



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**METAIS PESADOS INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO TIPO
LACASES DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*?**

AMANDA LETÍCIA FLORENTINO MANDÚ BEZERRA

Serra Talhada – PE

2021

AMANDA LETÍCIA FLORENTINO MANDÚ BEZERRA

**METAIS PESADOS INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO TIPO
LACASES DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*?**

Monografia apresentada ao curso de Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

Serra Talhada – PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B574m BEZERRA, Amanda Letícia Florentino Mandú Bezerra
METAIS PESADOS INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO TIPO LACASES DO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei?: Estudo bioquímico da atividade enzimática de enzimas do tipo lacase / Amanda
Letícia Florentino Mandú Bezerra BEZERRA. - 2021.
56 f. : il.
- Orientador: Diego de Souza .
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2021.
1. cobre oxidases. 2. contaminantes. 3. hepatopâncreas. 4. metaloproteínas. 5. rejeitos do pescado. I.
, Diego de Souza, orient. II. Título

CDD 574

**METAIS PESADOS INTERFEREM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO TIPO
LACASES DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*?**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (ORIENTADOR)

UFRPE/UAST

Prof^a. Dr^a. Marina Marcuschi (2^o TITULAR)

Centro Universitário Brasileiro (UNIBRA)

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva (3^o TITULAR)

UFRPE/UAST

SERRA TALHADA-PE

2021

Dedico essa monografia a Deus, meus pais, amigos e incentivadores e ao professor Diego de Souza Buarque.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer e dedicar esta monografia às seguintes pessoas:

À Deus por todas as dádivas, coragem e ânimo, que me deste para passar por todos os momentos durante todo o percurso.

Aos meus pais Maristela Florentino e Carlos Mandú, ao meu irmão Carlos Junior, minha avó Maria Mandú e toda família, por todo apoio suporte e incentivo aos estudos. Tudo que hoje sou devo a vocês. Obrigada por tudo, vocês são meus pilares.

Ao meu professor Orientador, Diego Buarque por todo ensinamento, conselhos, esforço, paciência e dedicação.

Ao meu professor/supervisor Rogério Saraiva, pela colaboração com meu trabalho.

Aos professores, Plínio Pereira, Felipe Reis, Eduardo Ramos pela amizade e por toda ajuda/suporte em outros trabalhos de pesquisa durante a graduação.

Aos meus amigos e companheiros de sala de aula, Lucinda Andriele, Tatiane Lima, Allana Karyni, Maria Amanda, José Augusto, Maria da Saúde, Maria Luiza e Marcos Vinicius por todo suporte, cumplicidade, incentivo, paciência, compreensão e trabalho em equipe. Foi gratificante passar todo esse tempo com vocês, sentirei saudades de todos vocês, obrigado por todos momentos e lágrimas compartilhadas durante a graduação.

Aos meninos do laboratório Anderson e Felipe, pelos ensinamentos, risadas e distrações que foram de muita importância.

A Caio e toda equipe do LABENZ pelo apoio e ensinamentos durante os experimentos realizados no Laboratório de Enzimologia – Departamento de Bioquímica da UFPE

Ao Instituto Oceanário Pernambuco – Base Itamaracá e ao Professor Ricardo Gama Soares, por toda ajuda durante a minha graduação.

A todos os amigos estagiários que fiz na Base de Itamaracá, Larissa Santos, Danielle Viana, Luan Souza, Dênis Alves, Andrey Giordane, Thiago Andrade, Felipe Santos, Werverson Ailton, Ádamo Gabriel, Viviana Rivieri, Thamires Magalhães, vocês são demais.

Aos motoristas de condução de Princesa Isabel, Antônio Alves e Cláudio Bezerra pela paciência, disponibilidade e compromisso para levar-me da minha cidade sempre que necessário para cursar esta graduação em Serra Talhada.

Aos amigos que fiz no Grupo de Pesquisa em Epidemiologia, Eduarda Lucas, Ariane Susan, Andressa Nicácio e Denilma Lima, que sempre estiveram por perto para dar uma palavra amiga e de ânimo.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, pelo ensino gratuito e suporte para que eu pudesse concluir o curso.

A todos os funcionários da UAST.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu curso.

Muito Obrigada!!!

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. (Charles Chaplin).

