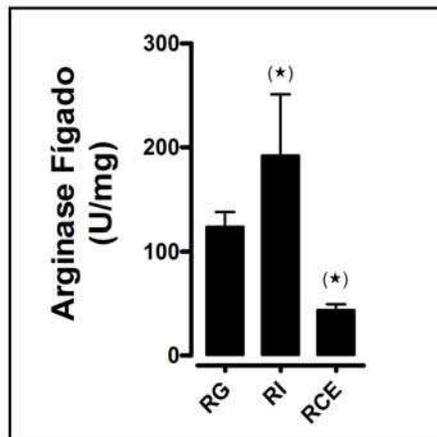


Figura 13. Atividade específica da arginase do fígado do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escurto (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM. Os símbolos de estrelas marcam os resultados com diferenças significativas.

Por outro lado, o tecido muscular apresentou comportamento distinto do fígado, com atividade argininolítica significativamente ($p < 0,05$) maior (4,8 vezes) nos bagres do rio Grande de Ubatuba em relação aos do rio Indaiá. A diferença da atividade argininolítica muscular dos bagres estuarinos dos rios Indaiá não foi estatisticamente diferente em relação aos bagres dos rios Comprido/Escurto. Observa-se que a atividade argininolítica muscular dos bagres estuarinos dos rios Comprido/Escurto foi 3,7 vezes maior em relação à do rio Indaiá (figura 14).

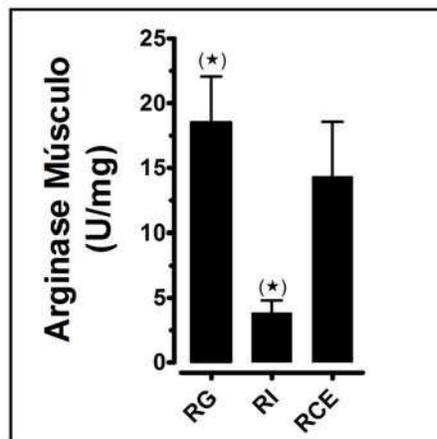


Figura 14. Atividade específica da arginase do músculo do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escurto (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM. Os símbolos de estrelas marcam os resultados com diferenças significativas.

Embora não significativa ($p > 0,05$), a atividade arginínolítica do encéfalo foi menor nos bagres estuarinos do rio Grande de Ubatuba e maior nos bagres estuarinos dos rios Comprido/Escuro (figura 15), em ordem crescente do mais para o menos impactado.

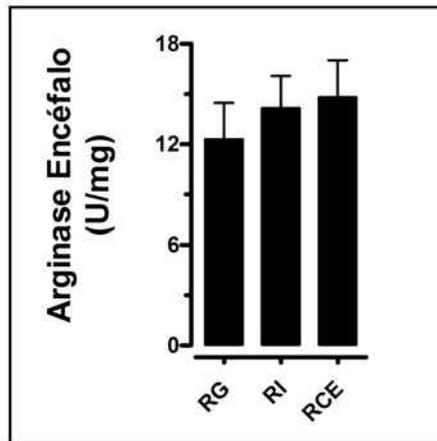


Figura 15. Atividade específica da arginase do encéfalo do bagre *G. genidens* coletados nos estuários dos rios Grande de Ubatuba (RG), Indaiá (RI) e Comprido/Escuro (RCE). Os valores estão representados pela média \pm SEM.

5. DISCUSSÃO

O município de Ubatuba, localizado no litoral norte do Estado de São Paulo, apresenta população residente de 75.008 habitantes (IBGE, 2007) e flutuante que ultrapassa 450.000 turistas na temporada de verão. O turismo representa a principal atividade econômica do município, seguida da atividade pesqueira (IBGE, 2007). Aproximadamente 23% das residências da região têm o seu esgoto tratado e o restante é descartado *in natura* (CETESB, 2007). O município apresenta cinco estações de tratamento à base de lodo ativado, fossa séptica e tanque de contato, que utilizam o rio Grande de Ubatuba e o rio Acaraú como corpos receptores desse tratamento (CETESB, 2007).

