



Transaminases Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade no caranguejo *Cardisoma guanhumi*: Utilidade no monitoramento de risco ambiental.

Doutorando: César Roberto Goes Carqueija

Orientadora: Prof^a Dr^a. Iracema Andrade Nascimento

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Elisabete Freire Santos da Cunha

Salvador, Bahia

2014

Tese apresentada ao Programa de Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: RECURSOS NATURAIS.

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia-UFBA
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbioba@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: César Roberto Góes Carqueija

TÍTULO DO PROJETO: "Caracterização das transaminases Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade no caranguejo *Cardisoma guanhumi*: Utilidade no monitoramento de risco ambiental"

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento

PROFESSORA CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Elisabete Freire Santos da Cunha

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

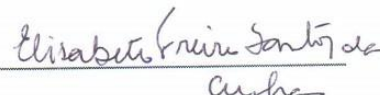
Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento – UFBA
(Orientadora)

satisfatório



Profa. Dra. Elisabete Freire Santos da Cunha - UFRJ
(Co - orientadora)

satisfatório



Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva - UFC
(Examinador)

satisfatório



Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau – UFBA
(Examinador)

satisfatório



Profa. Dra. Suzana Telles da Cunha Lima - UFBA
(Examinadora)

satisfatório



DATA DA DEFESA DE TESE: 29 de janeiro de 2014

HORÁRIO: 9hs

LOCAL: Auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar
ICS/UFBA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,

SIBI - UFBA

Carqueija, Cesar Roberto Goes

Transaminases Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade no caranguejo *Cardisoma guanhumi*: Utilidade no monitoramento de risco ambiental./ Cesar Roberto Goes Carqueija – Salvador, 2014.

99 f.

Orientadora: Profª Drª Iracema Andrade Nascimento.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Cloranfenicol. 2. *Cardisoma guanhumi*. 3. Transaminases. 4. ALT e AST. 5. Biomarcadores. I. Nascimento, Iracema Andrade. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU:

Aos meus pais, Leonor e Jaime, falecidos no mesmo ano em que ingressei no Doutorado. A dor e saudade inenarráveis geradas pela perda dupla de vocês, só foram superadas pelos aprendizados de força, coragem e dedicação que vocês sempre me inspiraram. Só assim, consegui chegar até aqui. Essa tese é de vocês...

Agradecimentos

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Iracema Andrade Nascimento pelo apoio, incentivo sempre constante e principalmente pela grande inspiração como pesquisadora, com sua precisão científica, visão ampla, competência, seriedade e objetividade. Serei sempre grato pela confiança e credibilidade depositada em mim durante a jornada.

A co-orientadora Pro^a Dr^a Elisabete Freire Santos da Cunha, da Universidade Federal da Bahia, pela sua colaboração valiosa, incondicional, e imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho, sem o qual não poderia tê-lo concluído. A convivência e trocas científicas me trouxeram grandes aprendizados. É bom estar cercado de pessoas talentosas que tem o que contribuir para nossa formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Roberto Feitosa, do laboratório de histologia animal da Universidade Federal do Ceará, pelas valiosas contribuições na parte histológica, e por ter cedido sempre gentilmente, o espaço e todos os equipamentos e materiais necessários para a realização das avaliações histopatológicas. Obrigado pelo apoio, parceria e amizade de sempre!

Ao técnico Robson de Jesus Mendes da Universidade Federal do Ceará pelo suporte sempre simpático, incondicional e amigo no laboratório de histologia animal.

A Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha, da Universidade Federal da Bahia e do Mestrado em Bioenergia da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Salvador, pela concessão despretensiosa do laboratório, equipamentos e materiais necessários à execução das análises bioquímicas.

A Profª Drª. Angelica Correa Araújo, da Universidade Federal da Bahia, pela amizade, incentivo, e históricas parcerias científicas que proporcionaram sustentação científica para este trabalho.

A Profa. MSc. Virginia Guimarães Almeida, coordenadora do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Salvador, pela amizade grandiosa e incondicional, incentivo e compreensão de minhas faltas. Serei sempre grato.

A Profa. Dra. Rita de Cássia Farani Assis pela sólida amizade, carinho, e convivência. Você foi uma grande inspiração como docente. Obrigado pelas palavras de incentivo e o cuidado que sempre teve comigo.

As amigas e colegas do doutorado Bernadete Neiva e Andrea Cristina Santos pela convivência incrível, amiga e solidária durante todo o curso.

A Bióloga Giovanna Carrozzo, amiga e irmã, presente em todas as horas. Você é incrível.

Aos estagiários de Ciências Biológicas da Faculdade de Tecnologia e Ciências Tiago Oliveira e Havany Fontana pela responsabilidade, compromisso, cuidado e presteza na manipulação dos animais em cativeiro, sempre quando necessário.

Aos amigos Dr. Alexandra Branco e Drª Carla Branco, da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela grande amizade, discussões científicas valiosas e disponibilidade todas as vezes que precisei.

A minha família, pela união e por existir de forma tão onipresente.

RESUMO

Os biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas preventivas na avaliação de riscos ambientais. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade usando caranguejo semiterrestre *Cardisoma guanhumi*. O cloranfenicol, um antibiótico de uso ilegal em aquiculturas no mundo, foi utilizado como agente indutor. As transaminases ALT e AST da hemolinfa de dez indivíduos foram quantificadas antes e após tratamento com cloranfenicol. Técnicas histoquímicas foram utilizadas para avaliação histopatológica do hepatopâncreas de *C. guanhumi*. Adicionalmente, foi feita uma investigação de possíveis alterações do perfil das proteínas majoritárias na hemolinfa de animais controle e tratados, através de eletroforese em gel desnaturado de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE). As análises histopatológicas demonstraram que o tratamento com cloranfenicol na dosagem de 50 mg/Kg, promoveu danos no tecido hepatopâncreático, evidenciados pela grande vacuolização, aumento no diâmetro vacuolar e intensa atividade secretora. Um aumento de 10 vezes e 5 vezes nos níveis hemolinfáticos de ALT e AST, respectivamente, demonstra que o efeito tóxico do antibiótico pode ser detectado pela quantificação dos níveis hemolinfáticos de ALT e AST. A eletroforese de gel de poliacrilamida revelou uma alteração no perfil das proteínas presentes na hemolinfa, caracterizado principalmente por redução nas bandas de 120 KDa e 15 KDa e aumento na banda de 30 KDa. A validação das transaminases ALT e AST como biomarcadores de toxicidade em *C. guanhumi* amplia as perspectivas da utilização desses biomarcadores para avaliação dos riscos ambientais de outros antibióticos similares, usados em aquicultura.

Palavras-chave: 1. Cloranfenicol. 2. *Cardisoma guanhumi*. 3. Transaminases. 4. ALT e AST. 5. Biomarcadores.

ABSTRACT

Biomarkers have been used as preventive tools in environmental risk assessment. The present study aims to characterize the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) as biomarkers of toxicity in the semi-terrestrial crab *Cardisoma guanhumi*. Chloramphenicol, an illegal antibiotic, used worldwide in aquaculture was used as a toxicity inductor. ALT and AST were quantified in hemolymph of ten individuals before and after treatment with chloramphenicol. Histochemical techniques were used for histopathological evaluation of the hepatopancreas of *C. guanhumi*. In addition, an investigation was made in changes to major proteins in the hemolymph control and treated animals using SDS-PAGE. Histopathological analysis showed that treatment with 50 mg/kg chloramphenicol at a dose of promoted hepatopancreatic damage, evidenced by extensive vacuolization, increase of vacuolar diameter and intense secretory activity. 10 times and 5 times in hemolymphatic AST and ALT were observed, respectively, demonstrating that toxic effect of the antibiotic can be detected by quantifying the hemolymphatic levels of those enzymes. SDS-PAGE revealed a change in proteins profile of the hemolymph, mainly characterized by reduction of 120 kDa and 15 kDa, as well as increased 30 kDa. Validation ALT and AST as biomarkers for toxicity in *C. guanhumi* broadens the perspectives of using those biomarkers for environmental risk assessment on other similar antibiotics, used in aquaculture.

Palavras-chave: 1. Chloramphenicol 2. *Cardisoma guanhumi*. 3. Transaminases. 4. ALT and AST. 5. Biomarkers.

SUMÁRIO

1.Introdução	9
2. Revisão de literatura	
2.1. Toxicologia ambiental.	12
2.2. Bioensaios de Toxicidade	16
2.3. Crustáceos: ambiente e cultivo.....	19
3.Objetivos.....	23
3.1.Geral	23
3.2. Específicos	23
4. Resultados.....	24
4.1. Patente: "Protocolo de avaliação de toxicidade em crustáceos decápodes e seus usos"	26
4.2. Artigo: Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade em <i>Cardisoma guanhumi</i> : Utilidade no monitoramento ambiental.	44
5. Discussão.	70
6. Considerações finais.....	78
7. Referências bibliográficas.....	80

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho, assim como as zonas costeiras e seus ecossistemas associados tem sido alvos de preocupação internacional, pela importância global desses sistemas e suas riquezas biológicas, que oferecem possibilidades para um desenvolvimento sustentável. O Direito internacional do ambiente marinho, contido nas disposições da Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (ONU, 1982) estabelece os direitos e os deveres dos países, relacionados a proteção e ao desenvolvimento sustentável desses ambientes e seus recursos naturais (Filho et al,1992).

Neste contexto , surge a necessidade de novas abordagens de gerenciamento e desenvolvimento marinho e costeiro nos planos mundial, nacional, regional e sub-regional , com abordagens integradas, alicerçadas pela precaução e antecipação de riscos do uso e de atividades relacionadas a estes sistemas . Elas incluem o gerenciamento integrado e desenvolvimento sustentável das zonas costeiras , inclusive zonas econômicas exclusivas ; Proteção do meio ambiente marinho e Uso sustentável; Conservação dos recursos marinhos vivos de alto-mar ; Uso sustentável e conservação dos recursos marinhos vivos sob jurisdição nacional ; Análise das incertezas críticas para o manejo do meio ambiente marinho e a mudança do clima; Fortalecimento da cooperação e da coordenação no plano internacional , inclusive regional; e Desenvolvimento sustentável das pequenas ilhas (Filho et al, 1992).

Em relação a proteção ao ambiente marinho, a Agenda 21 da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento de 1992 aponta que os maiores tenses que ameaçam o ambiente marinho, dentre eles , os esgotos ,nutrientes, compostos orgânicos sintéticos , sedimentos , lixo, metais, radionuclídeos e hidrocarbonetos , são provenientes de diversas atividades humanas, como ocupação desordenada, construção de infraestrutura costeira , cultivos de organismos vegetais e animais , desenvolvimento urbano, turismo, indústria, transporte e atividades marítimas.

Desta forma, faz-se necessário: (i) adotar medidas de precaução , monitoramento e reparação, através do uso de instrumentos de avaliação de impactos ambientais, de tecnologias limpas , reciclagem, saneamento , e manejo adequado de substâncias perigosas, para as quais, algumas ações devem ser efetivadas, a exemplo da aplicação de critérios preventivos, de precaução e de antecipação, de modo a evitar a degradação do meio ambiente marinho e reduzir os riscos de longo prazo ou irreversíveis; (ii) Realizar avaliações prévias das atividades que possam indicar possíveis impactos negativos sobre o ambiente marinho e; (iii) Estabelecer incentivos econômicos para a aplicação de tecnologias limpas, objetivando evitar a degradação do ambiente marinho (Filho, 1992).

Assim, os países signatários da Agenda 21 ratificaram seu apoio aos países em desenvolvimento para a efetivação dessas diretrizes, comprometendo-se a oferecer recursos financeiros adicionais e promover a acessibilidade dessas nações, à tecnologias mais limpas e às pesquisas pertinentes.

Nesta direção , a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento estabeleceu as seguintes prioridades : (i) Fortalecer pesquisas sobre alternativas aos produtos químicos tóxicos que apresentem grandes riscos para a saúde humana e/ou ao meio ambiente ; (i i) Promover a pesquisa e a validação de métodos que substituam a utilização de animais de laboratório; (iii) Promover os estudos epidemiológicos pertinentes a fim de estabelecer uma relação de causa e efeito entre a exposição a produtos químicos e a ocorrência de certas moléstias; (iv) Promover estudos ecotoxicológicos , a fim de avaliar os riscos dos produtos químicos para o meio ambiente e; (v) Desenvolver recursos humanos.

Entretanto , paradoxalmente , a Agenda 21 estimulou o desenvolvimento de atividades econômicas reconhecidamente geradoras de contaminantes,

a exemplo da aquicultura (Carvalho et al, 2009) (Defoirdt et al, 2007), que tem crescido de forma expressiva nas últimas décadas em todo o mundo e cujas projeções anuais de crescimento até 2020 apontam para a ampliação desse tipo de atividade em escala global (FAO, 2006).

Como preocupação concomitante ao incentivo de atividades como a aquicultura, a Convenção das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, incentivou o desenvolvimento de tecnologias aquícolas ecologicamente saudáveis e sua difusão em países com baixa ou nenhuma experiência tecnológica em aquicultura, assim como a avaliação permanente de impactos ambientais deste tipo de atividade.

O desenvolvimento sustentável de um país ou qualquer outro território político deve ser avaliado nas dimensões econômica, social e ambiental, constituindo um tripé indissociável. O uso de indicadores seguros de avaliação de sustentabilidade (Kronembergerl et al, 2008) devem ser utilizados como mecanismos político-administrativos de gestão, para que de fato, se promova ações que favoreçam o equilíbrio entre essas três dimensões. Do conservacionismo radical, passando pelo ambientalismo moderado até a Ecologia política dos tempos atuais (Jatobá et al, 2009), eis o grande desafio mundial para o século XXI.

Dentro dessa visão integrada de sustentabilidade, a Toxicologia Ambiental terá papel fundamental no desenvolvimento de novas metodologias e busca de biomarcadores de toxicidade de baixos custos e de rápida resposta, como instrumentos de predição de riscos ambientais de forma a anteceder não somente avarias ambientais, especialmente sobre a biota, mas também como subsídio para decisões políticas de planejamento de territórios e nações, em nível estratégico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Toxicologia Ambiental

A Toxicologia é a ciência que avalia o efeito adverso de substâncias que interagem com os seres vivos (Kiaassen e Watkins , 2001; Moraes et al, 1991) e abrange as propriedades físicas e químicas dos agentes tóxicos , os efeitos fisiológicos ou comportamentais nos organismos vivos , os métodos qualitativos e quantitativos para análises em materiais biológicos e não-biológicos e o desenvolvimento de procedimentos para o tratamento de intoxicação (Moreau, 2011; Langman e Kapur, 2006).

Na Toxicologia , o monitoramento é uma atividade sistemática de medidas e interpretações realizada com o objetivo de prevenir o aparecimento de efeitos adversos decorrentes de uma exposição , podendo ser ambiental ou biológica. Frequentemente, os parâmetros medidos e interpretados não se relacionam com a prevenção de um efeito adverso, mas com o diagnóstico precoce de um estado patológico inicial (Leite, 2011).

O monitoramento biológico tem sido utilizado como complementação do monitoramento ambiental (Leite, 2011), buscando indicadores de alterações biológicas em diversos níveis de organização e complexidade, capazes de detectar alterações sub-letais em organismos expostos a agentes tóxicos , sendo denominados de biomarcadores. Isto faz-se necessário devido ao fato que as análises químicas determinam apenas as concentrações de substâncias no meio, sendo incapazes de apontar ações sinérgicas ou aditivas entre contaminantes e entre eles e outros parâmetros físico-químicos ambientais , que podem ser responsáveis por um substancial aumento em suas ações tóxicas (Nascimento et al., 2002).

Os biomarcadores são importantes ferramentas na detecção ou predição de doenças e respostas de organismos às drogas (Kaniwa, 2013). Em razão disso têm apresentado crescente uso em estudos ambientais preventivos, que buscam identificar respostas dos organismos a substâncias tóxicas e ao estresse, antes que efeitos irreversíveis possam ocorrer (Vilella, et al, 2007). Esses biomarcadores podem ser de qualquer nível de organização biológica, desde o molecular (Krishna e Hayashi, 2000; Ulupinar e Okomus, 2002) ao cossistêmico (Nipper et al, 1998; Grall e Glemarec, 1997; Chapman et al, 1987).

Marcadores biológicos podem ser seletivos ou não-seletivos. Os seletivos são geralmente metabólitos específicos em amostras biológicas que não são intrínsecos ao organismo na ausência de uma exposição a um xenobiótico, enquanto que os não-seletivos são aqueles que podem ser detectados mesmo na ausência de exposição a um dado xenobiótico (Leite, 2011).

A determinação de riscos de agentes tóxicos para a saúde humana e o meio ambiente tem sido uma preocupação mundial crescente. Segundo Silva e Fonseca (2003), estas ferramentas envolvem metodologias que incluem quatro pontos fundamentais: a identificação da substância tóxica que potencialmente pode provocar efeitos adversos a saúde humana e ao ecossistema; avaliação dos cenários de exposição a esses agentes tóxicos; caracterização dos efeitos na saúde humana e ecossistema e; estimativa de risco de ocorrência dos efeitos adversos.

Os ambientes aquáticos são mais complexos para determinação de riscos do que os ambientes terrestres, considerando a facilidade de dispersão de muitos agentes tóxicos e as múltiplas possibilidades de interações químicas, de forma que as predições dos efeitos tóxicos na biota aquática são complexas e de difícil mensuração, já que os efeitos biológicos de uma

mistura de produtos são maiores do que a soma dos efeitos individuais (Schio, 2001).

Os efeitos adversos de substâncias nos organismos incluem efeitos letais a curto e longo prazo, e efeitos subletais, como mudança de comportamento (Souza, 2002) e alterações moleculares e fisiológicas (Villa-Lobos et al, 2013); (Krishna, 2000).

Os biomarcadores podem ser de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição permitem detectar a exposição de um organismo a um agente tóxico e/ou a uma situação de estresse fisiológico, com capacidade de prever possíveis efeitos, sendo importantes ferramentas de controle ambiental (Bucker et al, 2006); (Vilella, et al, 2007). Podem expressar a concentração da substância absorvida após a exposição ao agente agressor, a concentração em órgãos e tecidos de armazenamento e a concentração efetiva disponível para agir no sítio de ação (NCR, 1987; Who, 1993; Lauwerys e Perrine, 1993; Leite. 2011).

Os biomarcadores de efeito compreendem alterações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais que podem ser mensuradas em amostras biológicas e que se relacionam com a ação do xenobiótico no organismo (Leite, 2001). Eles estão associados a relação dose-efeito do contaminante (Uiupinar e Okomus, 2002; Krishna, 2000), de forma que a intensidade das respostas desses biomarcadores são proporcionais a quantidade e o tempo de exposição a agentes tóxicos e/ou estressantes.

Os biomarcadores de suscetibilidade estão associados às respostas individuais ou populacionais a agentes tóxicos (Leite, 2011) e/ou estressores, devido a características genéticas individuais ou populacionais, frequentemente associadas a polimorfismos genéticos (Marchan, 2000).

Embora esse tipo de biomarcador seja importante por exemplo, em vigilância na saúde do trabalhador, devido a sua sensibilidade em prever relação causa-efeito de um agente agressor, de forma individualizada, o seu uso em toxicologia ambiental é muito complexo, devido a necessidade de amostras populacionais grandes, o que dificulta a sua investigação em espécies de populações numerosas, como no caso de invertebrados, como os artrópodes.

Este aspecto é relevante na decisão da utilização desses biomarcadores na avaliação de riscos ambientais, considerando que tem sido uma tendência contemporânea, a recomendação dos Comitês de Ética Animal na utilização de um menor número possível de indivíduos em bioensaios, atentos as questões éticas e de conservação dos estoques naturais das espécies.

Dessa forma, biomarcadores de suscetibilidade podem apresentar limitações na toxicologia ambiental, considerando que na ecotoxicologia são fundamentais as projeções de efeitos ambientais dos agentes agressores em uma escala maior, associada a níveis mais complexos de organização biológica, como os níveis populacional e de comunidades.

De fato, os biomarcadores de exposição e de efeito têm sido mais utilizados em toxicologia ambiental, seja em invertebrados (Tunholi et al, 2011; El-Ansari, 2007; Inagaki et al, 2012; Xuan et al, 2001; Reddy e Venugopal, 1990; Vijayael e Balasubramanian, 2006) ou vertebrados (Lumnato et al., 2013), (Wu et al, 2013; El-Ansari, 2007; Malarvizhi et al, 2012; Lavanya et al, 2011; Avilez et al, 2008; Kavitha et al, 2012; Kumari et al, 2011; Papadimitriou e Loumbourdis, 2005; Day et al, 2007; Flament et al, 2012; Tkachenko e Kurhaluk, 2012; Sinclair et al, 2012).

2.2. Bioensaios de toxicidade

Bioensaios são testes comumente utilizados em avaliações ambientais para detectar efeitos agudos e crônicos provenientes da exposição de sistemas vivos às amostras ambientais (Oliveira, 2011).

Nas últimas décadas, agências de proteção ambiental em vários países, particularmente na Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, reconheceram a utilidade da aplicação de testes de toxicidade, como consequência das inúmeras descargas de efluentes industriais e municipais (Sousa, 2002) que tem crescido de forma exponencial em todo o mundo. No Brasil, a utilização de bioensaios para avaliação de efluentes e poluentes sobre a biodiversidade marinha teve início com os trabalhos de Araújo et al (1987); Nascimento (1989); Nipper (1990) e Nipper et al (1990).

Os bioensaios consistem na exposição de um organismo ou parte dele, em contato por exposição ou administração por diversas vias, de um agente externo, físico, químico ou biológico, por tempo determinado, para a avaliação de efeitos sub-letais ou letais.

A escolha do organismo teste depende de vários fatores, entre eles sua facilidade de manutenção em laboratório, relação com a cadeia alimentar do homem (Chasin e Azevedo, 2003); (Oliveira, 2011), assim como adequações e suscetibilidades ecológicas e fisiológicas do organismo ao agente testado.

Os bioensaios podem ser realizados de três formas básicas: testes estáticos, semi-estáticos e dinâmicos (Knie e Lopes, 2004).

Nos testes estáticos, o organismo teste é mantido em concentrações e intensidades determinadas do agente testado, sem reposição durante o tempo de exposição e/ou administração. Os testes semi-estáticos são utilizados para substâncias ou amostras pouco estáveis, que sofrem alterações biológicas e químicas por degradação ou reações de hidrólise e/ou fotólise (Oliveira, 2011), e portanto, faz-se necessário a reposição da substância testada em intervalos pré-determinados. Nos bioensaios em sistemas dinâmicos, os organismos são expostos a um fluxo contínuo do contaminante, e são adequados para avaliação de compostos instáveis, como substâncias voláteis, amostras de baixa solubilidade, avaliação de bioacumulação e biotransformação, e em situações de elevada degradação (Oliveira, 2011).