RESUMO

Tem sido notória a contaminação de ambientes aquáticos com elementos químicos potencialmente tóxicos e compostos orgânicos (pesticidas, hidrocarbonetos, corantes etc.) devido à atividade industrial. Neste contexto, tem crescido o uso de rejeitos da carcinicultura como fontes de moléculas com aplicações em biorremediação, como as enzimas lacases, que apresentam atividade de degradação de diversos contaminantes como hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, pesticidas, corantes, entre outros. Entretanto tais contaminantes são descartados na água junto à elementos químicos potencialmente tóxicos e estes podem interferir na atividade enzimática de biorremediação de enzimas nos diversos contaminantes. Então, é importante entender se as enzimas permanecerão ativas mesmo na presença dos elementos químicos potencialmente tóxicos. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito destes elementos químicos potencialmente tóxicos em enzimas do tipo lacase em extratos brutos do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*. O efeito dos elementos químicos potencialmente tóxicos também foi evidenciado em metaloproteinases no mesmo extrato para entender se a presença destas enzimas interfere na interação dos elementos químicos potencialmente tóxicos com as lacases. Para a determinação do efeito dos metais potencialmente tóxicos (níquel, mercúrio, cobre, cádmio e zinco em concentrações entre 0,001 e 10 mM), os mesmos foram incubados (separadamente) com os extratos. Em seguida, foi verificada a atividade residual percentual das lacases e das metaloproteinases em comparação com um controle sem metais potencialmente tóxicos (100%). Nenhum dos metais potencialmente tóxicos entre 0,001 e 1 mM (concentração acima dos valores admissíveis) foi capaz de inibir as enzimas testadas. Além disso, o cloreto de níquel 10 mM também não foi capaz de inibir a atividade de lacases e de metaloproteinases. Por outro lado, cloreto de mercúrio, de cobre e de cádmio 10 mM foram capazes de aumentar significativamente a atividade das lacases, enquanto que cloreto de mercúrio e de cobre inibiram as metaloproteinases. Já o sulfato de zinco 10 mM inibiu tanto as lacases quanto as metaloproteinases. Portanto, conclui-se que a maioria dos metais potencialmente tóxicos testados foi capaz de interferir na atividade de enzimas do tipo lacase no extrato de hepatopâncreas de *L. vannamei*.

Palavras-chave: cobre oxidases, contaminantes, hepatopâncreas, metaloproteinases, rejeitos do pescado.

ABSTRACT

The contamination of aquatic environments with potentially toxic chemical elements and organic compounds (pesticides, hydrocarbons, dyes, etc.) has been notorious due to the industrial activity. In such a context, there has been an increase regarding the use of shrimp farming residues as sources of molecules with applications in bioremediation, such as laccase enzymes, which present a degradation activity of various contaminants such as aromatic hydrocarbons, phenols, pesticides, dyes, among others. However, such contaminants are discarded in water along with potentially toxic chemical elements and these can interfere in the enzymatic activity of enzyme bioremediation in such a variety of contaminants. Then, it is important to understand whether the enzymes will remain active even with the presence of potentially toxic chemical elements. Consequently, this work aims to evaluate the effect of potentially toxic chemical elements on laccase enzymes from the crude extracts from the shrimp *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas. The effect of metals was also evidenced in metalloproteinases in the same extract to understand whether the presence of these enzymes interfere on the interaction of metals with laccases. To determine the effect of the potentially toxic metals (nickel, mercury, copper, cadmium and zinc in concentrations between 0.001 and 10 mM), they were incubated (separately) with the extracts. Subsequently, the percentage of the residual activity of laccases and metalloproteinases was verified compared with a control without potentially toxic metals (100%). None of the potentially toxic metals between 0.001 and 1 mM (concentration above the allowable values) were able to inhibit the tested enzymes. Furthermore, 10 mM of nickel chloride also were not able to inhibit the activity of laccases and metalloproteinases. On the other hand, the 10 mM chlorides of mercury, copper and cadmium were able to significantly increase laccase's activity, while chlorides of mercury and copper inhibited metalloproteinases. In its turn, the 10 mM zinc sulfate inhibited both laccases and metalloproteinases. Therefore, it is concluded that the majority of the tested potentially toxic metals were able to interfere in the laccase enzymes activity in the extract of hepatopancreas from *L. vannamei*.