O entorno da região estuarina do rio Grande de Ubatuba apresenta elevada densidade populacional e abriga a ilha dos pescadores, estes utilizam esse estuário para desembarque do pescado e manutenção das pequenas embarcações, descartando no local os subprodutos da pesca e contaminando o estuário com óleo e combustível. O rio Indaiá abriga nos seus arredores uma pequena comunidade de pescadores e alguns bairros frequentados pela população flutuante do município. O estuário dos rios Comprido/Escuro apresenta em suas proximidades uma baixa densidade populacional, vegetação bem preservada e, comparado aos estuários anteriormente mencionados, foi considerado de baixo impacto antropogênico. Para fazer esta classificação foi utilizado o Relatório da Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo, Balneabilidade das Praias que tem registros de 1999-2006 (CETESB, 2007). Referem-se à pesquisa de coliformes termotolerantes e alguns outros parâmetros que cumprem ao objetivo da CETESB de tornar pública a condição de balneabilidade das praias, mas apresenta constância de resultados que permitem essa inferência.

O regime de chuvas e a atividade antropogênica são fatores que interferem nas propriedades físico-químicas do meio abiótico estuarino, alterando salinidade e a concentração do oxigênio dissolvido (BARLETTA *et al.*, 2008). Ubatuba é o mais chuvoso dos quatro municípios do Litoral Norte, conforme as médias pluviométricas mensais históricas num período de aproximadamente 30 anos, obtidas de postos pluviométricos do DAEE em cada município e consultadas pela CETESB em 2003 (CETESB, 2007).

As alterações dos ambientes aquáticos decorrentes da atividade humana não se limitam à eutrofização, mas também ao aporte de xenobióticos e metais pesados (VAN DER OOST *et al.*, 2003; YOUNG *et al.*, 2004).

Geralmente, as alterações do meio abiótico são acompanhadas de ajustes metabólicos capazes de garantir a sobrevivência dos organismos. A tolerância dos organismos à hipóxia varia de forma ampla e, geralmente, demanda ajustes do metabolismo energético aeróbio e anaeróbio (HOCHACHKA e LUTZ, 2001). Diferente do comportamento metabólico do *H. littorale* de ambientes eutrofizado e não eutrofizado (FALCI e RODRIGUES, 2007), a atividade específica da LDH hepática do bagre *G. genidens* não apresentou diferença significativa em relação à região estuarina de origem, embora nos bagres coletados no estuário dos rios Comprido/Escuro (de menor impacto antropogênico) tenha se apresentado menor do que nos bagres dos rios Grande e Indaiá (impacto antropogênico mais acentuado). Nesse sentido, o comportamento da expressão gênica da LDH muscular do *H. littorale* e a do bagre *G. genidens*, foram semelhantes, ao expressarem valores menores nos ambientes de baixa eutrofização, embora essas diferenças não sejam significativas.

O comportamento metabólico anaeróbio do *G. genidens*, ao contrário do *H. littorale*, pode estar relacionado com o sucesso adaptativo desse bagre às regiões estuarinas, onde a concentração de oxigênio varia sazonalmente em função do aporte de água doce nas cabeceiras dos rios (BARLETTA *et al.*, 2008). Isto é, os níveis teciduais da LDH do bagre *G. genidens* variaram em função do ambiente estuarino, mas não de forma expressiva, considerando que a expressão da LDH, imposta pela hipóxia, pode ter

origem na eutrofização natural do ecossistema, envolvendo chuva e o deslocamento sazonal desse bagre pelos diversos ambientes que compõe esses estuários.

Araújo *et al.* (2002) estudaram a distribuição de assembléias de peixes na baía de Sepetiba-RJ, relacionando alguns fatores ambientais e verificaram que a profundidade seguida da transparência e salinidade da água foram as condições que mais influenciaram na distribuição das espécies; sendo que a área mais interna do estuário tinha menor salinidade, profundidade e transparência, enquanto que a área mais externa tinha maior salinidade, profundidade e transparência. O *Genidens genidens* foi uma das espécies mais abundantes tanto na área interna quanto na área média do estuário, o que poderia estar relacionado com menor pressão de predação para as formas juvenis.

Estudos com músculo branco de 24 espécies de peixes pelágicos revelaram que a atividade das enzimas LDH e MDH diminuiu exponencialmente em relação ao aumento da profundidade de captura da espécie (CHILDRESS e SOMERO, 1979), indicando que o metabolismo energético desses peixes está naturalmente ajustado à disponibilidade de oxigênio do habitat. Algo semelhante, também pode estar ocorrendo com o bagre *G. genidens* nos estuários do município de Ubatuba, onde a disponibilidade sazonal de oxigênio na água pode ter ajustado o metabolismo desses peixes a essa condição abiótica, expressando níveis teciduais de LDH compatíveis com as suas necessidades metabólicas.