Em ecotoxicologia marinha, vários organismos são utilizados em bioensaios, sendo mais comuns o uso de algas (Aidar et al, 2002); (Delgado et al, 2013); (Maurat, 2002); moluscos (Nascimento, 2002); (Zaroni, 2002), equinodermos (Prósperi e Araujo, 2002; Mastroti, 2002), peixes (Fernandes, 2002), poliquetos (Rhee et al, 2012) e principalmente crustáceos como branquiópodes (Veiga e Vital, 2002), misidáceos (Badaró-Pedroso et al, 2002), cladóceros (Delgado et al, 2013), copépodes (Nipper, 2002; Lotufo e Abessa, 2002), anfípodes (Melo e Abessa, 2002), tanaidáceos (Zamboni e Costa, 2002), e decápodes como o camarão *Litopenaeus* sp (Nascimento e Evangelista, 2002).

O Toxnet - Toxicology Data Network, que consta de vários bancos indexadores de artigos científicos em toxicologia, inclui o *Hazardous Substances Data Bank* (HSDB), que indica um número em torno de 5.000 produtos tóxicos relacionados em artigos publicados, o que representa um quantitativo ainda pequeno, considerando a quantidade de agentes tóxicos existentes, cujos efeitos sobre a biota ainda é desconhecido.

Além dos produtos tóxicos conhecidos , a biota está sujeita aos chamados "contaminantes emergentes", como os retardantes de chama bromados , disruptores endócrinos , derivados de 2-fenilbenzotriazóis (PBTA), compostos fluorados , produtos de uso pessoal e ésteres de ftalatos (Oliveira, 2011).

Esses e outros contaminantes emergentes possuem efeitos desconhecidos sobre os organismos, e representam um desafio para a ecotoxicologia do século XXI.

2.3. Crustáceos Decápodes: Ambiente e cultivo

A origem dos crustáceos data do Período Cambriano , há mais de 600 milhões de anos, cujo sucesso de sua irradiação evolutiva determinou uma das maiores diversidade e complexidade entre os metazoários recentes. O número de espécies conhecidas é ainda controverso. Brusca e Brusca (2003) estimam em cerca de 67.000, enquanto outros autores citam um número aproximado de 52.000 (Land, 1996; Monod e Laubier, 1996). Entretanto mesmo com a probabilidade destes números serem subestimados (Martin e Davis, 2001), os crustáceos apresentam a maior diversidade biológica entre a biota marinha recente.

A grande diversidade morfofuncional dos crustáceos permitiu a sua irradiação adaptativa para ocupação de diversos nichos e ambientes, sendo encontrados nos ambientes marinhos , dulcícolas, e terrestres, com distribuição cosmopolita, sendo encontrados desde zonas entremarés até profundidades de mais de 11.000 m.

Além de alta valência ecológica e maior riqueza de espécies em relação a outros grupos animais marinhos, apresenta também a maior abundância. A biomassa média dos "krill" (*Euphasia soberba*), do Atlântico Norte é estimada em 500 milhões de toneladas (Brusca e Brusca, 2003).

Muitos decápodes, como camarões, lagostas, caranguejos e siris são utilizados como recursos alimentares em todo o mundo seja (FAO, 2003) através de pesca artesanal, industrial ou ainda provenientes de cultivo, atividade que tem se destacado nas últimas décadas como fonte de produção desses organismos.

Em 2003, os camarões marinhos representaram 64 % (1,2 milhões de toneladas) da produção mundial de crustáceos, seguidos pelos lagostins e camarões de água doce, com 25,9% (514,4 mil toneladas), e os caranguejos, com 8,3 % (164,2 mil toneladas), sendo que o continente asiático contribuiu com 89 % desta produção, seguido pela América do Sul (6 %) e América do Norte e Central (5%) (FAO, 2003).

A expansão do cultivo de crustáceos no mundo tem crescido de forma expressiva nos últimos 20 anos. A produção mundial passou de 758 mil toneladas (US\$ 4,5 bilhões), em 1990, para 1,9 milhões de toneladas (US\$ 11,5 bilhões) em 2001 (FAO, 2003), e em 2008 saltou para 3.64 milhões de toneladas, gerando receita de US\$15 bilhões de dólares (Tacon et al, 2011), mostrando uma tendência a um crescimento expressivo para os próximos anos. De fato, o cultivo de crustáceos assume a primeira posição em receitas geradas, quando comparada ao cultivo de outras espécies aquáticas.

Dentre os 20 maiores países produtores de crustáceos, o Brasil assume a 14ª posição, atrás da China, Índia, Vietnã, Indonésia, Tailândia, Noruega, Filipinas, Egito, Myanmar, Chile, Bangladesh, Estados Unidos e Japão (Tacon et al, 2011).

Segundo Tacon et al (2011), a aquicultura apresentará uma taxa de crescimento médio entre 8% a 10% ao ano até 2025, mas isso dependerá das políticas que os países assumirem junto ao setor produtivo, no sentido de buscar novos nutrientes de alta eficiência na aquicultura, assim como aumentar a produção de alimentos manufaturados e de fertilizantes.

Ao tempo que temos projeções de um crescimento portanto de mais de 100 % nos próximos 10 anos, em sistemas de cultivo super-intensivos, com aumento das cargas orgânicas dos viveiros, cresce a preocupação com os desequilíbrios

ambientais pelos riscos do aumento da insalubridade e da eutrofização dos corpos d'água dos ambientes costeiros.

Na década de 90, mais precisamente entre 1990 a 1996, a aquicultura no mundo e no Brasil experimentou uma retração de aproximadamente de 10 %, devido as doenças virais, como a *White Spot*, e problemas ambientais, como poluição costeira e outras enfermidades (Borghetti et al, 2003). Em parte, esse colapso na aquicultura foi gerado por importação de matrizes, cruzamentos consanguíneos, baixa renovação de reprodutores, infecções de agentes etiológicos diversos, uso indiscriminado de antibióticos, falta de monitoramento e avaliações de riscos, com perda geral do controle ambiental.

Dentre esses problemas, destaca-se os antibióticos, que são utilizados em aquicultura para tratamento de infecções (Weifen et al, 2004), como a oxitetraciclina, sulfonamidas, nitrofuranos, tetraciclina, eritromicina e o cloranfenicol.

A proibição da utilização de antibióticos em cultivos no mundo tem aproximadamente cerca de 10 anos (GLOBAL AQUACULTURE ALLIANCE (2002), sendo relativamente recente, considerando que em alguns países, como no Brasil, esse tipo de atividade iniciou-se na década de 60. No país, o uso desses antibióticos são proibidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 2003, através da Instrução Normativa MAPA nº 09, de 27/06/2003. Entretanto, continuam sendo utilizados de forma clandestina nos cultivos, não somente no Brasil, mas em muitos países cuja fiscalização é ainda incipiente.

Dessa forma, considerando a atual projeção de crescimento da aquicultura para a próxima década, o controle de infecções, comuns em sistemas super-intensivos, representa um dos principais desafios para o setor, pois aumenta-se o risco de utilização clandestina e indiscriminada de

antibióticos, que poderá ser potencializada pela falta de fiscalização dos órgãos competentes.

As áreas costeiras adjacentes aos sistemas de cultivo, e conseqüentemente sua biota, incluindo os crustáceos de interesse alimentar para o homem, representam os ambientes mais expostos aos riscos ambientais provenientes dessa atividade.

A carcinofauna costeira de importância comercial e de subsistência para populações tradicionais, como camarões, lagostas, caranguejos e siris, já tem sido expostas a um número grande de tóxicos, incluindo a sobreexplotação, destruição de habitats (IBAMA, 2011), e exposição a agentes tóxicos, como metais (Xuan et al, 2001), hidrocarbonetos (Vijayael e Balasubramanian, 2006), Fluoreto de Sódio (Reddy e Venugopal, 1990) e antibióticos (Weifen et al, 2004), de forma que o aumento da perda de controle ambiental proveniente do crescimento da aquicultura marinha, pode potencializar riscos futuros para essa espécie e seus estoques naturais.

Amplia-se a gravidade da situação, o fato que esses crustáceos representam no geral, o elo tráfico de ligação entre as comunidades bentônicas e nectônicas (Carqueija et al, 1995; Gouvêa e Queiroz, 1988), nas quais se destacam os peixes, de importância ímpar como recurso alimentar para o homem, e portanto, qualquer alteração na estrutura e dinâmica dessas espécies e de suas populações, poderá representar efeitos indesejáveis sobre a estrutura trófica dessas comunidades.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar as transaminases Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade no caranguejo *Cardisoma guanhumi*.

3.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar viabilidade da utilização de Kit comercial para determinação da concentração de ALT e AST na hemolinfa de *Cardisoma guanhumi*;
- ✓ Avaliar as relações entre ALT e AST com o comprimento e peso úmido total da espécie investigada;
- ✓ Avaliar possíveis alterações nas concentrações hemolinfáticas de ALT e AST por tratamento com cloranfenicol;
- ✓ Verificar possíveis alterações histológicas no hepatopâncreas de *C.guanhumi* tratados com cloranfenicol;
- ✓ Caracterizar o perfil das proteínas na hemolinfa da espécie em questão;
- ✓ Testar a capacidade biomonitora de *C. guanhumi* para o antibiótico investigado.

4. RESULTADOS

Os resultados foram compilados em uma patente e um artigo em fase de tradução para a língua inglesa para submissão ao periódico *Environmental Pollution*, fator de impacto 3,73. Desta forma, o tópico resultados está dividido nessas duas produções no corpo desta tese.

4.1 - 1º produto: Patente com pedido de depósito no INPI

Número: BR 102013 033421-9

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO GERAL

Protocolo: 011130000794
 Data: 26/12/2013 11:49 REBR



BR 10 2013 033421 9

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
	Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal da Bahia
- 1.2 Qualificação: IES
- 1.3 CNPJ/CPF: 15180714/0001-04
- 1.4 Endereço Completo: Rua Basilio da Gama,06/08,Canela, Salvador/Ba
- 1.5 CEP: 40110-040
- 1.6 Telefone: 71 3283-9095
- 1.7 Fax:
- 1.8 E-mail: nit-pi@ufba.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

Protocolo de avaliação de toxicidade em crustáceos decápodes e seus usos

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido N°** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa



DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
	Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: César Roberto Goes Carqueija

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 567.769.505-04

6.4 Endereço Completo: Rua Clovis Bevilacqua, 110, Praia do Flamengo, SSA/BA

6.5 CEP: 41603-120

6.6 Telefone: (71) 9602-3532

6.7 FAX:

6.8 E-mail: cesarcarqueija@superig.com.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	2
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	8
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n ^o , _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	3
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n ^o de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar)	

12. Total de folhas anexadas: 16 **fls.**

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Salvador, 19/12/2013

Local e Data

Assinatura e Carimbo

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Vitor Hugo Moreau da Cunha

6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: 073.159.227-09

6.4 Endereço Completo: Rua Carlos Conceição,89, cs 11, Buraquinho, Lauro de Freitas/BA

6.5 CEP: 42700-000 6.6 Telefone: (71) 8175-5469 6.7 Fax:

6.8 E-Mail: vitorhmc@ufba.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Elisabete Freire Santos da Cunha

6.2 Qualificação: Doutora 6.3 CPF: 034.329.867-85

6.4 Endereço Completo: Rua Roque Jose da Silva, Qd. O, Lote 10B, Miragem,
Lauro de Freitas/BA

6.5 CEP: 42700-000 6.6 Telefone: (71) 8330-1021 6.7 Fax:

6.8 E-Mail: b.freire@terra.com.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: José Roberto Feitosa Silva

6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: 284.665.193-00

6.4 Endereço Completo: Rua Nunes Valente, 1978, apt. 1903, Dionisio Torres, Fortaleza/CE

6.5 CEP: 60125-070 6.6 Telefone: (85)9943-1314 6.7 Fax:

6.8 E-Mail: robertofeitosa@ufc.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Iracema Andrade Nascimento

6.2 Qualificação: Doutora 6.3 CPF: 020.731.375-04

6.4 Endereço Completo: Av. Oceânica, 2352, apt. 303, Ondina, Salvador/Ba

6.5 CEP: 40140-131 6.6 Telefone: (71)3235-9708 6.7 Fax:

6.8 E-Mail: toiracema@gmail.com

"PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES E SEUS USOS"

Campo da Invenção

5 Mais especificamente, a presente invenção se refere a materiais e métodos para avaliar a hepatotoxicidade de crustáceos através de quantificação enzimática na hemolinfa. O protocolo apresenta utilidade biotecnológica no controle de qualidade de crustáceos para consumo humano e no monitoramento ambiental. A invenção encontra-se no setor da biotecnologia de alimentos, bioquímica, fisiopatologia e ecotoxicologia.

10

Fundamentos da Invenção

No cultivo industrial de crustáceos, agentes químicos são normalmente empregados e podem causar toxicidade as espécies cultivadas. A redução na produtividade e as alterações biológicas que podem repercutir em modificações nas propriedades organolépticas do alimento não são desejadas pelos produtores. Além disso, em ambientes aquáticos, a presença de substâncias tóxicas pode gerar desequilíbrio ecológico e danos à saúde humana. Dessa forma, a avaliação da toxicidade em crustáceos além de ser útil no controle da qualidade de crustáceos de interesse na alimentação humana, pode servir de biomonitor para a contaminação ambiental por diversos agentes químicos.

20 Aqui apresentamos a padronização de protocolo para avaliação de toxicidade em crustáceos decápodes baseada na quantificação de biomarcadores característicos de lesão ou disfunções fisiológicas no hepatopâncreas, Alanina Aminotransferase (ALT), também conhecida como Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP), e Aspartato Aminotransferase (AST), também conhecida como Transaminase Glutâmico-Oxaloacética (TGO). Os códigos das duas enzimas, segundo tabela da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) são EC 25 2.6.1.2 e EC 2.6.1.1, respectivamente. A dosagem dessas transaminases em vertebrados tem

sido efetuada com utilização de KITS comerciais específicos. Entretanto, a utilização e validação dos KITS comerciais para dosagem enzimática em crustáceos de interesse comercial, como camarões, siris, caranguejos e lagostas, bem como os usos do protocolo consistem nos objetos da presente invenção.

5

Técnicas relacionadas

A toxicologia estuda o impacto de contaminantes sobre a estrutura e função dos sistemas biológicos. Os bioensaios se constituem em ferramentas úteis na toxicologia ambiental, podendo ser definido como um experimento no qual se determina a atividade biológica de uma substância ou mistura de substâncias através da observação do seu efeito sobre os organismos (KLAASSEN e WALKINS,2005). Tanto no meio ambiente quanto na carcinicultura, a toxicidade pode não ser decorrente da presença de uma única substância,mas de uma matriz complexa formada por substâncias potencialmente tóxicas.De fato, várias substâncias têm sido apontadas como úteis para o estímulo ao crescimento e a resistência a doenças,podendo ser acrescida em situações de cultivo para potencializar a produção (TAKAHASHI e ITAMI (1992); GONZALEZ (2003); GARCIA et al. (2006); GONZALEZ et al. (2006); WANG (2008); DEGUSA (2009); JAMES (2010); ALBA et al (2012). Entretanto, a presença de diferentes substâncias pode dar lugar a uma série de interações que podem provocar efeitos aditivos, sinérgicos ou a potenciação do efeito de uma das substâncias pela presença da outra (KLAASSEN e WALKINS, 2005). Dessa forma, a análise isolada da quantidade e composição das substâncias de uma amostra não fornece informações suficientes a respeito dos efeitos biológicos que a mistura pode provocar. A avaliação da toxicidade através de bioensaios pode proporcionar melhores informações sobre as condições ambientais ou de cultivo (KLAASSEN e WALKINS,2005).

Embora as Dáfnias, bactérias, anelídeos, algas e peixes sejam os organismos mais utilizados em bioensaios de toxicidade (LANDIS, 1999), existe uma ampla variedade de

25

protocolos que utilizam diferentes espécies que vão desde bactérias até aves (LANDIS, 1999). A maioria dos bioensaios se baseia na avaliação da mortalidade que a substância ou a mistura provoca no organismo elegido para a investigação. A morte como critério de valoração da toxicidade apresenta diversos inconvenientes. Em várias situações o registro de óbitos torna-se inviável. Em outros casos, o número de amostras precisa ser consideravelmente elevado. Além disso, é possível que os contaminantes estejam presentes em concentrações não letais, ou em formas de baixa biodisponibilidade tornando improvável o falecimento imediato (KLAASSEN e WALKINS, 2005).

Os biomarcadores consistem em alternativas para avaliar os efeitos tóxicos de forma precoce, sem a necessidade de que alcancem níveis letais. Os biomarcadores são descritos como qualquer parâmetro biológico mensurável e quantificável que serve como índice para a avaliação do estado fisiológico ou patológico. São, portanto, indicadores de curto prazo de efeitos biológicos mais graves que podem ocorrer em longo prazo (CAJARAVILLE, 2000). Dessa forma, os biomarcadores capazes de detectar alterações teciduais ou bioquímicas podem ser utilizados de forma preditiva para antecipar eventos de ordem mais complexa em populações, comunidades ou ecossistemas. Conseqüentemente, permitem a aplicação de medidas corretivas antes da ocorrência de um dano ambiental irreversível.

As transaminases Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) são importantes biomarcadores de hepatotoxicidade e *stress* fisiológico, bem caracterizados em diferentes espécies biológicas. As variações nas concentrações destas enzimas em fluidos biológicos de peixes (MALARVIZHI et al. (2012); LAVANYA et al. (2011); AVILEZ et al. (2008); KAVITHA et al. (2012); KUMARI et al. (2011), anfíbios (PAPADIMITRIOU e LOUMBOURDIS (2005); reptéis (DAY et al.(2007); aves (FLAMENT et al. (2012); TKACHENKO e KURHALUK, (2012); SINCLAIR et al. (2012), e mamíferos (IGWILO et al. (2013); SHOKRZADEH et al. (2012), incluindo o homem (MANCHANDA et ai (2013) têm sido utilizadas com sucesso na avaliação da

toxicidade hepática, tanto induzida por processos patológicos, quanto causada por intoxicações decorrentes de diferentes medicamentos ou agentes químicos variados.

Na presente invenção os autores apresentam um método rápido, barato e viável de determinação da toxicidade em crustáceos através de dosagem hemolinfática de ALT e AST. O método apresenta significativa utilidade no monitoramento ambiental em casos prévios a danos ambientais graves e na tecnologia de produção de crustáceos para a alimentação humana. O controle de qualidade através da detecção da toxicidade hepática pode evitar alterações nas propriedades organolépticas do alimento, perdas na produtividade por modificações nas condições de cultivo, e ainda alterações nos crustáceos com efeitos desconhecidos no consumo humano.

Sumário da invenção

A invenção consiste em descrição de protocolo para extração e preparo do material biológico, quantificação de ALT e AST na hemolinfa de crustáceos, e ao uso do referido protocolo para verificação de toxicidade em crustáceos com fins industriais e ambientais.

Breve descrição das Figuras

A Figura 1 mostra em (A) e (B) histogramas apresentando as concentrações hemolinfáticas expressas em U/L de ALT (A) e AST (B) determinadas em 15 indivíduos da espécie *Cardísoma guanhumí*. Em (C) concentração hemolinfática média de ALT (em preto) e AST (em Branco) calculada a partir dos valores encontrados para os 15 indivíduos. Em (D) concentração hemolinfática média de ALT (em preto) e AST (em Branco) determinadas à 37°C ou 100°C.

A Figura 2 mostra em (A) e (C) concentrações hemolinfáticas de ALT (A) e de AST (B) determinadas em 10 animais controle (curva inferior no painel A e C), tratados com 25 mg/Kg de

Cloranfenicol (curva intermediária no painel A e C) ou tratados com 50 mg/kg de Cloranfenicol (curva superior painel A e C). Em B e D concentração hemolinfática média de ALT (B) e AST (D) para animais controle, tratados com 25mg/kg ou com 50 mg/kg de Cloranfenicol. Um asterisco corresponde a $P < 0.01$, dois a $P < 0.001$ e três a $P < 0.0001$.

5

Descrição detalhada da invenção

A invenção está baseada na descoberta de que transaminases podem ser dosadas na hemolinfa de crustáceos através de kits comerciais disponíveis para dosagens em plasma de vertebrados. Foi possível caracterizar variações individuais nos níveis enzimáticos e estabelecer
10 para uma população de 15 indivíduos um valor médio equivalente à concentração fisiológica (fig. 1). Não foi detectada relação entre tamanho do animal e concentração hemolinfática de ALT ou AST (dado não mostrado). Também não foi detectada relação entre peso do animal e concentração hemolinfática de ALT ou de AST (dado não mostrado). Esses dados ampliam a utilidade da faixa caracterizada como fisiológica.

15 A hepatotoxicidade foi induzida artificialmente para o teste por introdução de 25 mg/kg ou de 50 mg/kg de cloranfenicol através da membrana artropodial do quinto pereiópodo. O Cloranfenicol é um agente reconhecidamente tóxico e que nas condições utilizadas foi capaz de promover alterações histológicas caracterizadas por intensa vacuolização e aumento do diâmetro vacuolar das células secretoras do tecido hepatopancreático dos animais testados
20 (dado não mostrado). A toxidade hepatopancreática foi também associada a alterações no padrão de proteínas encontradas na hemolinfa, evidenciado pela diferença no padrão de bandas encontrado no gel de poliacrilamida (dado não mostrado). Nessas condições, de caracterizada toxicidade hepatopancreática, os níveis enzimáticos de ALT e AST na hemolinfa foram significativamente aumentados. As variações nos níveis enzimáticos hemolinfáticos de ALT e
25 AST na população estudada caracterizam uma faixa utilizável na determinação da toxicidade (Fig. 2).

A presente invenção caracterizar as transaminases ALT e AST em crustáceos decápodes, como biomarcadores de lesão hepatopancreática. De dosagem rápida e barata, apresentam utilidade no monitoramento ambiental e na tecnologia de produção de crustáceos para a alimentação humana, cuja produção tem implementado novas substâncias químicas cujas associações são de efeitos desconhecidos sobre a fisiologia dos crustáceos. A tecnologia proposta pode, portanto, ser utilizada no controle de qualidade durante a produção para consumo humano.

Os dados apresentados nas Figuras 1 e 2 representam o melhor modo da invenção. A padronização nos níveis enzimáticos hemolinfáticos de ALT e AST em *Cardisoma guanhumi* em situação fisiológica e em condição de toxicidade induzida.