Keywords: copper oxidases, contaminants, hepatopancreas, metalloproteinases, fish waste.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Anatomia interna de camarões peneídeos *Litopenaeus vannamei*.....23
- Figura 2:** Sistema ativador da pró-fenoloxidase (proPO) de artrópode.....25
- Figura 3:** Ciclo catalítico da enzima lacase mostrando a redução de um oxigênio molecular à duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres.....26
- Figura 4:** Análise da sequência de aminoácidos predita de lacase de *L. Vannamei*.....27
- Figura 5:** Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de níquel (NiCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM).....33
- Figura 6:** Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de mercúrio (HgCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM).....35
- Figura 7:** Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de cobre (CuCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM).....36
- Figura 8:** Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de cádmio (NiCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM).....37
- Figura 9:** Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metloproteinase (B) mediante incubação com sulfato de zinco (ZnSO_4) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM).....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de Soro Bovino
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases
PO	Pró-fenoloxidase
POs	Fenoloxidasas
ppm	Partes por milhão
proPO	Sistema pró-fenoloxidase
sp	Espécie
TLCK	Tosil Lisina Clorometil Cetona
TPCK	Tosil Fenilalanina Clorometil Cetona

LISTA DE SIMBOLOS

$\mu\text{g/L}$	Micrograma por litro
μL	Microlitro
A_{nm}	Valor da absorvância em nanometro
As	Arsênio
Cd	Cadmio
CdCl_2	Cloreto de cadmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CuCl_2	Cloreto de cobre
Fe	Ferro
g/cm^3	Grama por centímetro cúbico
ha	Hectare
Hg	Mercúrio
HgCl_2	Cloreto de Mercúrio
Kg	Quilograma
L	Litro
mg	miligrama
mg/ml	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
NaCl	Cloreto de sódio
Ni	Níquel
NiCl_2	Cloreto de Níquel
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
Pb	Chumbo
Zn	Zinco
ZnSO_4	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Impacto da atividade industrial.....	15
2.2 Elementos químicos potencialmente tóxicos.....	16
2.2.1 Níquel.....	18
2.2.2 Mercúrio.....	18
2.2.3 Cobre.....	19
2.2.4 Cadmio.....	20
2.2.5 Zinco.....	21
2.3 <i>Litopenaeus vannamei</i> e reaproveitamento de rejeitos de indústrias pesqueiras	22
2.4 Lacases.....	24
3. OBJETIVO	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Preparação dos extratos brutos.....	29
4.2 Determinação da atividade das lacases.....	29
4.3 Determinação da atividade das metaloproteinases.....	30
4.4 Efeito de elementos químicos potencialmente tóxicos.....	30
4.5 Análise estatística.....	30

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Niquel.....	32
5.2 Mercurio.....	33
5.3 Cobre.....	35
5.4 cadmio.....	36
5.5 Zinco	37
6.CONCLUSÕES.....	39
7.REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos estão sujeitos à influência de inúmeros fatores ambientais resultantes dos ritmos diários e sazonais característicos dos ecossistemas costeiros e estuarinos, além do estresse decorrente de atividades antrópicas. Estes são fatores determinantes para a contaminação e prevalência das doenças em organismos aquáticos, os quais estão em estreita relação com o ambiente em que vivem (LE MOULLAC, HAFFNER, 2000).

Dentre as atividades antrópicas que causam prejuízos ao meio ambiente, destacam-se o acúmulo de metais potencialmente tóxicos, principalmente despejados por diversos tipos de indústria (LUNA-ACOSTA *et al*, 2017). Neste contexto, observa-se que indústrias como a têxtil e a petrolífera, dentre outras, representam uma importante fonte de contaminantes inorgânicos (metais potencialmente tóxicos) e orgânicos (pesticidas, hidrocarbonetos, corantes etc.) no ambiente aquático (GIORDANO, 2004).

Para a biorremediação de diversos contaminantes, tem-se testado o uso de moléculas provenientes de rejeitos do pescado, os quais também são descartados no meio ambiente de forma inadequada (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2016). Assim, o uso dos subprodutos da indústria pesqueira contribui para a diminuição do impacto ambiental e para a obtenção de moléculas com aplicações biotecnológicas (CAHU *et al.*, 2012).

Dentre as partes descartadas de camarões, o hepatopâncreas é um órgão que está presente na cabeça e que é fonte de diversas biomoléculas. Esse é o órgão digestivo do camarão, de forma que contém diversas enzimas que podem ser utilizadas com aplicações biotecnológicas (BUARQUE *et al.*, 2009). Apesar de conter em grande parte enzimas do sistema digestivo, tem sido relatado que o hepatopâncreas pode também ter enzimas com outras funções ligadas ao sistema imune destes organismos (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Dentro do contexto apresentado, vem sendo estudado no hepatopâncreas o uso das enzimas do sistema das profenoloxidasas no sistema imune (BARRETO, 2020). Este sistema apresenta importante função na defesa imune de camarões (PERAZZOLO, BARRACCO, 1997). Sua ativação em fenoloxidasas inicia uma sucessão de eventos proteolíticos que culminam na melanização de patógenos invasores, sendo este processo um dos mais importantes para o sistema imune de

crustáceos (CERENIUS, *et al.*, 2010; EKASARI, *et al.*, 2014). Essas enzimas são divididas em catecol oxidases, lacases e tirosinases (BRIS, *et al.*, 2016).