Por outro lado, a resposta metabólica aeróbia do bagre *G. genidens* não seguiu o mesmo perfil da anaeróbia. Os níveis de MDH no fígado foram crescentes no sentido do ambiente de maior para o de menor impacto (RG<RI<RCE) (figura 10), embora essas diferenças não sejam significativas ($p>0,05$) entre os espécimes coletados nos diferentes estuários. Como a MDH forma complexo com enzimas do ciclo de Krebs e da gliconeogênese, canalizando substratos para essas duas importantes vias metabólicas (MORGUNOV e SRERE, 1998; GIBSON e McALISTER-HENN, 2003), os níveis teciduais de MDH devem ser interpretados no contexto de um metabolismo energético baseado em proteínas (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Assim, os níveis elevados da MDH muscular dos bagres estuarinos do rio Indaiá, em relação àqueles coletados nos estuários dos rios Grande e Comprido/Escuro,

provavelmente estão relacionados com o sucesso adaptativo desses peixes e/ou com poluentes específicos, que estariam elevando a demanda energética desse tecido. Diferente do fígado, onde a MDH forma complexos com outras enzimas e canaliza substratos para gliconeogênese, no músculo, essa formação de complexos estaria canalizando substratos para manutenção dos níveis de ATP e, conseqüentemente, a manutenção da sua atividade fisiológica, como a captura do alimento e a fuga de predadores (KIRCHNER *et al.*, 2005).

Por outro lado, as necessidades energéticas do encéfalo são relativamente estáveis e independentes do momento fisiológico. Por isso, os níveis de MDH elevados no encéfalo dos bagres do estuário do rio Grande, em relação aos bagres coletados nos outros dois estuários, podem estar relacionados com a ação antropogênica (figura 12). Como essa diferença não foi estatisticamente significativa, novos estudos devem ser conduzidos para verificar se os níveis encefálicos de MDH poderiam ser utilizados como biomarcador desse tipo de impacto.

A atividade relativamente elevada da arginase hepática de peixes tem sido postulada como essencial para o controle dos níveis do aminoácido L-arginina, normalmente presente nas proteínas da dieta dos animais (RODRIGUES *et al.*, 2006). Com exceção de alguns peixes pulmonados, a grande maioria é amoniotética e excreta cerca de 10 a 30% do seu nitrogênio na forma de ureia, como produto derivado das atividades uricolítica e argininolítica (SAHA e RATHA, 1998). Como o fígado é a porta de entrada de nutrientes provenientes do intestino, esse tecido acaba sendo de vital importância para a manutenção dos constituintes sanguíneos.

Os baixos níveis de arginase no fígado e músculo, dos bagres coletados nos estuários dos rios Comprido/Escuro e Indaiá, respectivamente, coincidiram com os níveis elevados de MDH, nos mesmos tecidos e nas mesmas condições ambientais (figuras 13, 14, 10 e 11). Considerando que a MDH é uma das enzimas chaves do metabolismo energético e reflete o potencial gerador de ATP dos tecidos (CHILDRESS e SOMERO, 1979; TORRES e SOMERO 1988a,b), os níveis elevados de MDH nesses tecidos podem estar relacionados com uma maior demanda energética, a qual, coincidentemente foi acompanhada pelos baixos níveis de arginase nos mesmos tecidos.

Como a atividade arginínolítica tecidual dos animais não ureotélicos e não ureogênicos está associada ao controle da concentração de L-arginina nos tecidos, a síntese de poliaminas e óxido nítrico, moduladores metabólicos derivados da L-arginina, está indiretamente relacionada com a atividade da arginase. Assim, parece razoável supor que as condições ambientais estuarinas dos rios Comprido/Escuro e Indaiá, marcadas pelo aumento da MDH (potencial gerador de ATP) no fígado e músculo do bagre *G. genidens*, respectivamente, também foram acompanhadas pela redução nos níveis de arginase, responsável indiretamente pela modulação de funções fisiológicas importantes e dependentes do metabolismo L-arginina.