Referências Bibliográficas

- Alba, J. A.; Garcia, P. B.; Gonzalez, Y. C. Growth Stimulating Polypeptides for Use in Fish and Crustaceans. Patente de Cuba, 145699, 30/03/2012.
- Avilez IM, Hori TSF, Almeida LC, Hackbarth A, Bastos Neto JC, Bastos VLFC; Moraes G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). Comparative Biochemistry and physiology Part C 148:136-142., 2008.
- Cajaraville, M.P. Science of the Total Environment, 247:295-311, 2000.
- Day RD, Segars AL, Arendt MO, Lee AM, Peden-Adams MM. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). Environ Health Perspect.. 115(10):1421-8, 2007.
- Degussa, E., Produção e uso de metionil metionina como aditivo alimentício para peixes e crustáceos. Patente da Alemanha 0920882-8, 09/10/2009.
- Flament A, Delleur V, Poulipoulis A, Marlier D. Corticosterone, cortisol, triglycerides, aspartate aminotransferase and uric acid plasma concentrations during foie gras production in male mule ducks (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*). Br Poult Sci.;53(4):408-13, 2012.

- 5 Garcia, M.E, Rodriguez , R., Cruz, A., Pimentel, P., Rojas, A., Vaezquez , E., Vazquez, A., Garcia, M., Gonzalez, E., Campa, M., Toledo , P. S., Fames, O., Munoz, C. Method of stimulating growth and resistance to diseases of aquatic organisms. Patente dos Estados Unidos, 2006234905 , 19/10/2006.
- 10 González, J. M. L, Mallon, A. R., González, Y. C., Rojas, A. M., Método para aumentar a produtividade de um cultivo de peixes ou crustáceos e uso de um neuropeptídeo PACAP. Patente de Cuba, 0618913-0, 20/11/2006 .
- 15 González, E. C., Campa, M. V., Pérez, S. T., Farnés, O. C., Munoz, C. Z., Método para estimular o crescimento e a resistência a enfermidades em organismos aquáticos e formulação veterinária para estimular o crescimento e a resistência em peixes e crustáceos. Patente de Cuba, 0307092-1 , 22/01/2003 .
- 20 Igwilo IO, Ogoke TJ, Ogbu DO, Igwilo SN, Obi E, Abdulsalami MS. Effect of soaked *Moringa oleifera* seeds on growth rates and the levels of some biochemical parameters in albino rats. Pak J Biol Sei. Jan 1;16(1):48-50. 2013
- 25 James, B.; Jeremy, B.; Process and System for Growing Crustaceans and Other Fish. Patente dos Estados Unidos, 2011115616 , 16/03/2010.
- 30 Kavitha, C.; Ramesh, M; Kumaran, S.S.; Lakshmi. S.A. Toxicity of Moringa oleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology. 64: 681-687, 2012.
- Kumari, K.; Nitish Ranjan, N; Sinha, R.C.. Multiple biomarker response in the fish, *Labeo rohita* due to hexavalent chromium. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE - IACSIT Press, Singapore., 7: 2011.
- Klaassen, C.O; Walkins J. B. Fundamentos de Toxicologia, McGraw Hill, 2005.
- Landis, W. Yu, M.H. Introduction to Environmental Toxicology , Lewis Publishers, 1999.

- Lavanya, S., Ramesh, M., Kavitha, C. and Malarvizhi, A., Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*, 82, 977-985, 2011
- 5 Malarvizhi, A., C. Kavitha, C.; Saravan, M.; Ramesh, M. Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of King Saud University - Science* 24(2): 179-186, 2012.
- Manchanda A, Cameron C, Robinson G. Beware of paracetamol use in alcohol abusers: a potential cause of acute liver injury. *N Z Med J.* 126(1383):80-4, 2013.
- 10 Papadimitriou E, Loumbourdis NS. Glycogen, proteins, and aminotransferase (GOT, GPT) changes in the frog *Rana ridibunda* exposed to high concentrations of copper. *Bull. Environ Contam Toxicol.*;74(1):120-5., 2005.
- 15 Shokrzadeh M, Shobi S, Attar H, Shayegan S, Payam SS, Ghorbani F. Effect of vitamins A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon. *Pak J Biol Sci.* 15(19):936-941, 2012.
- 20 Sinclair KM, Church ME, Farver TB, Lowenstine LJ, Owens SD, Pau-Murphy J. Effects of meloxicam on hematologic and plasma biochemical analysis variables and results of histologic examination of tissue specimens of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Am J Vet Res.*;73(11):1720-7, 2012.
- 25 Takahashi, Y., Itami, T. Agente preventivo contra doenças infecciosas de crustáceos e agente estimulante, ração e método para a preparação de uma ração. Patente do Japão, 9200332-0, 31/01/1992.
- Tkachenko H, Kurhaluk N. Pollution-induced oxidative stress and biochemical parameter alterations in the blood of white stork nestlings *Ciconia ciconia* from regions with different degrees of contamination in Poland. *J Environ Monit.* 2012 Dec;14(12):3182-91, 2012.
- 30 Wang, L., Peng, S. Combination for promoting carapace growth and recovery of shrimp and crab of crustacean. Patente do Japão, 10129781, 11/05/2008.

"PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES E SEUS USOS"

REIVINDICAÇÕES

1. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES
5 **caracterizado por** avaliar a concentração de substâncias químicas biomarcadoras em material biológico coletado do referido crustáceo;
2. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES de acordo com a reivindicação número 1, **caracterizado** por a referida substância química biomarcadora ser enzimática;
- 10 3. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES de acordo com a reivindicação número 1, **caracterizado por** a referida substância biomarcadora enzimática ser uma transaminase glutâmico-pirúvica (alanina amino transferase -ALT);
- 15 4. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES de acordo com a reivindicação número 1, **caracterizado por** a referida substância biomarcadora enzimática ser uma transaminase glutâmico-oxaloacética (aspartato amino transferase- AST);
- 20 5. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES de acordo com a reivindicação número 1, **caracterizado por** o referido material biológico ser a hemo linfa;
6. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES de acordo com a reivindicação número 1, **caracterizado por** o referido crustáceo

pertencer a Ordem Decapoda que incluem camarões, pitus, lagostins, lagostas, siris e caranguejos.

- 5
7. USO de PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES **caracterizado por** ser aplicado ao controle de qualidade dos referidos crustáceos em carcinicultura ;
 8. USO de PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES **caracterizado por** ser aplicado como biomonitor no controle ambiental e sanitário de ambientes aquáticos.

“PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES

E SEUS USOS”

Figuras

5 Figura 1:

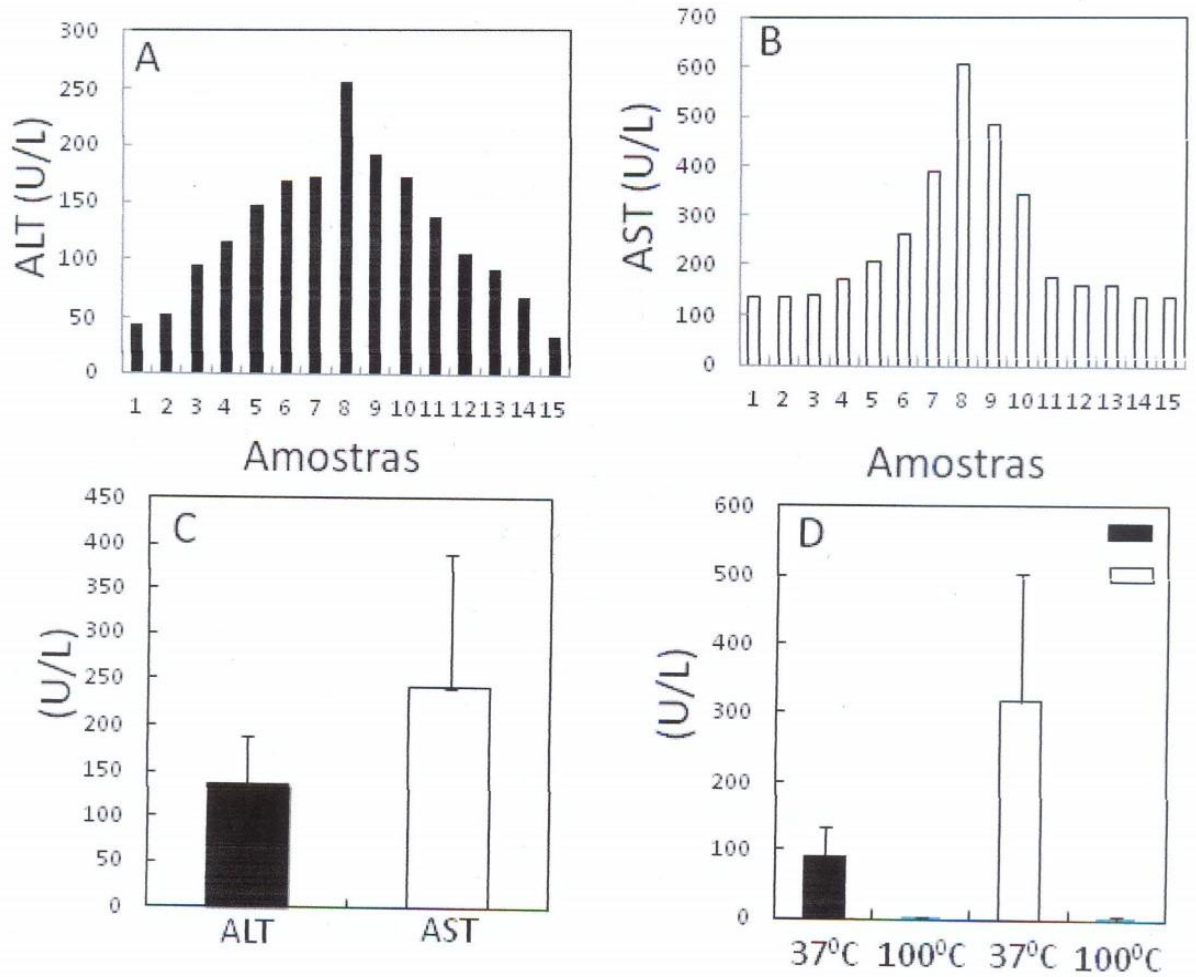
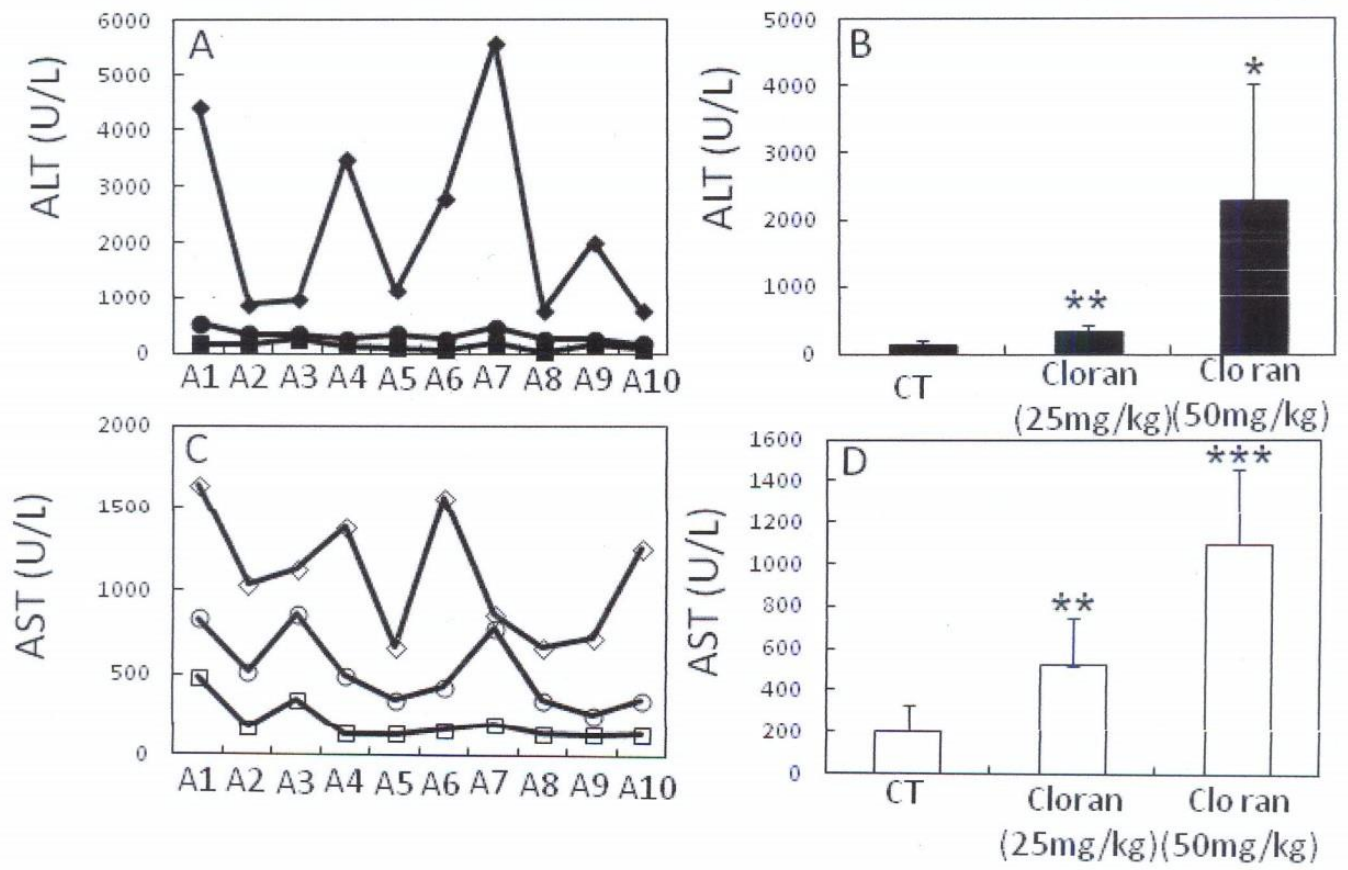


Figura 2:



"PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES

E SEUS USOS"

RESUMO

A presente invenção refere-se à padronização de protocolo para avaliação de toxicidade
5 em crustáceos decápodes baseada na quantificação de biomarcadores característicos de lesão
no hepatopâncreas. A presente invenção se aplica à avaliação de crustáceos de interesse na
alimentação humana e conseqüentemente na tecnologia de alimentos e indústria alimentícia.
Adicionalmente, a presente invenção se aplica à avaliação de crustáceos decápodes de
interesse no monitoramento ambiental.

10 No cultivo industrial de crustáceos, diversos agentes químicos são normalmente
empregados e podem causar toxicidade às espécies cultivadas. A redução na produtividade e as
alterações biológicas que podem repercutir em modificações nas propriedades organolépticas do
alimento não são desejadas pelos produtores. Além disso, em ambientes aquáticos, a presença
de substâncias tóxicas pode gerar desequilíbrio ecológico e danos à saúde humana. Dessa
15 forma, a avaliação da toxicidade em crustáceos pode servir de biomonitor para a contaminação
ambiental por diversos agentes químicos.

Particularmente, a presente invenção configura-se em um protocolo para controle da
qualidade de crustáceos de interesse na alimentação humana e seu uso na carcinicultura, assim
como para o controle da contaminação em ambientes vulneráveis.

20 Mais especificamente, a invenção se refere à extração e ao preparo do material
biológico, à quantificação de biomarcadores em material biológico coletado, e ao uso do referido
protocolo para verificação de toxicidade em crustáceos decápodes com fins industriais e
ambientais.

4.2. - 2º Produto: Artigo em fase de tradução para submissão a periódico

Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) como biomarcadores de toxicidade em *Cardisoma guanhumi*:

Uso no monitoramento ambiental

Cesar Roberto Goes Carqueija^{a,b}, José Roberto Feitosa Silva^c, Iracema Andrade Nascimento^d, Vitor Hugo Moreau da Cunha^{a,b} e Elisabete Freire^{a,*}

^a Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, UFBA, BA, Brasil

^b Faculdade de Tecnologia e Ciências, FTC, Salvador, BA, Brasil

^c Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^d Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, UFBA, BA, Brasil

*e-mails| contato: b.freire@terra.com.br; cesacarqueija@superig.com.br

RESUMO

Os métodos químicos de análise determinam concentrações de contaminantes, mas não os possíveis sinergismos, antagonismos ou adições que podem alterar sensivelmente os efeitos nos seres vivos. Por isso, não se mostram eficientes na determinação da toxicidade em diferentes organismos. A investigação de respostas biológicas consiste em abordagem mais apropriada para avaliações integrativas de efeitos de contaminantes. Embora os testes de toxicidade sejam considerados eficientes instrumentos de avaliação de qualidade de água e sedimento, em geral, envolvem indicadores relacionados ao processo reprodutivo e/ou a quantificação de óbitos em espécies-chave do ecossistema. Dessa forma, as respostas obtidas são insuficientes para ações preventivas. O uso de biomarcadores, considerados indicadores "de aviso" por evidenciarem efeitos primários antes que se manifestem como anomalias ou morte de organismos, são hoje mundialmente utilizados. As transaminases, especialmente Alanina Aminotransferase (ALT) e Arginina Aminotransferase (AST), são enzimas consideradas biomarcadores de hepatotoxicidade e *stress* fisiológico em diferentes espécies biológicas. No presente trabalho, através da utilização do modelo experimental de indução de toxicidade através da administração de Cloranfenicol, em *Cardisoma guanhumi*, foi possível associar alterações histopatológicas características de toxicidade hepatopancreática a alterações nas concentrações hemolinfáticas de ALT e AST. Os dados aqui apresentados indicam que a quantificação hemolinfática de ALT e AST consiste em método rápido e barato de detecção de toxicidade, não associado à morte de espécies biológicas e que pode se configurar em ferramenta útil para detecção precoce de impacto ambiental.

Palavras chave: Alanina Aminotransferase, Arginina Aminotransferase, biomarcadores, toxicidade, *Cardisoma guanhumi*.

1. Introdução

Tanto no meio natural quanto em ambientes de cultivo, a toxicidade pode não ser decorrente da presença de uma única substância, mas de uma matriz complexa formada por substâncias potencialmente tóxicas. A presença de diferentes substâncias pode dar lugar a uma série de interações que podem provocar efeitos aditivos, sinérgicos ou a potenciação do efeito de uma das substâncias pela presença da outra (Klaassen e Walkins, 2005). Dessa forma, a análise isolada da quantidade e composição das substâncias de uma amostra não fornece informações suficientes a respeito dos efeitos biológicos que a mistura pode provocar. A avaliação da toxicidade através de bioensaios pode proporcionar melhores informações sobre as condições ambientais ou de cultivo (Klaassen e Walkins, 2005).

Embora as Dáfnias, bactérias, anelídeos, algas e peixes sejam os organismos mais utilizados em bioensaios de toxicidade (Landis & Yu, 1999), existe uma ampla variedade de protocolos que utilizam diferentes espécies que vão desde bactérias até aves (Landis & Yu, 1999). A maioria dos bioensaios se baseia na avaliação da mortalidade que a substância ou a mistura provoca no organismo elegido para a investigação. A morte como critério de valoração da toxicidade apresenta diversos inconvenientes. Em várias situações o registro de óbitos torna-se inviável. Em outros casos, o número de amostras precisa ser consideravelmente elevado. Além disso, é possível que os contaminantes estejam presentes em concentrações não letais, ou em formas de baixa biodisponibilidade tornando improvável o falecimento imediato (Klaassen e Walkins, 2005), mas causando alterações orgânicas que poderão alterar o funcionamento orgânico, impedindo por exemplo, a reprodução, o que leva a transtornos em níveis de população e comunidades.

A resposta de um organismo a um dado agente tóxico ou a uma situação de estresse, é dependente dentre outros fatores, do tempo de exposição ao agente agressor. Desta forma, as respostas iniciais de um organismo ao agente agressor, será mais comumente detectada em níveis de organização molecular, celular e tecidual. O aumento do tempo de exposição, promove respostas em níveis mais altos de organização biológica, sendo seus efeitos detectados em populações e comunidades. Esta premissa tem gerado esforços em pesquisas de novos biomarcadores bioquímicos, na tentativa de prever e corrigir antecipadamente, efeitos sistêmicos indesejáveis para o meio ambiente. Os biomarcadores são descritos como qualquer parâmetro biológico mensurável e quantificável que serve como índice para a avaliação do estado fisiológico ou patológico. São, portanto, indicadores de curto prazo de efeitos biológicos mais graves que podem ocorrer em longo prazo (Cajaraville, 2000). Dessa forma, os biomarcadores são capazes de detectar alterações teciduais ou bioquímicas e podem ser

utilizados de forma preditiva para antecipar eventos de ordem mais complexa em populações, comunidades ou ecossistemas. Consequentemente, permitem a aplicação de medidas corretivas antes da ocorrência de um dano ambiental irreversível.

Algumas enzimas como Fosfatase Alcalina (ALP), Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Acetilcolinesterase (AChE), Carboxilesterase (CES) (Lumnato et al., 2013), Gama-GT, Glutathione Transferase (Wu et al, 2013), Desidrogenase Láctica (El-Ansari, 2007) e principalmente a Alanina amino transferase e a Aspartato aminotransferase tem sido frequentemente utilizadas como biomarcadores bioquímicos de efeito. A Alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima envolvida na reação de conversão do Glutamato em Piruvato e está presente principalmente em hepatócitos (Al-Habori, et al, 2002), sendo considerada uma enzima biomarcadora de alterações hepáticas (Ohashi, et al, 2013). A Aspartato aminotransferase (AST) está presente também em hepatócitos, entretanto é frequente também em músculos, coração e pulmões (Al-Habori, et al, 2002) sendo considerada menos específica para avaliação hepatotóxica (Freitas et al, 2013). Considera-se a ALT e AST como importantes biomarcadores de hepatotoxicidade e estresse fisiológico em diferentes espécies, sendo investigadas em peixes (Malarvizhi et al (2012); Lavanya et al (2011); Avilez et al (2008); Kavitha et al (2012); Kumari et al (2011), anfíbios (Papadimitriou e Loumbourdis (2005); reptéis (Day et al (2007); aves (Flament et al (2012); Tkachenko e Kurhaluk, (2012), Sinclair et al (2012), e mamíferos (Igwilo et al (2013); Shokrzadeh et al. (2012), incluindo o homem (Manchanda et al, 2013).