Concluindo, a atividade específica da LDH do fígado, músculo epaxial e encéfalo do *G. genidens*, enquanto enzima marcadora de hipóxia, não foi capaz de evidenciar e diferenciar os níveis de eutrofização (antrópica e/ou natural) dos estuários dos rios Grande de Ubatuba, Indaiá e Escuro. A condição natural de hipóxia tem sido observada durante períodos chuvosos, uma vez que o aporte de matéria orgânica e de nutrientes aumenta sensivelmente em algumas regiões dos estuários (BARLETTA *et al.*, 2008).

Por outro lado, os níveis de MDH e arginase podem estar refletindo o esforço metabólico adaptativo desse bagre. Embora pouco conhecida, a resposta molecular à hipóxia pode induzir um estado hipometabólico, com redução na síntese de proteínas e modulação do potencial gerador de ATP, ajustando o metabolismo às necessidades fisiológicas de sobrevivência em condições de hipóxia (WU, 2002). Os níveis relativamente elevados da MDH hepática e muscular, dos bagres coletados nos estuários dos rios Comprido/Escuro e Indaiá, respectivamente, refletem o potencial gerador de ATP desses tecidos e a sua provável demanda energética para manutenção de funções vitais, tais como crescimento e locomoção. Os níveis relativamente baixos de MDH no fígado e músculo dos bagres coletados no estuário do rio Grande de Ubatuba podem estar relacionados com as condições ambientais desfavoráveis impostas pela atividade antropogênica na região.

Considerando que o NO e as poliaminas controlam uma ampla faixa de processos fisiológicos, fisiopatológicos e sinalizam respostas metabólicas disparadas por

NO, superóxidos e hipóxia (WU e MORRIS, 1998; PFEILSCHIFTER *et al.*, 2001), parece razoável admitir que as diferenças entre as atividades argininolíticas hepática e muscular, dos bagres coletados nos três estuários, podem estar modulando importantes processos fisiológicos adaptativos.

6. CONCLUSÃO

Como marcadora no metabolismo das poliaminas e do óxido nítrico, os níveis de arginase se apresentaram alterados no fígado e músculo do *G. genidens*. No fígado, a diferença foi significativa entre os espécimes do estuário do rio Indaiá em relação ao rio Escuro e no músculo essa diferença ficou evidente em relação à atividade argininolítica dos estuários do rio Grande de Ubatuba e do rio Indaiá. Essas diferenças revelaram que há atividade antropogênica interferindo com o metabolismo desses dois tecidos, essenciais no contexto dos sistemas fisiológicos digestório e locomotor.

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of Reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish, *Comp. Biochem. Physio.*, v. 138 A, p. 405-415, 2004.

ARAÚJO, G.F.; AZEVEDO, M.C.C.; SILVA, M.A.; PESSANHA, L.M.; GOMES, I.D.; CRUZ-FILHO, A.G., Environmental influences on the demersal fish assemblages in the Sepetiba Bay, Brasil, *Estuaries*, v. 25, n. 3, p. 441-450, 2002.

ANSARI, T.M.; MARR, L.L.; TARIQ, N., Heavy Metals in Marine Pollution Perspective-A Mini Review, *Journal Applied Sciences*, v. 4, n.1, p.1-20, 2004.

BARLETTA, M.; AMARAL, C.S.; CORRÊA, M.F.M.; GUEBERT, F.; DANTAS, D.V.; LORENZI, L.; SAINT-PAUL, U.; Factors affecting seasonal variations in demersal fish assemblages at an ecocline in a tropical-subtropical estuary, *J. Fish Biol.*, v. 73, p. 1314-1336, 2008.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMARGO, O. A. F., *Ubatuba ou “Ubachuva” uma questão de geografia* – Ubatuba SP – Editoração Eletrônica graphbox Edit. Elet., outubro 1994.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo Balneabilidade das Praias 2006, CETESB, 2007. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 03/06/2007, 21h35 min. e 29/01/09, 15h20 min.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N., Depth-Related Enzimic Activies in Muscle, Brain and Heart of Deep-Living Pelagic Marine Teleosts, *Mar. Biol.*, v. 52, p. 273-283, 1979.

COSTA, M. P. F.; GALVÃO, S. M. G.; NOVO, E. M. L. M., Quantificação espacial de clorofila-a na água do mar utilizando dados do sensor TM/Landsat-5: região costeira de

Ubatuba, SP, In: *Anais IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, INPE, Santos, p. 805-816, 1998.

www.dae.sp.gov.br banco de dados pluviométricos do Estado de São Paulo, consultado pela CETESB em 2003, conforme CETESB (2007).