Devido à representatividade biológica, além de interesse comercial, os crustáceos, que incluem cerca de 52.000 espécies (Martin e Davis, 2001) são considerados grupos-chave nos ambientes aquáticos (Karakassis & Eleftheriou, 1997; Drake et al, 1997). Apresentam órgãos análogos ao fígado e pâncreas dos vertebrados, denominados de hepatopâncreas (Brusca e Brusca, 2003). O hepatopâncreas está associado a importantes processos metabólicos, como absorção, produção de enzimas digestivas, reserva de glicogênio, proteínas, lipídeos e oligoelementos, como cálcio e manganésio (Bond-buckup, et al, 1991). Está relacionado também ao crescimento (ecdise) e reprodução (Kameswaramma et al., 1990; Ramadevi et al., 1990). Outras atividades fisiológicas como osmorregulação (Storch & Lehner T-Moritz, 1980; Hryniewieck-Szyfter & Babula, 1997; Cuartas, 2003), excreção (Al-Mohanna & Nott, 1989) e detoxificação de poluentes (Gibson & Baker, 1979; Vogt, 1994) também já foram reportadas para o hepatopâncreas.

Dentre o Subfilo Crustacea, destaca-se a Ordem Decapoda, que inclui os camarões, pitús, lagostas, lagostins, siris e caranguejos, grupos de interesse comercial, caracterizados pela presença de 5 pares de pereiópodos, com cerca de 17.000 espécies conhecidas, distribuídas em ambientes marinhos (89%), dulcícolas (10%) e terrestres (1%) (Bowman & Abele, 1982). Este grupo apresenta uma ecofisiologia particular devido ao processo de crescimento por ecdise, que envolve uma complexa regulação neuro-hormonal, o que torna esses organismos sensíveis as alterações abióticas dos ecossistemas, tornando-os excelentes modelos biológicos de avaliação de estresse ambiental e/ou de toxicidade (Sastre, 1999; Silva et al, 2000).

Na costa brasileira, destaca-se neste cenário, o *Cardisoma gunanhum*, conhecido popularmente como Goiamum ou Gaiamum, uma espécie semi-terrestre, que distribui-se desde a Flórida (EUA) até Santa Catarina (Brasil), que ocorre preferencialmente em áreas altas dos manguezais, incluindo os apicuns e a restinga (IBAMA, 2011). Estes habitats tem sido alvo de especulação imobiliária e aterros ao longo da costa brasileira, que associada a sobreexploração e a exposição do recurso a agentes tóxicos, coloca a espécie sob forte tensão, sendo classificada em termos de conservação, como espécie “quase ameaçada” (Machado, et al 2005).

Outro relevante tensor sobre a espécie é a carcinicultura, seja pela ocupação física desses empreendimentos, como pelos resíduos gerados pela atividade de cultivo. Dentre estes resíduos, destacam-se os antibióticos, como a oxitetraciclina, sulfonamidas, nitrofuranos e o cloranfenicol, que embora proibidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa MAPA nº 09, de 27/06/2003, continuam sendo utilizados de forma clandestina por estes cultivos. A proibição da utilização de antibióticos em cultivos no mundo tem aproximadamente cerca de 10 anos (GLOBAL AQUACULTURE ALLIANCE, 2002), sendo relativamente recente, considerando que em alguns países, como no Brasil, esse tipo de atividade iniciou-se na década de 60. Esses antibióticos são utilizados em aquicultura para tratamento de infecções (Weifen et al, 2004), sendo o cloranfenicol mais utilizado em infecções por *Samonellas* (D’Aoust, 1994).

O cloranfenicol é um antibiótico inibidor da síntese protéica bacteriana, mais especificamente da subunidade 50 S do rRNA e tem sido suprimido como droga de tratamento em seres humanos, devido aos efeitos principalmente sobre a medula óssea, levando a desenvolvimento de leucemias e anemias graves, além de efeitos neurotóxicos, genotóxicos, hepatóxicos e orogastrentéricos (Feder et al, 1981). Embora seus efeitos sobre a espécie

humana sejam bem investigados, sua ação sobre a biota aquática ainda é insuficientemente conhecida (Weifen et al, 2004). O *Cardisoma guanhumi* é uma espécie adequada para avaliações de riscos ambientais do uso de cloranfenicol, por ser uma espécie de transição entre o ambiente marinho e terrestre, ampliando a compreensão da magnificação trófica do agente contaminante nos dois ambientes; por possuir alta plasticidade ecológica por habitar ecossistema dependente de perturbações cíclicas, o que lhe confere potencial capacidade biomonitora a médio e longo prazo; por habitar áreas de aporte de resíduos provenientes de atividades de carcinicultura, o que permite projeções reais dos efeitos do agente tóxico; por ter usual e potencial utilização como recurso alimentar de subsistência e de interesse comercial, o que permite não apenas mensurar os danos ambientais, mas também socioeconômicos e; por possuir grande capacidade de adaptação ao confinamento.

Nesse trabalho foi realizada a caracterização das variações das concentrações hemolinfática de ALT e AST em *Cardisoma guaiamum* induzidas por tratamento com Cloranfenicol, com a hipótese de que também ocorra alteração na glândula digestiva com efeito nos níveis dessas transaminases. Os dados evidenciam que as alterações histopatológicas no hepatopâncreas dos animais tratados são repercutidas em variações nas concentrações hemolinfáticas de ALT e AST. Dessa forma a quantificação de ALT e AST pode funcionar como biomarcador de toxicidade podendo apresentar significativa utilidade na detecção precoce de danos ambientais, podendo funcionar como importante ferramenta no monitoramento ambiental.

2. Materiais e métodos

Animais

Os animais da espécie *Cardisoma guanhumi* foram coletados no manguezal de Barra do Jacuípe, Bahia, Brasil, dentro de uma Unidade de Conservação, denominada APA – Área de Preservação Ambiental, situada aos 12°42'44" S e 38°07'59" W (Figura 1), com auxílio de armadilha de tubo de *polyvinyl chloride* (PVC), com 8 cm de diâmetro, utilizando como iscas, pedaços do fruto de *Artocarpus heterophyllus*, conhecido popularmente no Brasil como jaca. Para os experimentos foram selecionados 10 machos adultos de classes de comprimento próximas, em estágio de intermuda, através da identificação do estágio cerdal do terceiro maxilípode de cada indivíduo, a fim de evitar interferências hormonais sexo-específicas e relacionadas a diferentes estágios de crescimento. Os indivíduos foram aclimatados por 15 dias em caixas de *polyvinyl chloride* (PVC) de 100 L, em ambiente com controle de temperatura

(25 °C), umidade do ar de 55-65% e tempo de exaustão de dez trocas de ar da sala/hora, sendo oferecidos água potável e folhas de *Rhizophora mangle*, alimento natural de *C. guanhumi*.

Após o período de aclimação, os animais foram mensurados com auxílio de paquímetro digital com precisão de 0,01 mm, sendo medidos o comprimento (CT) e largura (LT) total da carapaça. O peso úmido total (PT) foi obtido com balança semianalítica com precisão de 0,1 g. Os indivíduos inicialmente receberam 200 mL/100 g de peso úmido de solução fisiológica e após 48 h, 25 mg/Kg de solução de Cloranfenicol (Tratamento 1). A diluição do antibiótico foi realizada para que o volume injetado não ultrapassasse 200 mL/ 100g. A administração do tratamento foi realizada através da membrana artropodial do quinto pereiópode, com auxílio de seringa de insulina BD Ultra-Fine™, 6 mm x 0,25 mm. Os animais foram avaliados antes e 48 horas após o tratamento com 25 mg/Kg, sendo pesados e mensurados quanto ao comprimento e largura total da carapaça; em seguida foram coletados 100 µL de hemolinfa para realização das dosagens de ALT e AST. Não há estudos experimentais relatando o efeito de Cloranfenicol em crustáceos, portanto a concentração da droga foi definida como a dosagem tóxica para ratos. Os animais foram submetidos à eutanásia após o período de avaliação e o hepatopâncreas submetido à análise histopatológica.

Dosagem de ALT e AST

Foi realizado um *screening* para a padronização e ajustes nas dosagens de ALT e AST em 5 indivíduos de *Cardisoma guanhumi* apresentando o mesmo sexo, classe de comprimento peso, e fase de crescimento que os 10 organismos utilizados no teste. As amostras de hemolinfa foram coletadas por punção através da membrana artropodial do quinto pereiópode, com auxílio de seringa de insulina BD Ultra-Fine™, sendo a amostra prontamente diluída em solução de citrato de sódio a 10 %. As dosagens bioquímicas hemolinfáticas de ALT e AST foram realizadas com diluição manual e utilizando-se kits comerciais das marcas LABTEST® e BIOCLIN®, respectivamente. Foi utilizado método de espectrofotometria (colorimétrico) sendo a absorbância medida com auxílio do aparelho Celm SB-190 e com atividade enzimática a 37° C. Para controle negativo as atividades enzimáticas foram determinadas a 100° C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE):

A dosagem de proteínas totais da hemolinfa dos animais dos diferentes grupos foi realizada pelo método de Bradford para normalização do volume a ser submetido a eletroforese. Amostras de hemolinfa coletadas de animais controle e tratados foram diluídas em tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (solução de acrilamida 30% (10 mL), tampão Tris-HCl 0,9 M pH 8,8 (13 mL), TEMED (Merck) 1%(10 µL), água destilada (2 mL), SDS (Sigma) 2% (1,5 mL) e persulfato de amônio (Sigma) 1% (200 µL). Após agitação suave, a mistura foi distribuída em placas de vidro medindo 15 x 16 cm. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração, contendo solução de acrilamida (1,9 mL), tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (8 mL), SDS (Sigma) 10% (0,1 mL), TEMED (Merck) 1% (10 µL) e persulfato de amônio (Sigma) 1% (200 µL). Essa mistura foi depositada sobre o gel de separação e posteriormente colocado um pente para formação das canaletas até a polimerização do gel. As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 2 M, pH 6,8 (100 µL), contendo 120 µL de azul de bromofenol 0,05% em água destilada, 1,0 mL de glicerol 60% e 0,6 mL de SDS (Sigma) 10%. A seguir foram colocados em banho-maria em ebulição por 10 minutos. O tampão dos eletrodos utilizado foi tris-hidroximetilaminometano 0,025 M (Sigma), glicina 0,192 M (Sigma) e 0,1% de SDS (Sigma), pH 8,4. As amostras foram aplicadas nas canaletas e os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 150V. Terminada a corrida, os géis foram corados com Coomassie blue (Coomassie blue 2,5g, Metanol 450mL, Metanol 450mL Ácido acético glacial 100mL e Água Milli-Q 450mL) por 30 minutos a temperatura ambiente seguido de tratamento com o descorante (Metanol 450mL,Ácido acético glacial 100mL e Água Milli-Q 450mL).

Análise Histológica

Após o segundo tratamento, os animais foram sacrificados, os hepatopâncreas dissecados e fixados em formol tamponado a 10 % por 24 h. O material biológico foi submetido a protocolo para processamento histológico que consistiu em desidratação em série de álcool 70°, 80°, 95° e absoluto, por 50 min em cada concentração. Subsequentemente incorporação do xilol por imersão em solução 1:1 de álcool absoluto e xilol P.A, por 50 min e depois em Xilol P.A (50 min). A amostra foi transferida para parafina líquida a 56 °C (2 x) e incluída à mesma temperatura. Após o resfriamento, foram efetuados cortes de 5 µm de espessura em um micrótomo Leica®, modelo RM-2235. As lâminas contendo as secções foram montadas em Entellan®. Os cortes foram corados com Tricômico de Gomori (Tolosa et al, 2003), Azan-

Heidehnhain-Mallory (Tolosa et al, 2003), Azul de Alcian/PAS (Junqueira e Junqueira, 1983), Azul de Bromofenol (Pearse, 1960) e Hematoxilina-Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983), sendo escolhido os dois últimos corantes por permitir melhor visualização das alterações histopatológicas.

O material foi analisado em microscópio de luz da marca Leica[®] DM - 1000, em aumento 10 x 15, observando-se as células que apresentavam alterações morfológicas, sendo efetuada a contagem do número de vacúolos por campo e a mensuração do diâmetro maior dos vacúolos grandes com auxílio do software LAS 4.0 da Leica[®]. As fotomicrografias foram obtidas com uma câmera Leica[®] DFC – 295, acoplada ao microscópio.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram representados como média, desvio padrão e coeficiente de variação (%) e comparados com o controle (0%) por ANOVA e Teste de Tukey. Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico Primer 6.

3. Resultados

Determinação dos níveis hemolinfáticos fisiológicos de ALT e AST em *Cardisoma guanhumi*

Amostras de hemolinfa coletadas de 10 animais, foram submetidas à análise colorimétrica utilizando-se Kits comerciais para determinação das concentrações hemolinfáticas de ALT e AST. As concentrações de ALT expressas em U/L, variaram entre 136 U/L a 484 U/L para os indivíduos testados (Tabela 1 e Figura 2A). As concentrações de AST (U/L) variaram entre 68 U/L a 256 U/L (Tabela 1 e Figura 2A). Os valores médios obtidos para as concentrações hemolinfáticas de ALT e AST foram respectivamente $\bar{X} = 204,9$ U/L; $s^2 = 117,10$ U/L; C.V = 57,15 % e $\bar{X} = 139,4$ U/L; $s^2 = 65,84$ U/L; C.V = 47,24 % (Tabela 1, Figura 2A). As concentrações hemolinfáticas de ALT e AST foram também determinadas após aquecimento da hemolinfa a 100°C, tratamento que permitiu a desnaturação proteica e ausência de proteína detectável pela técnica utilizada (figura 2B).

Os animais analisados apresentaram também variações quanto ao comprimento entre 37,3 mm a 49,28 mm ($\bar{X} = 43,62$ mm; $s^2 = 3,56$ mm; C.V = 8,17 %), a largura entre 43,78 mm a 58,99 mm ($\bar{X} = 52,02$ mm; $s^2 = 4,60$ mm; C.V = 8,83 %) e ao peso úmido total entre 43,24 g a 105,71 g ($\bar{X} = 72,08$ g; $s^2 = 18,45$ g; C.V = 25,60%) (Tabela 1).

Para investigar se as variações nas concentrações hemolinfáticas de ALT e AST encontravam-se associadas às variações morfométricas dos animais foram realizadas regressões lineares. Não foram detectadas correlações significativas entre o comprimento total dos indivíduos, peso úmido total e os níveis de ALT e AST (Figura 3). Os coeficientes de determinação encontrados para relação entre comprimento total, peso úmido e concentração de ALT foram respectivamente, $R^2 = 0,038$ e $R^2 = 0,041$, assim como para o comprimento total, peso úmido e concentração de AST foram: $R^2 = 0,074$ e $R^2 = 0,0411$ (Figura 3). Os dados evidenciam que o aumento do tamanho e do peso, e conseqüentemente do crescimento, não promove elevação dos níveis hemolinfáticos das transaminases ALT e AST em *Cardisoma guanhumi*.

Embora os valores médios encontrados para as concentrações hemolinfáticas de ALT e AST tenham sido cerca de 10 vezes mais elevados que os encontrados para humanos, gatos e cães e cerca de 4 vezes mais elevados que os encontrados para Tilápias (Almeida et al, 2002), as variações detectadas em *C. guanhumi*, em condições fisiológicas, são também encontradas nas diferentes espécies e conferem um coeficiente de variação da ordem de 30%.

Indução da toxicidade hepatopancreática por Cloranfenicol

Para avaliar a utilidade da determinação das concentrações hemolinfáticas de ALT e AST como marcador de toxicidade em *Cardisoma guanhumi* utilizou-se o tratamento com Cloranfenicol. O tratamento foi administrado através da membrana artropodial em concentrações de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg. Os animais foram submetidos a análises morfométricas e a coleta da hemolinfa realizadas 48 horas após a administração do antibiótico. Após esse período, o hepatopâncreas foi retirado e processado para avaliação histopatológica. Nas condições experimentais descritas não ocorreram mortes, modificações comportamentais detectáveis e nem variações significativas de peso, comprimento e largura total da carapaça (dado não mostrado), não sendo observado também processo de ecdise. Entretanto, as células secretoras apareceram na secção dos túbulos do hepatopâncreas de animais tratados com 50 mg/Kg de Cloranfenicol em maior número, com vacúolos secretores de diâmetro aumentado e alguns vacúolos contendo secreções acidófilas (Figuras 4C e 4D). As médias diferiram significativamente ($p < 0,05$) para o controle e tratado 2, em relação ao número de vacúolos por campo ($\bar{X} = 10$ e $\bar{X} = 15$) (Figura 4E) e ao aumento do diâmetro vacuolar ($\bar{X} = 47,37 \mu\text{m}$ e $\bar{X} = 73,91 \mu\text{m}$) (Figura 4F), respectivamente. O aumento da vacuolização tem sido reportado como uma resposta histopatológica degenerativa de diversos tecidos em vários organismos

como mamíferos (Zlotowski et al, 2005), incluindo o homem (Singh et al, 2013); peixes (Thakur et al, 2011); (Albinati et al, 2009), molusco gastrópode (Cengiz et al, 2005), lagostim (Desouky et al, 2013) e caranguejo de água doce (Schuwerack e Lewis, 2003).

Alterações metabólicas nas células, consideradas degenerações, podem encontrar-se associadas ao acúmulo intracelular de quantidades anormais de substâncias. As substâncias acumuladas podem consistir em componentes celulares normais com síntese aumentada, produtos de síntese anormal do metabolismo ou produtos de biotransformação de substâncias exógenas. Substâncias exógenas são depositadas quando as células não possuem enzimas necessárias para degradá-la. A deposição de Cloranfenicol ou dos seus metabólitos é possível nas células do hepatopâncreas dos animais tratados. Entretanto, embora não se tenha o conhecimento sobre a metabolização do Cloranfenicol por crustáceos, não está descartada a possibilidade do aumento da síntese de proteínas envolvidas em processos de detoxicação, e seu acúmulo nos vacúolos das células hepatopancreáticas.

Contudo os resultados apresentados da Figura 4 mostram que na concentração e na forma de administração testada, o Cloranfenicol foi capaz de induzir alterações histopatológicas característica de processos degenerativos nos animais tratados.

Nos animais tratados com Cloranfenicol, nos quais as alterações histopatológicas foram evidenciadas, detectou-se elevação significativa nos níveis hemolinfáticos de ALT e AST . Entre os indivíduos tratados com 25 mg/Kg de Cloranfenicol o aumento nos níveis de ALT foi de cerca de 4X e nos níveis de AST de cerca de 3X. Entre os animais tratados com 50 mg/Kg o aumento foi de cerca de 10X e de 5X para ALT e AST, respectivamente. Os dados apresentados na Figura 5 sugerem a utilidade das dosagens hemolinfáticas de ALT e AST como possível biomarcadores de toxicidade em *Cardisoma guanhumi*.

Alteração no perfil de proteínas hemolinfáticas

Para investigar se as alterações hepatopancreáticas promoviam alterações detectáveis no perfil de proteínas hemolinfáticas utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida da hemolinfa de animais controle e tratados com 50 mg/Kg. A determinação da concentração proteica por Bradford foi realizada previamente para a normatização da concentração de proteína aplicada em cada poço. Observou-se a presença de 4 bandas majoritárias na hemolinfa dos animais controle, equivalentes a 120, 85, 50 e 35 KDa. Na hemolinfa dos animais tratados com Cloranfenicol as bandas de 120, 85 e 50 KDa não foram observadas. Entretanto uma banda de 35 KDa apareceu mais intensificada (Figura 6A). Além disso outra banda de

25KDa foi observada apenas nos animais tratados. Para melhor visualização das bandas foi aplicado ao gel a amostra de hemolinfa diluída 10x, 3x e 1x (Figura 5B e 5C). A diluição da hemolinfa dos animais controle em apenas 1x inviabiliza a visualização das bandas equivalentes a 85 e 50 KDa. A diluição da hemolinfa dos animais tratados e controle em 10x permite a melhor visualização da banda de 35KDa como correspondente a apenas uma cadeia polipeptídica.

Os dados apresentados na figura 5 evidenciam que a toxicidade induzida por Cloranfenicol promoveu alterações significativas no perfil das globulinas hemolinfáticas. Além disso, evidencia o aumento da concentração de uma cadeia polipeptídica de 35KDa e o aparecimento de uma banda de 25KDa.

4. Discussão

Embora em humanos os níveis fisiológicos de ALT e AST variem entre os indivíduos em uma faixa bem próxima, 5-34 U/L e 6-37 U/L, respectivamente. Em diferentes espécies biológicas os níveis de AST apresentam-se em faixa significativamente maior que os níveis de ALT. Reddy e Venugopal (1990) em estudo de toxicidade com fluorito de sódio (NaF) no caranguejo *Barythelphusa guerini*, encontrou valores 2 vezes maiores para os níveis AST. Vijayavel e Balasubramanian (2006) também relatam níveis fisiológicos mais elevados para AST quando comparados aos níveis de ALT em outra espécie de caranguejo *Scylla serrata*. Em ratos estudo relata níveis 2 vezes maiores para AST (Castello-Branco et al, 2011). Em tilápias os níveis de AST aparecem 3 vezes maiores que os de ALT (Alves, 2003). Em codornas foi relatado níveis de AST 10 vezes maiores que ALT (Stanquevis et al, 2013). Essas diferenças podem ser justificadas pela menor especificidade de AST, sendo expressa em músculos, coração e outros órgãos (Al-Habori, et al, 2002).

Embora os valores médios encontrados para as concentrações hemolinfáticas de ALT e AST tenham sido cerca de 10 vezes mais elevados que os encontrados para humanos, gatos e cães (González et al, 2001) e cerca de 4 vezes mais elevados que os encontrados para Tilápias (Almeida et al, 2002), as variações detectadas em *Cardisoma guanhumi*, em condições fisiológicas, são também encontradas nas diferentes espécies, conferem um coeficiente de variação da ordem de 30% e não oscilam em função de tamanho e peso. Este é um aspecto importante na perspectiva de utilização desses biomarcadores para a espécie em questão, refletindo apenas a necessidade do estabelecimento de uma faixa aceitável para as condições fisiológicas.

O tratamento com cloranfenicol testado foi efetivo para induzir toxicidade uma vez que promoveu degeneração tecidual evidenciada pela menor preservação celular e vacuolização tecidual. O aumento da vacuolização tem sido reportado como uma resposta histopatológica degenerativa de diversos tecidos em vários organismos como mamíferos (Zlotowski et al, 2005), incluindo o homem (Singh et al, 2013); peixes (Tharur et al, 2013); (Albinati et al, 2009), molusco gastrópode (Cengiz et al, 2005), lagostim (Desouky et al, 2013) e caranguejo de água doce (Schuwerack e Lewis, 2003). Alterações metabólicas nas células, consideradas degenerações, podem encontrar-se associadas ao acúmulo intracelular de quantidades anormais de substâncias. As substâncias acumuladas podem consistir em componentes celulares normais com síntese aumentada, produtos de síntese anormal do metabolismo ou produtos de biotransformação de substâncias exógenas, que são depositadas quando as células não possuem enzimas necessárias para degradá-la (Motta, 2003). É possível que a secreção contida nos vacúolos aumentados, observados nos animais tratados possa ser decorrente da deposição de Cloranfenicol ou dos seus metabólitos. Entretanto, embora não se tenha o conhecimento sobre a metabolização do Cloranfenicol por crustáceos a outra possibilidade é que haja o aumento da síntese de proteínas envolvidas em processos de detoxicação.

A citotoxicidade do Cloranfenicol, dos seus metabólitos conhecidos: cloranfenicol Nitroso-Cloranfenicol (NO-CAP), cloranfenicol-glucoronida (CAP-G) e Cloranfenicol-Base (NAPD) em humanos (Gross et al , 1982); (Lafarge-Frayssinet et al, 1994) e de outros possíveis não identificados podem justificar as alterações nos níveis enzimáticos da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) em *C. guanhumi*, como consequência da ação citotóxica do cloranfenicol sobre os hepatócitos dos indivíduos analisados. Entre os animais tratados com 50 mg/Kg o aumento de cerca de 10X e de 5X para ALT e AST respectivamente são compatíveis com os aumentos detectados em humanos em quadros patológicos como por exemplo a hepatite medicamentosa e a cirrose (Motta, 2003).

A visualização do perfil de proteínas hemolinfáticas por eletroforese não permitiu a visualização do aumento de bandas compatíveis com o peso molecular das transaminases. A AST em diferentes espécies tem peso molecular de cerca de 40 KDa (Hayashi et al, 1990) e a ALT em bois (Ruscak et al, 1982), porcos (Saier e Jenkins, 1967), ratos (Gatehouse et al, 1982) e *Drosophila* (Schneider & Chen, 1981) possui peso molecular entre 70 a 125 KDa. Entretanto, a revelação do gel por Comassie não permitiria visualização de proteínas não majoritárias. Por outro lado, a eletroforese de poliacrilamida da hemolinfa dos indivíduos tratados com a dose de 50 mg/Kg revelou o aumento significativo de uma proteína majoritária de 30 KDa. Além disso o tratamento com Cloranfenicol promove o surgimento de uma banda de 25 KDa.

Os dados tornam interessante o desenvolvimento de estudos posteriores para a identificação das proteínas da hemolinfa de *Cardisoma guanhumi*.

Os dados apresentados nesse trabalho demonstraram ainda os riscos potenciais da utilização de antibiótico como o cloranfenicol em aquicultura. Nos últimos 50 anos, o cultivo de espécies aquáticas em condições controladas, com o objetivo de aumentar a produção tem crescido em importância e atualmente fornece quase 50% da oferta de frutos do mar do mundo. Em parte, essa expansão foi possível devido ao uso de antibióticos, antifúngicos e outros medicamentos veterinários para controlar doenças e saúde dos organismos cultivados (Morris et al, 2012); (Pruden et al, 2013). Entre os antibióticos utilizados destacam-se: ampicilina, sulfametazona, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol (Zhang et al 2013).

No Brasil, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo Humano (PAMVet), criado pela ANVISA em 2003, em consonância com a Comunidade Européia estabeleceu limite zero para o Cloranfenicol proveniente de organismos cultivados. Embora o posicionamento da legislação seja compatível com os riscos ambientais e para a saúde humana. A falta de fiscalização ainda é incipiente nos cultivos, especialmente nas carcinoculturas, tornando vulnerável a agentes tóxicos, a biota que habita os manguezais e ecossistemas adjacentes, como o *Cardisoma guanhumi*.

Dessa forma, o conjunto de dados apresentados nesse trabalho demonstra a presença de AST e ALT na hemolinfa de *Cardisoma guanhumi*; caracterizam a possibilidade da realização das dosagem utilizando-se kits comerciais, caracterizam a toxicidade induzida por Cloranfenicol, mostram a relação da detecção de hepatotoxicidade por técnicas histopatológicas e bioquímicas e sugerem a utilidade prática das dosagens hemolinfáticas de ALT e AST como possíveis biomarcadores de toxicidade em *Cardisoma guanhumi* com utilidade no monitoramento ambiental.

5. Referências Bibliográficas

1. Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati RCB, Carvalho JV, De Lira AD, Santos GB, Vidal LVO. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq Bras Med Vet Zootec (2009) 61(3): 621-627.
2. AL-Habori, M.; AL-Aghbari, A.; AL-Mamary, M.; Baker, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. J Ethnopharmacol, Taipei, Taiwan, 83 (2002) 209-217.
3. Almeida JA, Diniz YS, Marques SF, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli EL. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environ Int. (2002) 27(8):673-9.
4. AL-Mohanna, S.Y. Nott, J.A. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. Marine Biology 101 (1989) 503-544.
5. Alves, S. R. C. Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.
6. Avilez IM, Hori TSF, Almeida LC, Hackbarth A, Bastos Neto JC, Bastos VLFC; Moraes G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 148 (2008): 136-142.,
7. Bond-Buckup, G.; Fontoura, N. F.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C.O. O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 1991, 71p.
8. Bowman, T.E.; Abele., L.G. Classification of the recent Crustacea. 1–27, In: Abele, L.G. (ed.), Systematics, the Fossil Record, and Biogeography, Volume 1, In: Bliss, D.E. (ed.), The Biology of Crustacea. Academic Press, New York, 1982.
9. Brusca, R.C; G. J. Brusca. 2003. Invertebrates. 2ª. ed. Sinauer, Sunderland, 966 p.
10. Cajaraville, M.P. Science of the Total Environment, 247 (2002): 95-311.
11. Castello-Branco, A,C, Formiga, M.F; Diniz, M; Almeida, R.N; Santos, H.B; Oliveira, K.M.; Ramalho, J.A; Dantas, J.G. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. R bras ci Saúde 15(2) (2011): 209-214.
12. Cengiz EI, Yildirim MZ, Otludil B, Unlü E. Histopathological effects of Thiodan on the freshwater snail, *Galba truncatula* (Gastropoda, pulmonata). J Appl. Toxicol. 25(6) (2005) 464-9.

13. Cuartas, E.I., Díaz, A.C.; Petriella, A.M. Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeoidea) por efecto de lasalinidad. *Biociencias (Brasil)*. 11(2003), 53-59.
14. D'Aoust J, Y Samonella and the international food trade. *Int. J. Food. Microbiol.* 24 (1994): 11-31.
15. Day RD, Segars AL, Arendt MD, Lee AM, Peden-Adams MM. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environ Health Perspect.* 115(10) (2007):1421-8.
16. Desouky MM, Abdel-Gawad H, Hegazi B. Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Food ChemToxicol.* 52 (2013) 42-52.
17. Drake BJ, Gonzalez-Meler MA, Long SP. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂ ? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48 (1997) 609–63.
18. El-Ansary AK, Al Daihan SK. Effect of sublethal concentration of *Solanum nigrum* on transaminases and lactate dehydrogenase of *Biomphalaria arabica*, in Saudi Arabia. *J Egypt. Soc. Parasitol.* 37(1) (2007) 39-50.
19. Feder HM Jr, Osier C, Maderazo EG. Chloramphenicol: A review of its use in clinical practice. *Rev Infect Dis.* 3(3) (1981) 479-91.
20. Flament, A.; Soubbotina, A.; Mainil, J.; Marlier, D. Prevalence of *Salmonella serotypes* in male mule ducks in Belgium. *Veterinary record, London.* 170 (12) (2012) 311.
21. Freitas, R.B.; Rovani, B.T.; Boligon, A.A.; de Brum, T.F.; Piana, M.; da Silva Jesus, R.; Veloso, C.F.; Kober, H.; Moresco, R.N.; Costa Araldi, I.C.; Bauermann, L.; Athayde, M.L. Hepatotoxicity Evaluation of Aqueous Extract from *Scutia buxifolia*. *Molecules* 18 (7) (2013) 7570-7583.
22. Gatehouse, P. W., Hopper, P. S., Schatz, L., and Segal, H. L. The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.) *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2319-24.
23. Gibson, R.; Barker, P.L. The decapod hepatopancreas. *Oceanografic Marine Biology Annual Review* 17 (1979) 285-346.
24. Global Aquaculture Alliance - Proposta de estratégia setorial sobre resíduos de antibióticos no camarão de cultivo. *In: European Seafood Exhibition. Bruxelas, Bélgica: GAA. (2002)*
25. González F.H.D., Carvalho V., Möller V.A.; Duarte F.R. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.*(2001) 29:1-6.
26. Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Albery, H., Lossow, C.H., Ramm, K;

- Sxnger, H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *European Journal of Biochemistry* 121 (1982) 249-257.
27. Hayashi H, Wada H, Yoshimura T, Esaki N, Soda K. Recent topics in pyridoxal 5'-phosphate enzyme studies. *Annu Rev Biochem* 59 (1990) 87–110.
 28. Hryniewiecka-Zsyfter, Z.; Babula, A.. Ultrastructural changes in the hepatopancreas cells of *Saduriaentomon* (Linnaeus, 1785) (Isopoda, Valvifera) from the Balticinfected with *Cryptococco laurentii* (Kuferath).*Crustaceana* 7 (1997) 822-830.
 29. IBAMA, 2001. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-Uçá, do Guaiaumum e do Siri-Azul / José Dias Neto, organizador. – Brasília.
 30. Igwilo, I.O., Ogoke, T.J., Igwilo, S.N., Udedi, S.C., Abdulsalami, M.S and Okafor, C. The Effect of De-Fatted *Moringa oleifera* Seed Powder on Growth Rate and some Biochemical Parameters of Albino Ratshe *Bioscientist*. 1(1) (2013) 28-31.
 31. Kameswaramma, A.L., Shyamasundari, K., Hanumantha R.K., Histological and histochemical changes of the hepatopancreas in relation to moult stages of the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards) (Crustacea: Anomura).*Rev. Hydrobiol.* 29 (1990) 781–796.
 32. Karakassis, I; Eleftheriou, A. The continental shelf of Crete: structure of macrobenthic communities. *Marine Ecology Progress Series*, 160 (1997) 185-196.
 33. Kavitha, R.T; Nelson, R. Thenmozhi, E. Priya Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Anisomeles malabarica* (L) R.BR. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2 (1) (2012) 1-5.
 34. Klaassen, C.D; Watkins, J.B. Princípios de Toxicologia. Toxicologia analítica/forense. *In: Toxicologia: A Ciência Básica dos tóxicos de Casarett e Doull*. 5ª ed. Lisboa: 11-65; 787-803, 2001.
 35. Kumari P, Reddy CR, Jha B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal Biochem.* 415(2) (2011) 134-44.
 36. Lafarge-Frayssinet, C; Robbana-Barnat S, Frayssinet C, Toucas L, Declôître F. Cytotoxicity and DNA damaging potency of chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. *Mutat Res.* (1994) 320(3):207-15.
 37. Landis, W. Yu, M. H. *Introduction to Environmental Toxicology*, Lewis Publishers, Landis, 1999.
 38. Lavanya,S; Ramesh,M; Kavitha,C; Malarvizhi.A. Hematological, biochemical and ion regulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*,82 (2011) 977–985.
 39. Lummato MM, Di Fiori E, Sabatini SE, Cacciatore LC, Cochón AC, de Molina Mdel C,

- Juárez AB. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicol Environ Sf.* 95 (2013) 123-9.
40. Machado, A.B.M.; Martins, C.S.; Drummont, G.M. Eds. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 160p., 2005.
41. Malarvizhi P, Selvaraj, B., Ulaganathanand I. Shanmugapandiyan, P. Membrane stabilizing potential of *Ecbolium viride* on acetaminophen provoked hepatotoxicity. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research.* 3 (7) (2012) 883-889.
42. Manchanda A, Cameron C, Robinson G. Beware of paracetamol use in alcohol abusers: a 10 potential cause of acute liver injury. *N Z Med J.* 126(1383) (2013) :80-4.
43. Martin, J.W.; G.E. Davis. An Updated Classification of the Recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series,* 39: 2001, 124 p.
44. Morris DJ, Gray AJ, Kay JF, Gettinby G. EU sampling strategies for the detection of veterinary drug residues in aquaculture species: are they working? *Drug Test Anal.* 1 (2012) 1-9.
45. Motta, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações.* 4ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.
46. Ohashi, N; Hori, T.; Uemoto, S; Jermanus, S; Chen, F; Nakao, A; Nguyen, J. H. Hypothermia predicts hepatic failure after extensive hepatectomy in mice. *World J Hepatol* 27; 5(4): (2013), 170–181.
47. Papadimitriou E, Loumbourdis NS. Glycogen, proteins, and aminotransferase (GOT, GPT) changes in the frog *Rana ridibunda* exposed to high concentrations of copper. *Bull Environ Contam Toxicol.*;74(1) (2005):120-5.
48. Pearse, A.G.E. *Histochemistry, theoretical and applied.* London: Churchill. 1960, 998 p.
49. Pruden A, Larsson DG, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect.* 121(8) (2013) 878-85.
50. Ramadevi, K., Bandyopadhyay R., Hall A.J., Indira S., Pande S and Jaiswal, P. Farmer's perceptions of the effects of plant diseases on the yield and nutritive value of crop residues used for pre-urban dairy production on the Deccan Plateau: Findings from participatory rural appraisals. *Information Bulletin* (60) (2000) 35 pp.
51. Reddy SL, Venugopal NB. Fluoride induced changes in protein metabolism in the tissues of freshwater crab *Barytelphusa guerini*. *Environ. Pollut.* 67(2) (1990) 97-108.

52. Ruscak, M., Orlicky, J., Zubor, V., and Hager, H. Alanine Aminotransferase in Bovine Brain: Purification and Properties *Journal of Neurochemistry* 9 (1) (1982) 210–216.
53. Saier, M. H., and Jenkins, T. W. Enzymology: Purification And Properties Alanine Aminotransferase: I. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 91-100.
54. Sastre, M.P; Reyes, P; Ramos, H.; Romero, R; Rivera, J. Heavy metal bioaccumulation in Puerto Rican Blue Crabs *Callinectes* spp. *Bulletin of Marine Science*, 64(20) (1999) 209-217.
55. Schneider, M., and Chen, P. S. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 11 (1981) 657-672.
56. Schuwerack PM, Lewis JW. Cellular responses to increasing Cd concentrations in the freshwater crab *Potamonautes warren* harbouring microbial gill infestations. *Cell Tissue Res.* 313(3) (2003) 335-46.
57. Shokrzadeh M, Shobi S, Attar H, Shayegan S, Payam SS, Ghorbani F. Effect of vitamins A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon. *Pak J Biol Sci.* (2012) 936-41.
58. Silva, R. Aspectos etnobiológicos, biológicos e viabilidade para o cultivo de larvas e juvenis em laboratório de *Cardisoma guanhum* Latreille. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (2006).
59. Souza, L.G.; Petriella, A.M. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentines* (Crustacea, Caridea) during moult. *Biocell* (2001) 275-281.
60. Stanquevis, C.E., Furlan, A.C., Marcato, S.M., Grieser, D.O., Zancanela, V, Euzébio, C.T., Finco, E.M., Ferreira, M.F.Z. Concentrações séricas de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em codornas de corte suplementadas com diferentes níveis de vitaminas. V Simpósio Internacional e IV Congresso Brasileiro de Coturnicultura. Lavras, MG, 2013. Anais...
61. Storch, V.; Lehnert-Moritz, K.. The effects of starvation on the hepatopancreas of the isopod *Ligia oceanica*. *Zoologischer Anzeiger* (1980)137-146.
62. Thakur, P. C; Stuckenholtz, Carsten; Rivera, M.R; Davison, Jon M; Yao, J.K; Amsterdam, A. Sadler; K.C; Bahary, N; Lack of *de novo* Phosphatidylinositol Synthesis Leads to Endoplasmic Reticulum Stress and Hepatic Steatosis in *cdipt*-Deficient Zebrafish. *Hepatology*. 54(2) (2011): 452–462.
63. Tkachenko H, Kurhaluk N. Pollution-induced oxidative stress and biochemical parameter alterations in the blood of white stork nestlings *Ciconia ciconia* from regions with different degrees of contamination in Poland. *J Environ Monit.* 14(12): (2012) 3182-91.

64. Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A.; Freitas-Neto A.G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2ª ed. Manole, São Paulo, 2003, 331 p.
65. Vijayavel, K.; Balasubramanian, M.P. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in an estuarine edible crab *Scylla serrata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63(1) (2006) 141-147.
66. Weifen W.; Hong, L.; Changhu, X.; Jamil, K. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environment international*., 30 (3)(2004): 367-373.
67. Vogt, G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* (1994) 83-101.
68. Wu X, Liu W, Gou X. Tissue-specific distribution and activity of glutathione S-transferases as biomarkers in bivalve shellfishes. *Water Environ Res*. 85(5) (2013) 404-10.
69. Zhang, RQ, Ying GG, Su HC, Zhou LJ, Liu YS. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China. *J Environ Sci Health B*. 48(11) (2013) 999-1013.
70. Zlotowski P., Nakazato L., Dutra V., Barros S.S., Gimeno E.J., Göcks M., Colodel E.M; Driemeier D.. Glicogenose hereditária em bovinos Brahman no Brasil. *Pesq. Vet. Bras*. (2005) 210-214.

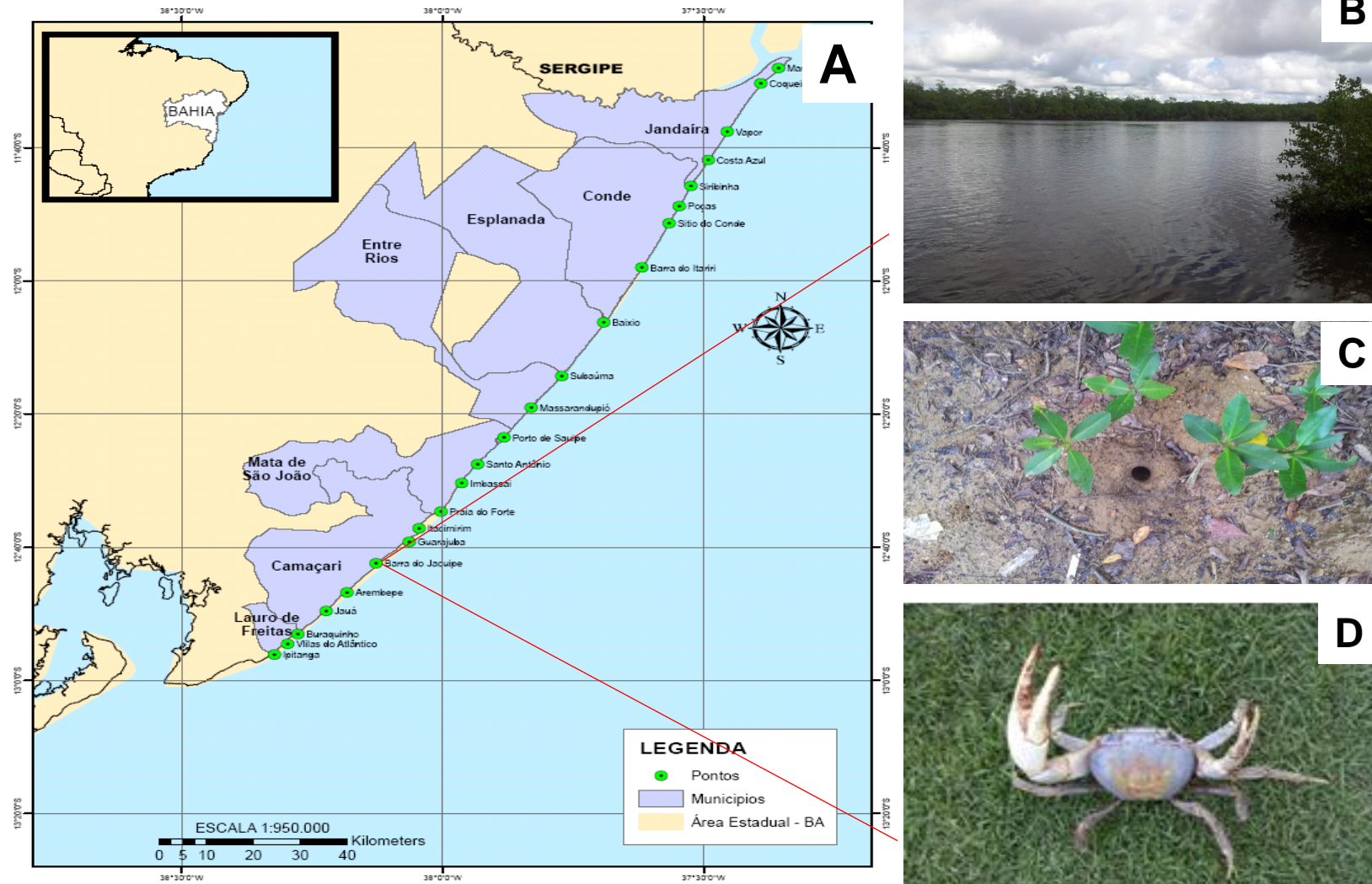


Figura 1. Localidade de amostragem do *Cardisoma guanhumu*. A) localização geográfica de Barra do Jacuípe, Bahia, Brasil; B) Vista geral do manguezal; C) Toca de *Cardisoma guanhumu*; D) *Cardisoma guanhumu* macho.

Indivíduo	CT(mm)	LT(mm)	PT(g)	Valores de ALT (U/L)		Valores de AST (U/L)	
				Controle		Controle	
01	39,06	46,69	53,41	168		484	
02	44,41	54,49	72,49	172		172	
03	46,15	54,87	87,11	256		344	
04	44,57	53,05	73,15	136		136	
05	46,21	55,85	88,09	104		136	
06	41,08	48,80	55,84	68		160	
07	43,92	50,29	69,93	192		204	
08	44,20	53,36	71,81	34		140	
09	49,28	58,99	105,71	172		136	
10	37,30	43,78	43,24	92		137	
Média	43,62	52,02	72,08	139,4		204,9	
Desvio Padrão	3,56	4,59	18,45	65,9		117,1	
CV{%	8,17	8,83	25,60	47,2		57,2	

Tabela 1. Valores de comprimento total da carapaça (CT) (mm), largura total da carapaça (LT) (mm), peso úmido total (PT) (g), concentração hemolinfática de ALT(U/L) e AST(U/L), valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação (%) de 10 indivíduos analisados de *Cardisoma guanhumi*.