FALCI, T.C.A.F.C; RODRIGUES, E., Metabolismo anaeróbico da glicose e da arginina em *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae;Teleostei) como biomarcador de eutrofização ambiental, *Rev. Biociên. Taubaté*, v. 13, p. 71-78, 2007.

FERNANDES, A. J.; PEREIRA, L. C. S., Características do ambiente, In: *Manguezal Ecossistema entre a terra e o mar*, Schaeffer-Novelli, Y., Caribbean Ecological Research, p. 13-27, 1995.

FERNANDES, D.; PORTE, C.; BEBIANNO, M.J., Chemical residues and biochemical responses in wild and cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax* L), *Environ. Res.*, v. 103(2), p. 247-256, 2007.

GEYER, J. W.; DABICH, D., Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates, *Anal. Biochem.*, v. 39, p. 412-417, 1971.

GIBERTI, P. P. C.; BARBIERE, P. P. G., Aplicação de imagens orbitais de média resolução espacial para o monitoramento da expansão urbana. Município de Ubatuba-SP, In: *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, p. 5269-5275, 2007.

GIBSON, N.; McALISTER-HENN, L., Physical and Genetic Interactions of Cytosolic Malate Dehydrogenase with Other Gluconeogenic Enzymes, *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 25628-25636, 2003.

HADDAD, Jr. V.; MARTINS, I.A.; Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study, *Toxicon*, v. 47, p. 838-843, 2006.

HAJISAMAE, S.; CHOU, L. M., Do shallow water habitats of and impacted coastal strait serve as nursery grounds for fish? *Estuar. Coast Shelf Sci.* v. 56, p. 281-290, 2003.

HOCHACHKA, P.W.; LUTZ, P.L., Mechanism, origin and evolution of anoxia tolerance in animals, *Comp. Biochem. Physiol.-B, Biochem. Mol. Biol.*, v. 130, p. 435-459, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, cidade de Ubatuba, contagem da população até 2007. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>, acesso 28/01/09 23h45 min.

- JAVED, M.; YOUSUF, F. A.; HUSSAIN, A.N.; ISHAQ, M.; WAQAR, M. A. Purification and properties of lactate dehydrogenase from liver of *Uromastix hardwickii*, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 111 B, n. 1, p. 27-34, 1995.
- JENKINSON, C. P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D., Comparative Properties of Arginases, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 114 B, n. 1, p. 107-132, 1996.
- KENNISH, M. J., *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*, CRC Press, New York, 1992.
- KIRCHNER, S.; SEIXAS, P.; KAUSHIK, S.; PANSERAT, S., Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B, v. 140, p. 333–340, 2005.
- LARQUÉ, E.; SEBATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S., Biological significance of dietary polyamines, *Nutrition*, v. 23, p. 87-95, Elsevier, 2007.
- LI, H.; MEININGER, C.J.; HAWKER JR., J.R.; HAYNES, T.E.; KEPKA-LENHART, D.; MISTRY, S.K.; MORRIS, S.M.; WU JR., G.; Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells., *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.*, v. 280 (E), p.75-82, 2001.
- MARTINEZ, M. L.; LANDRY, C.; BOEHM, R.; MANNING, S.; CHEEK, A. O.; REES, B.B., Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*, *J. Exp. Biol.*, v. 209, p. 3851-3861, 2006.
- MARCENIUK, A. P., Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, *Ariidae*) da Costa Brasileira, *Boletim Instituto de Pesca*, USP, 31(2), p. 89-101, 2005.
- MENEZES, G. V., Produtividade dos Manguezais, In: *Manguezal Ecossistema entre a terra e o mar*, Schaeffer-Novelli, Y., Caribbean Ecological Research, p. 39-40, 1995.
- MINIC, Z.; HERVE, G.; Arginine Metabolism in the Deep Sea Tube Worm *Riftia pachyptila* and Its Bacterial Endosymbiont, *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 40527-40533, 2003.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P., Polyamines: metabolism and implications in human diseases, *Clin. Nutr.*, v. 24, p. 184-197, Elsevier, 2005.
- MORGUNOV, I.; SRERE, P. A., Interaction between Citrate Synthase and Malate Dehydrogenase, Substrate Channeling of Oxaloacetate, *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 29540-29544, 1998.