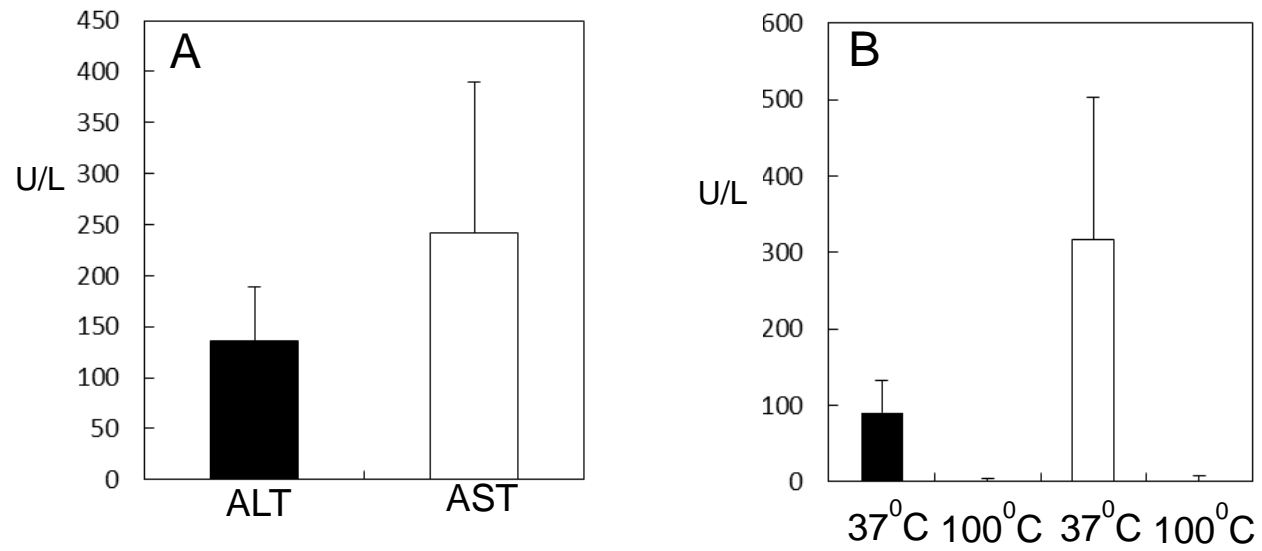


Figura 2. Em (A) Concentração hemolinfática média de ALT (em preto) e AST (em branco) expressa em U/L calculada a partir dos valores encontrados para os 15 indivíduos da espécie *Cardisoma guanhumi* Em (B) concentração hemolinfática média de ALT (em preto) e AST (em Branco) determinadas à 37°C e 100°C.

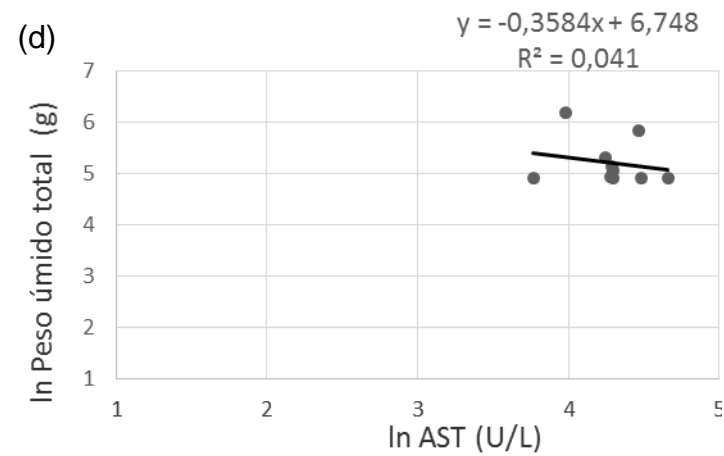
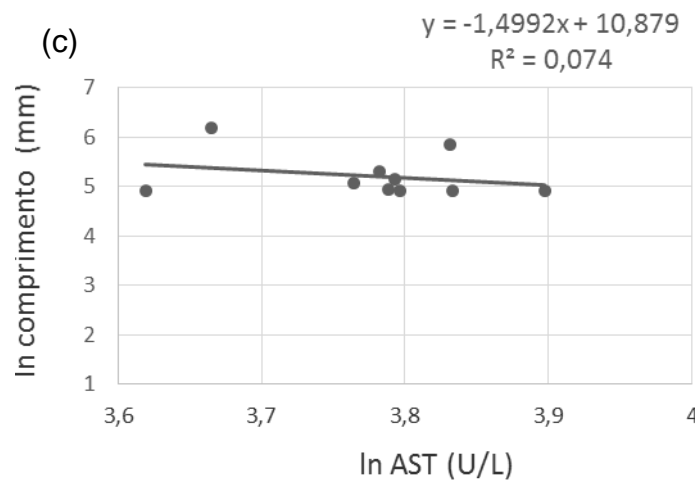
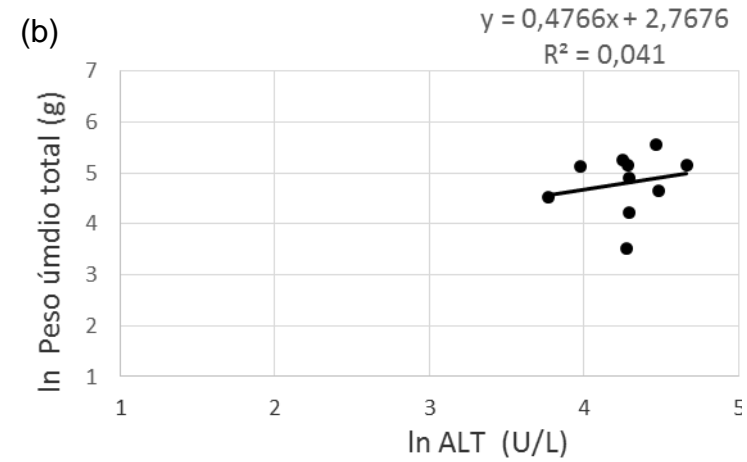
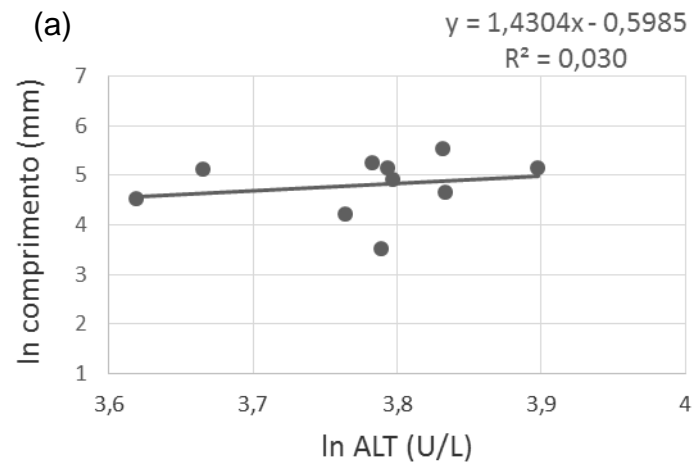


Figura 3. Correlações dos parâmetros biométricos do comprimento total da carapaça (mm) e Peso úmido total (g) com ALT(U/L) e AST(U/L) para os indivíduos analisados de *Cardisoma guanhumi*. a) ln Comprimento total e ln ALT; b) ln Peso úmido total e ln ALT; c) ln Comprimento total da carapaça e ln AST; d) ln Peso úmido total e ln AST.

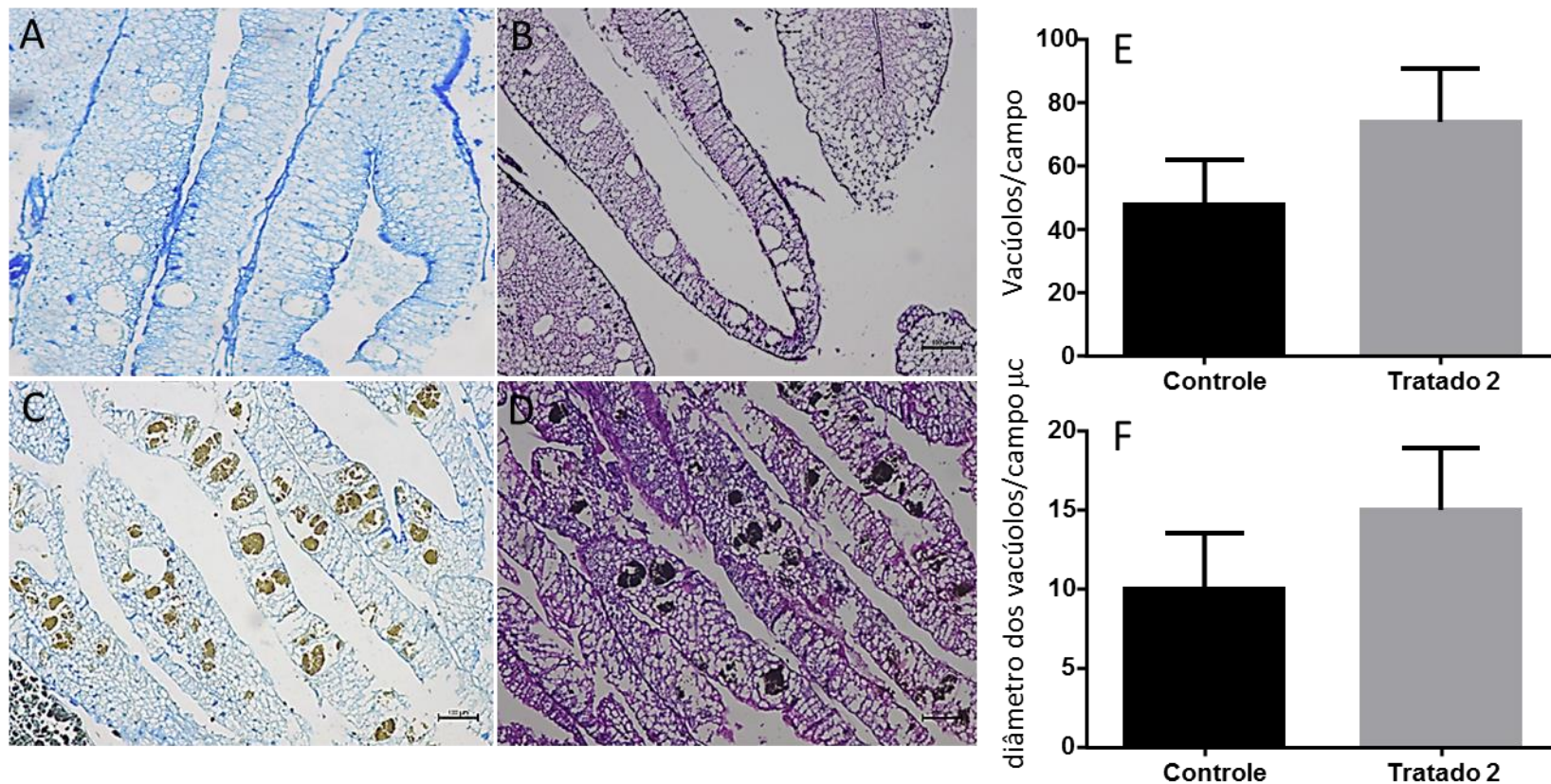


Figura 4. Em (A) e (B) cortes longitudinais de túbulos hepatopâncreáticos de animais controle de *Cardisoma guanhumii* corados com azul de bromofenol (A) ou hematoxilina eosina em (B). Em (C) e (D) cortes longitudinais de hepatopâncreas de animais tratados com Cloranfenicol corados com azul de bromofenol (C) ou hematoxilina eosina em (D). Em (E) quantificação de número de vacúolos por campo observado em laminas preparadas a partir de hepatopâncreas de animais controle (barra preta) ou tratados (barra cinza). Em (F) diâmetro dos vacúolos observados por campo em laminas preparadas a partir de túbulos de hepatopâncreas de animais controle (barra preta) ou tratados (barra cinza).

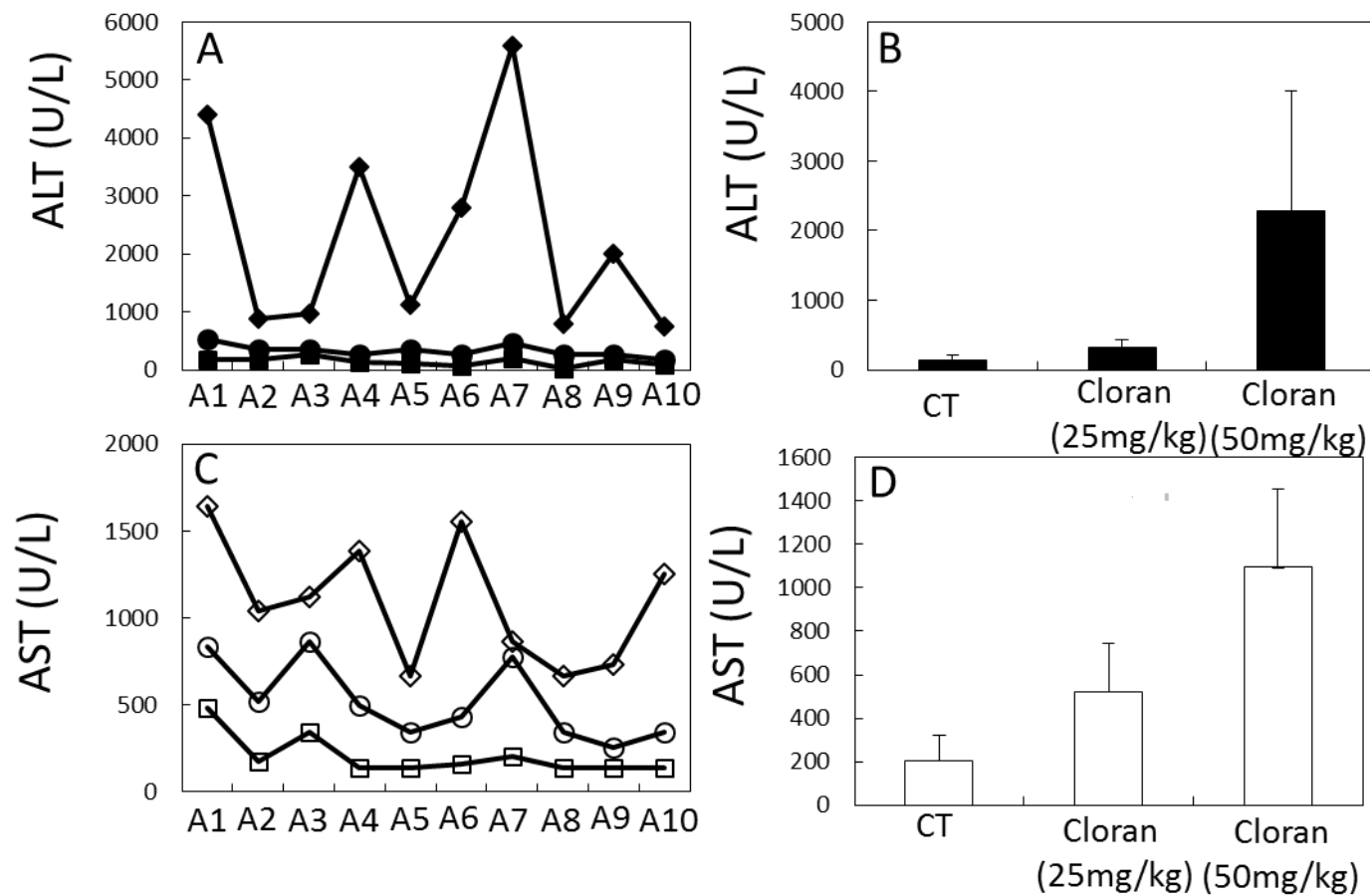


Figura 5. Em (A) e (C) concentrações hemolinfáticas de ALT (A) e de AST (B) de *Cardisoma guanhumu* determinadas em 10 animais controle (curva inferior no painel A e C), tratados com 25 mg/Kg de Cloranfenicol (curva intermediária no painel A e C) ou tratados com 50 mg/kg de Cloranfenicol (curva superior painel A e C). Em B e D concentração hemolinfática média de ALT (B) e AST (D) para animais controle, tratados com 25mg/mKg ou com 50 mg/kg de Cloranfenicol.

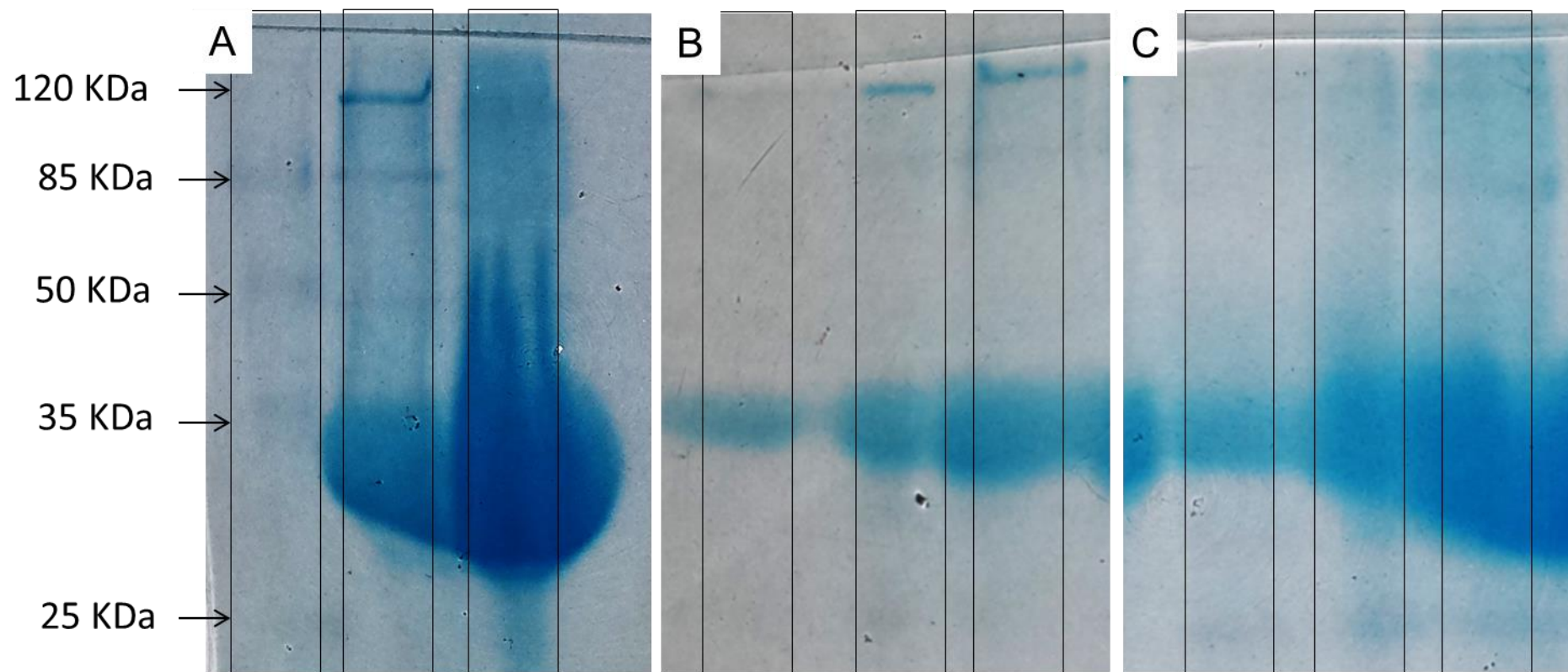


Figura 6. Eletroforese em gel de acrilamida de hemolinfa de *Cardisoma guanhumii*. Em (A) a primeira coluna corresponde aos padrões de peso molecular. A segunda, a hemolinfa de animais controle e a terceira coluna a hemolinfa de animais tratados. Em (B) hemolinfa de animais controle diluída a 10, 3 e 1 vez, primeira, segunda e terceira colunas respectivamente. Em (C) hemolinfa de animais tratados com 50 mg/kg de Cloranfenicol diluída a 10, 3 e 1 vez, primeira, segunda e terceira colunas, respectivamente.

5.DISSCUSSÃO

ALT e AST

O aumento dos níveis das transaminases encontrados nas doses de 25 e 50 mg/Kg de cloranfenicol demonstra a toxicidade deste antibiótico para a espécie investigada. Weifen et al (2004) detectou a rápida absorção de cloranfenicol pelo camarão *Penaeus chinensis*, através da avaliação das concentrações encontradas nos músculos, sendo a meia vida do antibiótico estimada em 10,04 h. Considerando o valor limite de 0.3 ng/g, permitido pelos países europeus para resíduos de cloranfenicol para organismos provenientes de cultivos, Weifen et al. (2004) estabeleceram que a eliminação total do antibiótico aconteceria em 139,7 h em doses ministradas de 2 mg/g em ração utilizada em cultivos.

O cloranfenicol é metabolizado em humanos no fígado pela conjugação com ácido glicurônico, através da ação da enzima glicuronil-transferase, gerando seis metabólitos: Nitroso-Cloranfenicol (NO-CAP), cloranfenicol-glucoronida (CAP-G), Cloranfenicol-Base (NAPD), Cloranfenicol álcool (HAP), Dehidrocloranfenicol (DH-CAP) e Dehidrocloranfenicol base (N-PAP). Estes dois últimos, formados por enterobactérias intestinais (Lafarge-Frayssinet et al., 1994).

Embora a identificação dos metabólitos secundários do cloranfenicol sobre *C. guanhumi* não tenha sido incluída no escopo deste trabalho, é provável que a principal via metabólica deste antibiótico esteja relacionada ao citocromo P- 450, considerando que este grupo de proteínas já foi identificada em outros crustáceos (David et al., 2012; Badwin et al., 2009), incluindo outros decápodes (Degtyarenko, 2014; Koenig et al., 2012), e seu envolvimento no metabolismo de cloranfenicol (Gross et al., 1982; Lafarge-Frayssinet et al., 1994), possuindo efeito inibidor neste sistema,

como ocorre em outros animais (Nunez, 1999).

A citotoxicidade dos metabólitos do cloranfenicol Nitroso-Cloranfenicol (NO-CAP}, cloranfenicol-glicuronida (CAP-G) e Cloranfenicol-Base (NAPD) em humanos (Gross et al., 1982); (Lafarge-Frayssinet et al., 1994), podem provavelmente explicar as alterações dos níveis enzimáticos de ALT e AST em *C. guanhumi*, como consequência da ação citotóxica do cloranfenicol sobre os hepatócitos dos indivíduos analisados.

Outros metabólitos do cloranfenicol, Cloranfenicol-Base (NAPD), Cloranfenicol álcool (HAP), Dehidrocloranfenicol (DH-CAP) e Dehidrocloranfenicol base (N- PAP) tem ação comprovadamente mais genotóxica em seres humanos, embora possam, quando em altas concentrações, também ter ação citotóxica (Lafarge-Frayssinet et al, 1994), o que não pode ser descartado para a espécie investigada, considerando a alta dosagem utilizada de 50 mg/Kg.

Os valores de AST foram expressivamente maiores que os de ALT. Reddy e Venugopal (1990) em estudo de toxicidade com fluorito de sódio (NaF) no caranguejo *Barythelphusa guerini*, encontrou valores também maiores para a AST, assim como Vijayavel e Balasubramanian (2006) para *Scylla serrata*, em estudo de toxicidade do naftaleno. Essas variações devem estar associadas a não especificidade da AST como biomarcador para avaliação de efeitos hepatotóxicos, já que também é encontrada em músculos, coração e outros órgãos (Al-Habori, et al., 2002).

O aumento dos valores de AST encontrado nos indivíduos tratados com 25 mg/Kg e 50 mg/Kg de cloranfenicol pode indicar que este agente tóxico possa ter afetado outros órgãos dos indivíduos tratados, o que é corroborado pela diferença significativa entre os valores iniciais desta transaminase e os

valores encontrados com a dose de 50 mg/Kg (**** $p < 0,01$). De fato, Weifen et al. (2004) encontraram altas concentrações de cloranfenicol em músculos de *Penaeus chinensis*, após oferta via oral do antibiótico associado à ração.

As transaminases ALT e AST não apresentam grandes variações entre indivíduos normais jovens e adultos da espécie humana (Ruhl e Everhart, 2013). Este comportamento também foi observado para *C. guanhumi* no presente trabalho, considerando as variáveis comprimento e peso. Este é um aspecto importante na perspectiva de utilização desses biomarcadores para a espécie em questão.

Histologia

O epitélio do hepatopâncreas de *Cardisoma guanhumi* apresentou os mesmos tipos celulares encontrados para outros crustáceos braquiúros (Stanier et al., 1968; Hopkin e Nott, 1980; Valentin-Neto, 2004, Marcolin et al. (2005), com quatro tipos celulares: Células embrionárias, fibrilares, reabsortivas e secretoras

Estes diferentes tipos celulares tem funções diferenciadas e podem alterar sua morfologia e atividade de acordo com o ciclo de vida (Marcolin et al, 2005). Desta forma, é importante estabelecer que em estudos com biomarcadores bioquímicas, a exemplo da ALT e AST, os indivíduos devem estar na mesma fase do ciclo de vida, preferencialmente, na fase de intermuda, quando há menores alterações fisiológicas.

As células embrionárias são pequenas e estão posicionadas distalmente nos túbulos hepatopancreáticos e provavelmente originam os demais tipos celulares (Al-Mohanna e Nott, 1989; Souza e Petriella, 2000, 2001; Vogt, 1994). As células fibrilares estão associadas a capacidade de

síntese e secreção de enzimas digestivas (Johnston et al., 1998; Al-Mohanna e Nott, 1989; Ramadevi et al., 1990; Vogt, 1994; Souza e Petriella, 2001 e Marcolin et al., 2005) , enquanto as células de reabsorção e secretoras apresentam as funções de absorção e secreção , respectivamente .

As células secretoras de *C. guanhumi* tratados com 50 mg/Kg de cloranfenicol, apresentaram uma intensa vacuolização e aumento do diâmetro dos vacúolos , indicando que o cloranfenicol ocasionou lesão hepatopancreática nos indivíduos tratados com esta dosagem. O aumento da vacuolização tem sido reportado como uma resposta histopatológica de diversos tecidos em vários organismos como mamíferos (Ziotowski et al., 2005) , incluindo o homem (Singh et al., 2013) ; peixes (Thakur et al., 2011) ; (Aibinati et al., 2009) , molusco gastrópode (Cengiz et al., 2005), lagostim (Desouky et al., 2013) e caranguejo de água doce (Schuwerack e Lewis, 2003) .

O aumento da atividade das células secretoras , mostrada através das técnicas histoquímicas utilizadas , revelou um aumento de secreção de caráter ácido nos vacúolos das células hepatopancreáticas , e provavelmente estão relacionadas a metabolização do cloranfenicol (Lafarge-Frayssinet et al., 1994). Entretanto, a natureza química de metabólitos e/ou de proteínas de detoxificação em *C. guanhumi* precisa ser investigada .

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A AST em diferentes espécies tem peso molecular de cerca de 40 KDa (Hayashi et al., 1990) e a ALT em bois (Ruscak et al., 1982), porcos (Saier e Jenkins , 1967), ratos (Gatehouse et al., 1982) e *Drosophila* (Schneider e Chen, 1981) possui peso molecular entre 70 a 125 KDa.

Embora a visualização do gel de poliacrilamida não exclua a possibilidade de aumento nas concentrações hemolinfáticas de proteínas com esses respectivos pesos moleculares, a visualização do aumento não é suficientemente nítida. Por outro lado, a eletroforese de poliacrilamida da hemolinfa dos indivíduos tratados com a dose de 50 mg/Kg revelou o aumento significativo de uma proteína majoritária de 35 KDa e o surgimento de uma banda de 25 KDa. Os dados tornam interessante o desenvolvimento de estudos posteriores para a identificação das proteínas da hemolinfa-

É importante ressaltar que os organismos tendem a responder a situação de estresse fisiológico ou de exposição a agentes tóxicos, com uma rápida transcrição e tradução de um complexo de proteínas altamente conservadas, denominadas "proteínas de estresse" (*Heat Shock Proteins* - HSPs) (Locke et al., 1990).

Recentemente, Morones-Ramirez et al. (2013) demonstraram que o uso por longos períodos de antibióticos aumentam o estresse oxidativo celular em seres humanos e bactérias. Esta condição é conhecida como fator indutor da síntese de "proteínas de estresse" em diversos organismos como o homem (Zeng et al., 2013), peixes (Pinner e Uner, 2013), dentre outros (Wong et al., 2010).

Dentre estas proteínas, a HSP70 é a mais bem utilizada como biomarcadora, incluindo seres humanos (Rauch e Gestwicki, 2013; Kruger et al., 2013; Zeng et al., 2003), moluscos (Medhioub et al., 2013) e peixes (Ghosh e Ray, 2012); (Cui et al., 2013); (Pinner e Uner, 2013). Em crustáceos decápodes foi isolada e validada como biomarcadora no camarão *Fenneropenaeus chinensis* (Luan et al., 2010), no lagostim *Procambarus clarkii* (Celi et al., 2013) e nos caranguejos *Pachygrapsus marmoratus* (Madeira et al., 2013) e *Eriocheir sinensis* (Sun et al., 2012).

As proteínas de estresse estão associadas a diversos mecanismos de reparação celular, como prevenção de agregação de proteínas, desestruturação de complexos proteicos e modulação de interações proteína-proteína (Broadley e Hartl, 2009) de onde decorre o seu uso como biomarcadores de estresse fisiológico (Cui et al., 2013; Nascimento, 1996; Nascimento et al., 1996) ou agentes tóxicos, como metais pesados (Bondizio et al., 2013), agrotóxicos (Ghosh e Ray, 2012) e hidrocarbonetos (Nascimento et al., 1998).

Recentemente, Consoi-Proch et al. (2010) demonstrou a utilização das proteínas de estresse para avaliação de efeitos do aquecimento global em organismos aquáticos, incluindo os crustáceos, e Ait-Aissa (2003) comprovou a convergência entre diversos testes de toxicidade e avaliação das proteínas de estresse. Estes estudos confirmam a perspectivas de uso futuros dessas proteínas para avaliação de múltiplos agentes agressores sobre os organismos em diversos ambientes.

Embora o gel não permita a clara visualização do aumento da concentração da cadeia polipeptídica de 70 KDa também não apresenta definição para a exclusão dessa possibilidade. Além disso, a visualização da banda de 30 KDa nos animais tratados pode representar uma reação à situação de stress por aumento da síntese protéica.

Uso do cloranfenicol e os riscos ambientais

Os resultados deste trabalho demonstraram os riscos potenciais da utilização de antibiótico como o cloranfenicol em aquicultura. Estes riscos são ampliados quando se considera a exposição crônica a que *C. guanhum* está sujeito em seu habitat, considerando o uso constante desse agente tóxico nos cultivos, a cada ciclo, desde a larvicultura à despesca.

O crescimento acelerado da aquicultura no mundo tem resultado em um série de problemas ambientais e doenças humanas, gerados pelo uso indiscriminado de antibióticos (FAO, 2006; Chang e Liu, 2002), como a resistência de enterobactérias como *Salmonella* (Carvalho et al., 2009), de grande interesse sanitário, e outros agentes patogênicos como *Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas* spp. (Franco et al, 2010) e *Escherichia coli* (Pruden et al., 2013).

Os modernos sistemas integrados de aquicultura, onde se aplicam múltiplos tratamentos antibióticos, como cloranfenicol, ampicilina, sulfametazona, estreptomicina e tetraciclina, podem facilitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, quando comparado a um sistema tradicional de aquicultura, tornando os viveiros, grandes reservatórios de cepas resistentes (Zhang et al. 2013).

Embora o uso de antibióticos tenha sido proibido em vários países, inclusive no Brasil, há falta de fiscalização em grande parte dos países, especialmente da Ásia, onde há muitos cultivos de subsistência ou de pequeno porte (Pruden et al, 2013).

Nos últimos 50 anos, o cultivo de espécies aquáticas em condições controladas, com o objetivo de aumentar a produção tem crescido em importância e atualmente fornece quase 50% da oferta de frutos do mar no mundo. Em parte, essa expansão foi possível devido ao uso de antibióticos, antifúngicos e outros medicamentos veterinários para controlar doenças e saúde dos organismos cultivados (Morris et al., 2012); (Pruden et al., 2013)..

Embora a Comunidade Europeia (EC) estabeleça critérios rígidos para comercialização de organismos cultivados em relação a salubridade,

dados recentes mostram a fragilidade dos parâmetros estabelecidos, devido a particularidade dos cultivos em todo o mundo (Morris et al, 2012) . O cloranfenicol está incluído pela EC na classe de tolerância zero de resíduos em organismos cultivados e comercializados.

No Brasil, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo Humano (PAMVet), criado pela ANVISA em 2003, estabeleceu também o limite zero para o cloranfenicol proveniente de organismos cultivados.

Apesar do Brasil ter uma legislação compatível com os riscos ambientais e para a saúde humana do cloranfenicol há cerca de 10 anos, a falta de fiscalização ainda é incipiente nos cultivos, especialmente nas carcinoculturas, tornando vulnerável a agentes tóxicos, a biota que habita os manguezais e ecossistemas adjacentes, como o *Cardisoma guanhumi*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A validação das enzimas ALT e AST como biomarcadores em *Cardisoma guanhumi* para avaliação da toxicidade do antibiótico cloranfenicol, estabelece perspectivas para seu uso na investigação dos riscos do uso de outros antibióticos similares em aquicultura, sobre a biota que habita manguezais e outros ecossistemas adjacentes, especialmente a carcinofauna que representa o topo das comunidades bentônicas, e que se liga diretamente as comunidades nectônicas, que incluem os peixes de importância ímpar como recurso alimentar.
2. A utilização desses biomarcadores poderá ser também importante na avaliação *in situ* da toxicidade de diversos produtos de uso veterinário no plantel de crustáceos durante o cultivo, a exemplo do *Litopenaeus vannamei*, como indicadores de saúde destes organismos.
3. A avaliação histológica mostrou ser imprescindível na confirmação de danos no hepatopâncreas de *C. guanhumi*, sob o efeito do antibiótico cloranfenicol, validando a consequente resposta citotóxica do agente, revelada pelas alterações das transaminases ALT e AST.
4. Embora outros tecidos de *C. guanhumi* não tenham sido avaliados no presente estudo, os valores significativamente maiores de AST em relação a ALT, precisam ser melhor investigados, objetivando avaliar a toxicidade do cloranfenicol em outros órgãos desta espécie.
5. O aumento da concentração hemolinfática da proteína com peso molecular de 30 KDa e o surgimento da banda de 25 KDa observados nos indivíduos tratados com cloranfenicol, precisa ser melhor investigada quanto a sua identidade e funções.

6. A associação entre avaliação bioquímica, histologia e proteínas de estresse, formando uma tríade ecotoxicológica, poderá representar uma promissora perspectiva para avaliações de toxicidade em crustáceos decápodes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aidar, E; Pereira, S.A; Sousa, E.C.P.M, Brasil-Lima, G.M.S.S. Teste de toxicidade com microalgas. *In*: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002.
2. Ait-Aissa S, Pandard P, Magaud H, Arrigo AP, Thybaud E, Porcher JM. Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicol Environ Saf.* 54 (1) (2003) 92-104.
3. Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati RCB, Carvalho JV, De Lira AO, Santos GB, Vidal LVO. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arq Bras Med Vet Zootec* (2009) 61(3):621-627.
4. AL-Habori, M.; AL-Aghbari, A.; AL-Mamary, M.; Baker, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animais. *J Ethnopharmacol, Taipei, Taiwan,* 83 (2002) 209-217.
5. Almeida JA, Diniz YS, Marques SF, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli EL. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ Int.* (2002) 27(8):673-9.
6. AL-Mohanna, S.Y. Nott, J.A. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisu/catus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology* 101 (1989) 503-544.
7. Alves, S. R. C. Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

8. Avilez IM, Hori TSF, Almeida LC, Hackbarth A, Bastos Neto JC, Bastos VLFC; Moraes G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 148 (2008): 136-142.
9. Badaró-Pedroso, C.; Reynier, M.V. Prósperi, V.A. Testes de toxicidade aguda com misidáceos – ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustacea, Mysidacea). *In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002.*
10. Baldwin, W.S; Marko, P.B; Nelson, D.R. The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*. (2009) 10:169.
11. Bliss, D.E. *The Biology of Crustacea: Systematics, the Fossil Record and Biogeography*. New York: Academic Press.1; 1982, 319p.
12. Bond-Buckup, G.; Fontoura, N. F.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C.O. *O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia*. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 1991, 71p.
13. Bondzio A, Pieper R, Gabler C, Weise C, Schulze P, Zentek J, Einspanier R. Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteome profiles in weaned piglets. *PloS One* 8(11) 2013.
14. Borghetti, N.R.B; Ostrensky, A; Borghetti, J.R. *Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba, 2003, 128 p.
15. Botelho, E. R. O.; Santos, M. C. F.; Souza, J. R. B. Aspectos populacionais do guaiamum *Cardisoma guanhumi* Latreille do estuário do Rio Una- Pernambuco- Brasil. *Boletim Técnico-Científico do Cepene*, 9 (1) (2001) 123-146.
16. Bowman, T.E.; Abele, L.G. Classification of the recent Crustacea. 1-27, *In: Abele, L.G. (ed.), Systematics, the Fossil Record, and Biogeography, Volume 1, In: Bliss, D.E. (ed.), The Biology of Crustacea. Academic Press, New York, 1982.*
17. Broadley, S. A.; Hartl, F. U. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Letters*, 583 (16) (2009) 2647-53.

18. Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A. J. Hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.* (2008) 8- 19.
19. Brusca, R.C. & G. J. Brusca. 2003. *Invertebrates*. 2a. ed. Sinauer, Sunderland, 966 p.
20. Bucker, A.; Carvalho, W; Alves-Gomes, J.A. Avaliação da mutagenese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, Manaus, 36 (3) (2006) 357-364.
21. Cabello, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment *Environmental Microbiology* 8(7) (2006) 1137-1144.
22. Cajaraville, M.P. *Science of the Total Environment*, 247 (2002): 95
23. Carqueija, C.R.G; Souza-Filho, J.J; Gouvêa, E.P; Queiroz, E.L. Decápodos (Crustacea) utilizados na alimentação de *Dasyatis guttata* Bloch & Schneider, 1801 (Eiasmobranchii, Dasyatidae), na área de influência da Estação Ecológica Ilha do Medo. *Revta. bras. Zool.* 12 (4) (1995) 833-838.
24. Carvalho, A. A. & Aguiar, C. Impact of Podcasts in Teacher Education: from Consumers to Producers. *In: Proceedings of SITE Chesapeake: AACE* (2009) 2473-2480.
25. Castello-Branco, A,C, Formiga, M.F; Diniz, M; Almeida, R.N; Santos, H.B; Oliveira, K.M.; Ramalho, J.A; Dantas, J.G. Parâmetros Bioquímicas e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. *R bras ci Saúde* 15(2) (2011): 209-214.
26. Celi, M. Filiciotto, F; Parrinello, D.; Buscaino, G; Damiano, M.A, Alessandra, M. Cuttitta, A, D'Angelo, S. Mazzola, S. Vazzana, M. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus *The Journal of Experimental Biology* 216 (2013) 709-718.
27. Céline C.P. Anne M. Frédéric H. Lara K. Colette M. Christophe J. Douady. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression *Cell Stress and Chaperones*. 15 (2010) 259-270.

- 28.Cengiz EI, Yildirim MZ, Otludil B, Unlü E. Histopathological effects of Thiodan on the freshwater snail, *Ga/ba truncatula* (Gastropoda , pulmonata). J Appl. Toxicol. 25(6) (2005) 464-9.
- 29.Chang, C.I.; Liu, W.Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European *Anguilla anguilla* L . Journal of Fish Diseases, 25 (5) (2002) 311-315.
- 30.Chapman, P.M. Oligochaete respiration as a measure of sediment and toxicity in Puget sound , Washington. Hydrobiologia 155(1987) 249-258.
- 31.Chapman, P.M., Dexter, R.N.; Long, E.R. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the sediment Quality Triad) in San Francisco Bay, Mar. Ecol. Prog. Ser. 37 (1987) 75-96.
- 32.Chasin, A.A.M; Azevedo , F.A. Intoxicação e Avaliação da Toxicidade . In: Azevedo, F.A ; Chasin, A.A.M. eds. As bases toxicológicas da ecotoxicologia . São Carlos: Rima, 127-166, 2003.
- 33.Cuartas, E.I., Díaz, A.C. ; Petriella, A.M. Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea , Penaeoidea) por efecto de lasalinidad . Biociencias (Brasil). 11(2003), 53-59.
- 34.Cui Y, Liu B, Xie J, Xu P, Habte-Tsion HM, Zhang Y. Effect of heat stress and recovery on viability , oxidative damage, and heat *shock* protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngo donidellus*). Fish Physiol Biochem. (2013).
- 35.D'Aoust J.Y *Samonella* and the international food trade. Int. J. Food. Microbiol. 24 (1994): 11-31.
36. Day RD, Segars AL, Arendt MO, Lee AM, Peden-Adams MM. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). Environ Health Perspect. 115(10) (2007):1421-8.
- 37.David RM, Jones HS, Panter GH, Winter MJ, Hutchinson TH, Kevin Chipman J. Interference with xenobiotic metabolic activity by the commonly used vehicle solvents dimethylsulfoxide and methanol in

- zebrafish (*Danio rerio*) larvae but not *Daphnia magna*. Chemosphere. 88(8): (2012) 912-7.
38. Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W.; Bossier, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends in Biotechnology. (2007) 25 472-479.
39. Degtyarenko, K. "Directory of P450-containing Systems". International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. Disponível em: <http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/>. Acesso: 15.01.2014.
40. Delgado M, de Imperial RM, Alonso F, Rodríguez C, Martín JV. Ecotoxicity bioassays on leachates from poultry manure. Bull Environ Contam Toxicol. (2013);90(4):401-4.
41. Desouky MM, Abdei-Gawad H, Hegazi B. Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. Food Chem Toxicol. 52 (2013) 42-52.
42. Drake BJ, Gonzalez-Meler MA, Long SP. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48 (1997) 609-63.
43. El-Ansary AK, Al Daihan SK. Effect of sublethal concentration of *Solanum nigrum* on transaminases and lactate dehydrogenase of *Biomphalaria arabica*, in Saudi Arabia. J Egypt. Soc. Parasitol. 37(1) (2007) 39-50.
44. FAO- Food and agriculture organization of the United Nations. Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, Republic of Korea, 2006.
45. FAO- Food and agriculture organization of the United Nations. Fishery Statistical Databases (2003) Disponível em: www.fao.org/fis/statist. Acesso em 10.01.2014.
46. Fatima C.T.C. Norma. S.E.B. Cristhiane M.F.R. Ernesto H; Regine, H.S. F.V. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará1 Rev. Ciênc. Agron., Fortaleza, 40 (4) (2009) 549-556.

47. Feder HM Jr, Osier C, Maderazo EG. Chloramphenicol: A review of its use in clinical practice. *Rev Infect Dis.* 3(3) (1981) 479-91.
48. Fernandes, L.M.B. Testes de toxicidade aguda para peixes *Mugil liza* (Valenciennes, 1838) e *Mugil curema* (Cuvier e Valenciennes, 1836). *In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002.*
49. Filho, S. (Coordenador). Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento. Rio de Janeiro, 1992, 472 p.
50. Fiament, A.; Soubbotina, A.; Mainil, J.; Marlier, D. Prevalence of *Salmonella serotypes* in male mule ducks in Belgium. *Veterinary record, London.* 170 (12) (2012) 311.
51. Franco, 1.; Bagaldo A. R.; Gil, L.; Oliveira, E.A.G. Albinati, R.C.B. Costa, M. M. Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 11 (2) (2010) 527-536.
52. Freitas, R.B.; Rovani, B.T.; Boligon, A.A.; de Brum, T.F.; Piana, M.; da Silva Jesus, R.; Veloso, C.F.; Kober, H.; Moresco, R.N.; Costa Araldi, I.C.; Bauermann, L.; Athayde, M.L. Hepatotoxicity Evaluation of Aqueous Extract from *Scutia buxifolia*. *Molecules* 18 (7) (2013) 7570-7583.
53. Gatehouse, P. W., Hopper, P. S., Schatz, L., and Segal, H. L. The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.) *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2319-24.
54. Ghosh E.; Kovács, S.J. Spatio-temporal attributes of left ventricular pressure decay rate during isovolumic relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 30 (2012).
55. Gibson, R.; Barker, P.L. The decapod hepatopancreas. *Oceanographic Marine Biology Annual Review* 17 (1979) 285-346.
56. Global Aquaculture Alliance - Proposta de estratégia setorial sobre resíduos de antibióticos no camarão de cultivo. *In: European Seafood Exhibition. Bruxelas, Bélgica: GAA. (2002)*

57. González F.H.D., Carvalho V., Möller V.A.; Duarte F.R. Perfil bioquímica sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS. (2001) 29:1-6.
58. Gouvêa, E.P.; Queiroz, E.L. Braquiúros (Crustacea, Decapoda) utilizados na alimentação de peixes Rajidae no litoral sul do Brasil. Ciênc. Cult. 40 (3) (1988) 276-279.
59. Grall J, Glemarec M. Using biotic indices to estimate macrobenth community perturbations in the Bay of Brest. Estuarine, Coastal and Shelf Science 44(Suppl. A) (1997) 43-53.
60. Grosh, M.C; Ray, A.K. Regulation of cytochrome P4501A by protein kinase C: the role of heat shock protein 70. J. Cell Commun. Signal. 6 (2012) 37-44.
61. Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Alberty, H., Lossow, C.H., Ramm, K; Sxnger, H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of *Citrus exocortis* and *Chrysanthemum* stunt viroid. European Journal of Biochemistry 121 (1982) 249-257.
62. Gurdeep S. MO, Sandeep R. Mathur. MO, V. K. Iyer, MO. Deepali J. MO, DNB Cytopathology of neoplastic meningitis: A series of 66 cases from a tertiary care center. Cytojournal. (2013) 10-13.
63. Halyna T. Natalia K. Joanna G. Effects of chloramine-T exposure on oxidative stress biomarkers and liver biochemistry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), brown trout, *Salmo trutta*(L.), and grayling, *Thymallus thymallus* (L.) Arch. Pol. Fish. (2013) 21: 41-51.
64. Halyna T. Natalia K. Pollution-induced oxidative stress and biochemical parameter alterations in the blood of white stork nestlings *Ciconia ciconia* from regions with different degrees of contamination in Poland J. Environ. Monit. (2012) 3182-3191.
65. Hayashi H, Wada H, Yoshimura T, Esaki N, Soda K. Recent topics in pyridoxal 5'-phosphate enzyme studies. Annu Rev Biochem 59 (1990) 87-110.
66. Hopkin, S.P. & Nott, J.A. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. Journal of Marine Biology 60 (1980) 891-907.