NOVAES JR., R. A.; SIMI JR., R.; VALÉRIO FILHO, M.; PINTO, S. A. F., Monitoramento da cobertura vegetal em áreas litorâneas, In: *Anais VIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Salvador, p. 541-542, 1996.

PATERSON, A.W.; WHITFIELD, A.K., Do Shallow-water Habitats Function as Refugia for Juvenile Fishes? *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, v. 51, p. 359-364, 2000.

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; BECK, K. F., Regulation of gene expression by nitric oxide, *Pflügers Archiv.: European Journal of Physiology*, v. 442, p. 479-486, 2001.

RODRIGUES, E., RIBEIRO, A.C.M.T.; BACILA, M., L-arginine metabolism in mitochondria isolated from the liver of Antarctic fish *Notothenia rossii* and *Notothenia neglecta*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 825-833, 2006.

RODRIGUES, E.; SANTOS, M.; RODRIGUES JÚNIOR, E.; GANNABATHULA, S., LAVRADO, H., Arginine metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (KING e BRODERIP, 1831): an Ecophysiological Approach. *Polar Biol.*, in press, 2009.

ROSSINI-PENTEADO, D.; MARQUES, M., L.; GUEDES, A. C. M.; GIBERTI, P. P. C., Classificação orientada por regiões em imagem IKONOS para a identificação e análise da cobertura do solo urbano de Ubatuba (SP), In: *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, p. 661-669, 2007.

SAHA, N.; RATHA, B.K., Ureogenesis in Indiana ir-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints, *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, v. 120, p.195-208, 1998.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., Perfil dos ecossistemas litorâneos brasileiros, com especial ênfase sobre o ecossistema manguezal. Publicação Especial, *Instituto Oceanográfico*, São Paulo, n.7, p.1-16, 1989.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., *Manguezal Ecossistema entre a terra e o mar*, Caribbean Ecological Research, p. 1-64, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y, Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha, In: PROBIO - Programa Nacional da Biodiversidade; PRONABIO - Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira, 1999. Disponível em: www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/mangue, acesso em: 02/09/06.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., COELHO JUNIOR, C.; TOGNELLA-DE-ROSA, M., Manguezais, 1-48, Ática, São Paulo, 2004.

____SMA/SÃO PAULO, Macrozoneamento do Litoral Norte – Plano de Gerenciamento Costeiro, São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1996. (Série Documentos).

SORENSEN, E. M. B. Metal Poisoning in Fish, In: *Environmental and Life Science Associates Austin*, 1: p. 1-16, CRC Press, Texas, 1991.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N., Vertical distribution and metabolism in Antarctic mesopelagic fishes, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 90B (3): p. 521-528, 1988a.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N., Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes, *Mar. Biol.*, v. 98: p. 169-180, 1988b.

www.ubaweb.com/ubatuba/pontostur/index.php, foto aérea por Miguel Angel da Ilha dos Pescadores, acesso 10/04/09 – 18h40min.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E., Review article Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANNUCCI, M., What is so special about mangroves? *Braz. J. Biol.* V. 61(4), p. 599-603, 2001.

VANNUCCI, M., Os manguezais e nós: uma síntese de percepções, Editora da Universidade de São Paulo-Edusp, p.1-244, 2003.

VISNADI, S.R., Marchantiophyta e Bryophyta de manguezais do estado de São Paulo, Brasil, *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, Belém, v. 3, n. 1, p. 69-80, 2008.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. Principles of Ecotoxicology, In: Bristol, Taylor e Francis, *Biochemical Effects of Pollutans*, p. 131, 1997.

WHITFIELD, A. K.; ELLIOT, M.; Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: A review of progress and some suggestions for the future, *J. Fish Biol.*, v.61, p. 229-250, 2002.

WU, G.; MORRIS JR., S. M., Arginine Metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem. J.*, v. 336, p. 1-17, 1998.

WU, R. S. S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses, *Mar. Pollut. Bull.*, v. 45, p. 45-35, 2002.

YOKOYA, N. S., Distribuição mundial de manguezais, In: *Manguezal Ecosistema entre a terra e o mar*, Schaeffer-Novelli, Y., Caribbean Ecological Research, p. 9-10, 1995.

YOUNG, S.; BALLUZ, L.; MALILAY, J., Natural and technologic hazardous material releases during and after natural disasters: a review, *Sci. Total Environ.*, v. 322, p. 3-20, 2004.