67. Hryniewiecka-Zsyfter, Z.; Babula, A. Ultrastructural changes in the hepatopancreas cells of *Saduriaentomon* (Linnaeus, 1785) (Isopoda, Valvifera) from the Baltic infected with *Cryptococco laurentii* (Kuferath). *Crustaceana* 7 (1997) 822-830.
68. IBAMA, 2001. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-Uçá, do Guaiamum e do Siri-Azul / José Dias Neto, organizador. -Brasília.
69. Igwilo, I.O., Ogoke, T.J., Igwilo, S.N., Udedi, S.C., Abdulsalami, M.S and Okafor, C. The Effect of De-Fatted *Moringa oleifera* Seed Powder on Growth Rate and some Biochemical Parameters of Albino Rats. *Bioscientist*. 1(1) (2013) 28-31.
70. Inagaki Y, Matsumoto Y, Kataoka K, Matsuhashi N, Sekimizu K, Evaluation of drug-induced tissue injury by measuring alanine aminotransferase (ALT) activity in silkworm hemolymph. *BMC Pharmacol Toxicol*. (2012) 13:13.
71. Jatobá, S.U.S; Cidade, L. C. F.; Vargas, G.M. Ecologismo, ambientalismo e ecologia política: diferentes visões da sustentabilidade e do território. *Soe. Estado*. (2009) 24 (1) 47-87.
72. Johnston, L.A., Ostrow, B.D., Jasoni, C., Blochlinger, K. The homeobox gene cut interacts genetically with the homeotic genes proboscipedia and Antennapedia. *Genetics* 149(1): (1998). 131--142.
73. Kameswaramma, A.L., Shyamasundari, K., Hanumantha R.K., Histological and histochemical changes of the hepatopancreas in relation to moult stages of the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards) (Crustacea: Anomura). *Rev. Hydrobiol*. 29 (1990) 781-796.
74. Kaniwa N, Saito Y. Pharmacogenomics of severe cutaneous adverse reactions and drug-induced liver injury. *J Hum Genet* (2013) 58: 317-26.
75. Karakassis, I; Eleftheriou, A. The continental shelf of Crete: structure of macrobenthic communities. *Marine Ecology Progress Series*, 160 (1997) 185-196.
76. Kavitha, R.T; Nelson, R. Thenmozhi, E. Priya Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Anisomeles malabarica* (L) R.BR. *J. Microbiol. Biotech. Res*. 2 (1) (2012) 1-5.

77. Kiaassen, C.D; Watkins , J.B. Princípios de Toxicologia. Toxicologia analítica/forense. *In: Toxicologia : A Ciência Básica dos tóxicos de Casarett e Doull*. 5a ed. Lisboa: 11-65; 787-803, 2001 .
78. Knie, J.L.W; Lopes, E.W.B. Testes ecotoxicológicos- Métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMAIGTZ, 2004, 289 p.
79. Koenig S, Fernández P, Solé M. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). *Aquat Toxicol*. 108: (2012) 11-7.
80. Kominek, J. Marzaleck, J; Neglevize, C.; Craig, E.A. Williams, BL Williams . The Complex Evolutionary Dynamics of Hsp70s: A Genomic and Functional Perspective. *Genome Biol. Evol.* (2013) 5 (12): 2460-2477.
81. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* (2000) 455 (1-2):155-66.
82. Kronembergerl, D.M.P; Junior, J. C; Nascimento, J.A.S.; Collares, J. E. R; Silva, LC.D. Desenvolvimento sustentável no brasil: uma análise a partir da aplicação do barômetro da sustentabilidade. *Soe. Nat.* (2008) 20 (1).
83. Krüger A, Vowinckel J, Müllleder M, Grote P, Capuano F, Bluemlein K, Ralser M. Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response. *EMBO Rep.* (2013) 14(12):1113-9.
84. Kumari P, Reddy CR, Jha B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal Biochem.* 415(2) (2011) 134-44.
85. Lafarge-Frayssinet, C; Robbana-Barnat S, Frayssinet C, Toucas L, Decloitre F. Cytotoxicity and DNA damaging potency of chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. *Mutat Res.* (1994) 320(3):207-15.
86. Land, M. F. Les yeux: structure et fonctionnement des me'canismes optiques . *In: Traite'de Zoologie Anatomie , Systeme'matique, Biologie. Crustace's. Tome VII, Fascicule 11. Ge'ne'ralite's (suite) et Systeme'matique*, ed. J. Forest, 1-42. Paris: Masson, 1996., 1002 p.

87. Landis, W. Yu, M. H. Introduction to Environmental Toxicology, Lewis Publishers, 1999.
88. Langman, L.J; Kapur, B.M. Toxicology: Then and now. Clin. Biochem. Toronto, 39. (2006) 498-510.
89. Lauwerys, R.R. Perrine, H. Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring. 2 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.
90. Lavanya, S; Ramesh, M; Kavitha, C; Malarvizhi, A. Hematological, biochemical and ion regulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. Chemosphere, 82 (2011) 977-985.
91. Leite, E. M. A. Monitorização biológica da exposição ocupacional. In: Moreau, R.L.M.; Bastos, M.E.P.B. Toxicologia Analítica . (Reimpr.) . Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2011.
92. Locke, M.; Noble, E. G.; Atkinson, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. American Journal of Physiology. 258 (1990) 723-29.
93. Lotufo, G. R.; Abessa, D.M. S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha : aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
94. Luan W, Li F, Zhang J, Wen R, Li Y, Xiang J. Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. Cell Stress and Chaperones 15 (2010) 83-93.
95. Luan, F.; Sheng, Y.; Wang, Y.; Staub, J.E. Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic Origins .Euphytica, 173 (1) (2010) 1-16.
96. Lummato MM, Di Fiori E, Sabatini SE, Cacciatore LC, Cochón AC, de Molina Mdel C, Juárez AB. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. Ecotoxicol Environ Sf. 95 (2013) 123-9.
97. Machado, A.B.M.; Martins, C.S.; Drummond, G.M. Eds. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção incluindo as espécies quase

- ameaçadas e deficientes em dados. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 160p., 2005.
98. Madeira O; Narciso H. N. Cabral. M. S. Diniz. Vinagre C. Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70) Cell Stress and Chaperones (2012) 17:707-716.
 99. Malarvizhi P, Selvaraj, B., Ulaganathanand I. Shanmugapandiyan, P. Membrane stabilizing potential of *Ecobolium viride* on acetaminophen provoked hepatotoxicity. International Journal of Biological & Pharmaceutical Research. 3 (7) (2012) 883-889.
 100. Manchanda A, Cameron C, Robinson G. Beware of paracetamol use in alcohol abusers: a 10 potential cause of acute liver injury. N Z Med J. 126(1383) (2013):80-4.
 101. Marcham, G.E. Genetic susceptibility and biomarkers in toxic injury litigation. Jurimetrics J. Tem, 4 (1) (2000) 67-109.
 102. Martin, J.W. & G.E. Davis.. An Updated Classification of the Recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series, 39: 2001, 124 p.
 103. Mastroti, R.R. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (Fertilização). In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002.
 104. Maurat, M.C. Teste de Toxicidade crônica de curta duração com a macroalga *Champia parvula* (C. Agardh) Harvey- Método semi-estático. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
 105. Medhioub, W.; Ramondenc, S.; Vanhove, A.S.; Vergnes, A.; Masseret, E.; Savar, V.; Amzil, Z.; Laabir, M.; Rolland, J.L. Exposure to the neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*, induces apoptosis of the hemocytes of the Oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Drugs 11 (2013) 4799-4814.
 106. Melo, S.L.R.; Abessa, D.M.S. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando anfípodos. In: Nascimento, I.A.; Sousa,

- E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
107. Monod, T.; Laubier, L. Les Crustace's dans la Biosphere. In Traite'de Zoologie Anatomie Systeme'matique, Biologie. Crustace's. Tome VII, Fasciculell. Ge'ne'ralite-s (suite) et Systeme'matique, ed. J. Forest, 91-166. Paris: Masson, 1996, 1002 p.
108. Moraes, E.C.F; Szenelwar, R.B; Fernicola, N.A.G.G.. Manual de Toxicologia Analítica. São Paulo: Roca, 187-194, 1991.
109. Moreau, R.L.M. Características das Análises Toxicológicas. In: Moreau, R.L.M.; Bastos, M.E.P.B. Toxicologia Analítica. (Reimpr.). Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2011.
110. Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. Sci.Transl. Med. (2013) 5(190): 1-11.
111. Morris DJ, Gray AJ, Kay JF, Gettinby G. EU sampling strategies for the detection of veterinary drug residues in aquaculture species: are they working? Drug Test Anal. 1 (2012) 1-9.
112. Motta, V.T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 4aed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.
113. Nascimento, I. A. ; Dickson, K. L. ; Zimmerman, E. G. Heat Shock Protein Response To Termal Stress On The Asiatic Clam *Corbícula fluminea*. Aquatic Ecosystem Health & Management: 5 (1) (1996) 231-238.
114. Nascimento, I. A. ; Leite, M. B. N. ; Sansone, G. ; Pereira, S. A. ; Smith, D. H.. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. Aquatic Ecosystem Health and Management. The Netherlands: 1 (1) (1998) 101-108.
115. Nascimento, I.A. Stress protein accumulation. In *Corbícula flumínea* (Molusca: Bivalvia) as an indicator of environmental water quality, related to heat shock protein response. Biociências. 4(1) (1996) 138-146.

116. Nascimento, I.A. Técnicas de coleta, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimentos para testes de toxicidade. *In:* Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
117. Nascimento, I.A. Testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *In:* Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
118. Nascimento, I.A.; Evangelista, A.J.A. Testes de toxicidade com sedimento usando-se pós-larvas de camarões *Litopenaeus* sp (Crustacea, Decapoda). *In:* Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
119. NCR – National Research Council – Committee on biological markers. Biological markers in environmental health. *Enviro. Health Perspect. Research Triangle Park*, 74(1987)3-9.
120. Nipper MG, Roper OS, Williams EK, Martin ML, Van Dam LF, Mills GN. Sediment toxicity and benthic communities in mildly contaminated mudflats. *Environ Toxicol Chem.* 17 (1998) 502-10.
121. Nipper, M. Avaliação de toxicidade com os copépodes calanóides *Acartia lilljeborgi* (Giesbrecht, 1892) e *Temora stylifera* (Dana, 1852). *In:* Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
122. Nipper, M.G.; Prósperi, V.P. & A.J. Zamboni. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm spermand embryos. *Buli. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (1993) 646-652.
123. Nunez, H.C. El citocromo P450 y su rol em la hepatotoxicidad inducida por las drogas. *Clínica Vitarte*, 2 (2), 1999.
124. Oliveira, D.P. Análise de Contaminantes Ambientais. *In:* Moreau, R.L.M.; Bastos, M.E.P.B. Toxicologia Analítica. (Reimpr.). Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2011.

125. ONU - Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar. Montego Bay, B.O. n.º:30, 11 Série. 6234-6441, 1982.
126. Ohashi, N; Hori, T.; Uemoto, S; Jermanus, S; Chen, F; Nakao, A; Nguyen, J. H. Hypothermia predicts hepatic failure after extensive hepatectomy in mice. *World J Hepatol* 27; 5(4): (2013), 170-181.
127. Papadimitriou E, Loumbourdis NS. Glycogen, proteins, and aminotransferase (GOT, GPT) changes in the frog *Rana ridibunda* exposed to high concentrations of copper. *Bull Environ Contam Toxicol.*;74(1) (2005):120-5.
128. Pearse, A.G.E. Histochemistry, theoretical and applied. London: Churchill. 1960, 998 p.
129. Pinner P, Uner N. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 36(3) (2013) 956-63.
130. Prósperi, V.A; Araújo, M.M.S. Testes de toxicidade crônica com *Lythechinus variegatus* Lamarck, 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus, 1758 (Echinodermata, Echinoidea). *In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.*
131. Pruden A, Larsson DG, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect.* 121(8) (2013) 878-85.
132. Ramadevi, K., Bandyopadhyay R., Hall A.J., Indira S., Pande S and Jaiswal, P. Farmer's perceptions of the effects of plant diseases on the yield and nutritive value of crop residues used for pre-urban dairy production on the Deccan Plateau: Findings from participatory rural appraisals. *Information Bulletin* (60) (2000) 35 pp.
133. Rauch, J. Gestwicki. J.E.. Binding of Human Nucleotide Exchange Factors to Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Generates Functionally Distinct Complexes in Vitro *J. Biol. Chem.* (2013) 2- 21.

134. Reddy SL, Venugopal NB. Fluoride induced changes in protein metabolism in the tissues of freshwater crab *Barytelphusa guerini*. *Environ. Pollut.* 67(2) (1990) 97-108.
135. Rhee JS, Won EJ, Kim RO, Choi BS, Choi IY, Park GS, Shin KH, Lee YM, Lee JS. The polychaete *Perinereis nuntia* ESTs and its use to uncover potential biomarker genes for molecular ecotoxicological studies. *Environ Res.* (2012) 112:48-57.
136. Ruhl CE, Everhart JE. Diurnal variation in serum alanine aminotransferase activity in the US population. *J. Clin. Gastroenterol.* 47(2) (2013) 165-73.
137. Ruscak, M., Orlicky, J., Zubor, V., and Hager, H. Alanine Aminotransferase in Bovine Brain: Purification and Properties *Journal of Neurochemistry* 9 (1) (1982) 210-216.
138. Saeedi SS, Karami B, Karami S, Shokrzadeh M. Evaluation of metal pollution in fish and water collected from Gorgan coast of the Caspian Sea, Iran. *Bull Environ Contam Toxicol.* (2012) 419-23.
139. Saier, M. H., and Jenkins, T. W. Enzymology: Purification And Properties Alanine Aminotransferase: I. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 91-100.
140. Sastre, M.P; Reyes, P; Ramos, H.; Romero, R; Rivera, J. Heavy metal bioaccumulation in Puerto Rican Blue Crabs *Callinectes* spp. *Bulletin of Marine Science*, 64(20) (1999) 209-217.
141. Schio L.; Chatreaux F.; Loyau V.; Murer M.; Ferreira A.; Mauvais P.; Bonnefoy A.; Klich, M. Fine Tuning of physico-chemical parameters to optimise a new series of novo biocin analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* (2001) 11(11):1461-4.
142. Schneider, M., and Chen, P. S. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 11 (1981) 657-672.
143. Schuwerack PM, Lewis JW. Cellular responses to increasing Cd concentrations in the freshwater crab *Potamonautes warren* harbouring microbial gill infestations. *Cell Tissue Res.* 313(3) (2003) 335-46.

144. Sherwin J,E, Sobenes JR. Liver function . *In*: Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical chemistry : theory, analysis, and correlation. St. Louis: Mosby, (1996) 514-516.
145. Shokrzadeh M, Shobi S, Attar H, Shayegan S, Payam SS, Ghorbani F. Effect of vitamins A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon . *Pak J Biol Sei.* (2012) 936-41.
146. Silva, R. Aspectos etnobiológicos, biológicos e viabilidade para o cultivo de larvas e juvenis em laboratório de *Cardisoma guanhumi* Latreille. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (2006).
147. Sousa, E.C.P.M. Toxicologia marinha: Histórico. *In*: Nascimento , I. A.; Sousa , E.C.P.M.; Nipper , M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
148. Souza, E. P. Distribuição, aspectos reprodutivos e morfométricos do caranguejo-uçá- *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) no Manguezal de Itacuruçá-Coroa Grande, Baía de Sepetiba. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Riode Janeiro (1999).
149. Souza, L.G.; Petriella, A.M. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Pa/aemonetes argentines* (Crustacea, Caridea). *Biocell.* (2000)189-195.
150. Souza , L.G.; Petriella, A .M. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentines* (Crustacea, Caridea) during moult. *Biocell* (2001) 275-281 .
151. Stanier, J.E; Woodhouse , M.A.; Griffin, R.L. The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (L.) (Decapoda Brachyura). *Crustaceana* (1968) 56-66.
152. Stanquevis , C.E., Furlan, A.C. , Marcato, S.M., Grieser, D.O., Zancanela , V, Euzébio, C.T ., Finco, E.M., Ferreira, M.F.Z. Concentrações séricas de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em codornas de corte suplementadas com diferentes níveis de vitaminas. V Simpósio Internacional e IV Congresso Brasileiro de Coturnicultura . Lavras, MG, 2013. Anais ...

153. Storch, V.; Lehnert-Moritz, K.. The effects of starvation on the hepatopancreas of the isopod *Ligia oceanica*. *Zoologischer Anzeiger* (1980)137-146.
154. Storch, V.; Janssen, H.H; Cases, E. The effects of starvation on the hepatopancreas of the coconut crab, *Birgus latro* (L.) (Crustacea, Decapoda). *Zoologischer Anzeiger* (1982). 115-123.
155. Sun, M.; Jiang K.; Zhang F.; Zhang D.; Shen A.; Jiang.M; M, Shen,X; Ma, L. Effects of various salinities on Na(+)-K(+)-ATPase, Hsp70 and Hsp90 expression profiles in juvenile mitten crabs *Eriocheir sinensis*. *Genet Mol Res.* 11(2) (2012) 978-86.
156. Tacon, A.G.J.; Hasan, M.R.; Metian, M. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO- Fisheries and Aquaculture Technical. Paper No. 564: 2011, 87*
a. pp.
157. Thakur, P. C; Stuckenholtz, Carsten; Rivera, M.R; Davison, Jon M; Yao, J.K; Amsterdam, A. Sadler; K.C; Bahary, N; Lack of *de novo* Phosphatidylinositol Synthesis Leads to Endoplasmic Reticulum Stress and Hepatic Steatosis in *cdipt*-Deficient Zebrafish. *Hepatology.* 54(2) (2011): 452-462.
158. Tkachenko H, Kurhaluk N. Pollution-induced oxidative stress and biochemical parameter alterations in the blood of white stork nestlings *Ciconia ciconia* from regions with different degrees of contamination in Poland. *J Environ Monit.* 14(12): (2012) 3182-91.
159. Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A.; Freitas-Neto A.G. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica.* 2a ed. Manole, São Paulo, 2003, 331 p.
160. Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-Aives VM, Mello-Silva CC, Maldonado A Jr, Pinheiro J, Rodrigues M de L. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res* 109(3) (2011) 885-91.
161. Valentin-Neto, P.A. Possíveis causas da mortalidade do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) no estuário do Rio

- Jaguaribe - Ceará. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, 2004, 78 p.
162. Veiga, L.F; Vital, N.A.A. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. *In*: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
 163. Vijayavel, K.; Balasubramanian, M.P. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in an estuarine edible crab *Scylla serrata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63(1) (2006) 141-147.
 164. Vogt, G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* (1994) 83-101.
 165. Weifen W .; Hong, L.; Changhu , X .; Jamil , K. Elimination of chloramphenicol , sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environment international.*, 30 (3) (2004): 367-373.
 166. WHO – World Health Organization – IPCS Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, 155, 1993.
 167. Wong SW, Leung PT, Djurisić AB, Leung KM. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms : influences of aggregate size and ion solubility. *Anal Bioanal Chem.* 396(2) (2010) 609-18..
 168. Wu X, Liu W, Gou X. Tissue-specific distribution and activity of glutathione S-transferases as biomarkers in bivalve shellfishes. *Water Environ Res.* 85(5) (2013) 404-10.
 169. Xuan, X.; Larsen A, Ikadai H, Tanaka T, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Toyoda Y, Suzuki N, Mikami T. Expression of *Babesia equi* Merozoite Antigen 1 in Insect Cells by Recombinant Baculovirus and Evaluation of Its Diagnostic Potential in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology* (2001)705-709.
 170. Zamboni, A.J; Costa, J.B. Teste de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando tanaidáceos. *In*: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.;

- Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
171. Zaroni, L.P. Testes de toxicidade com embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002, 262 p.
172. Zeng F, Tee C, Liu M, Sherry JP, Dixon B, Duncker BP, Bois NC. The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethynylsulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells. *Aquat Toxicol.* 146 (2013) 45-51.
173. Zhang, RQ, Ying GG, Su HC, Zhou LJ, Liu YS. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China. *J Environ Sei Health B.* 48(11) (2013) 999-1013.
174. Zheng X, Wang J, Haerry T., Wu AY, Martin J, O'Connor MB, Lee CH, Lee T. TGF-beta signaling activates steroid hormone receptor expression during neuronal remodeling in the *Drosophila brain*. *Cell.* (2003) 303-15.
175. Zlotowski P., Nakazato L., Dutra V., Barros S.S., Gimeno E.J., Gocks M., Colodel E.M; Driemeier D.. Glicogenose hereditária em bovinos Brahman no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* (2005) 210-214.