A maior parte dos trabalhos publicados sobre a atividade de fenoloxidasas em crustáceos está focada nos papéis dessas enzimas nos mecanismos de defesa imunológica (POPE, *et al.*, 2011; LIN, *et al.*, 2013). No entanto, tem sido sugerida uma relevância ecológica para as fenoloxidasas, especialmente as lacases, como biorremediadores para poluentes de ambientes aquáticos (KHALILI, 2016). Assim, torna-se importante a caracterização das lacases de crustáceos como forma de produzir um meio de degradação dos contaminantes de poluição ambiental por meio de resíduos de reaproveitamento de indústrias pesqueiras.

Neste contexto, para que as lacases possam exercer seu efeito na degradação de contaminantes (pesticidas, hidrocarbonetos, corantes etc.) é necessário que elas não sejam inibidas pelos metais potencialmente tóxicos que são descartados junto aos compostos tóxicos. Por isso, é necessário testar se diversos metais potencialmente tóxicos são capazes de inibir as lacases para possibilitar as aplicações de biorremediação dessas enzimas.

O presente trabalho estudou o efeito dos metais potencialmente tóxicos nas enzimas do tipo lacases em extratos de hepatopâncreas de camarão. Como os extratos são fontes de diversas enzimas, também foi necessário caracterizar o efeito dos metais potencialmente tóxicos na atividade de enzimas do tipo metaloproteinase, as quais também podem sofrer a ação destes metais (GOMIS-RÜTH *et al.*, 1994). Portanto, o estudo com as metaloproteinases serviu para entender se a presença destas enzimas interferiu na interação dos metais com as lacases.

Diante disso, foi estudado o efeito de metais potencialmente tóxicos em enzimas do tipo lacase e metaloproteinase do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*, o qual representa a principal espécie de camarão cultivada no Brasil e uma das principais fontes de descarte inadequado de rejeitos da indústria pesqueira no meio ambiente (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002).

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Impacto ambiental da atividade industrial

As atividades antrópicas têm causado vários prejuízos ao meio, destacando-se o impacto da atividade industrial. Os danos causados ao meio ambiente pelo descarte

de compostos xenobióticos prejudicam as atividades decorrentes de um ecossistema sadio, como a rentabilidade decorrente do turismo e do uso sustentável dos recursos naturais (FANDÉ e PEREIRA, 2014; MICHELIN, 2006). Neste contexto, indústrias como a têxtil e a petrolífera apresentam um grande potencial econômico, mas podem gerar danos pela liberação de corantes e de petróleo ao ambiente aquático (KENNISH, 1991).

Mediante o exposto, um grande desastre ambiental causou o derramamento de óleo proveniente de petróleo em praias do Nordeste (ARAÚJO *et al.*, 2020). Esse desastre está levando um prejuízo sem precedentes aos ecossistemas aquáticos. A estimativa é de que esse derramamento de petróleo gere prejuízos durante décadas e que mesmo com a retirada do óleo, os seus subprodutos tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ainda persistam no ambiente aquático (UCHOA, 2019).

Outro exemplo é a indústria têxtil, que merece ênfase por ser responsável por um grande volume de efluentes lançados no meio ambiente (LI *et al.*, 2020; GIORDANO, 2004). Os efluentes têxteis são caracterizados por serem extremamente coloridos, visto que possuem corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento (ZHUO *et al.*, 2019). Isto leva à poluição dos corpos d'água pelos corantes reativos, os quais alteram os ciclos biológicos e causam prejuízos ambientais. Estudos revelam que os azocorantes podem causar mutações e podem ser carcinogênicos (JESUS, 2005).

Além disso, resíduos de diversos tipos de indústria descartados na água, costumam estar associados a metais potencialmente tóxicos (ALENCAR *et al.*, 2016). Isto potencializa os efeitos danosos desses resíduos, visto que os metais também podem ser bastante tóxicos, apresentando efeitos como o carcinogênico. Os metais potencialmente tóxicos podem se acumular em organismos aquáticos causando um desequilíbrio ecológico. Além disso, os seres humanos podem se intoxicar com os metais potencialmente tóxicos ao consumirem esses animais (SMITH, SCHINDLER, 2009).

2.2 Elementos químicos potencialmente tóxico

Os metais potencialmente tóxicos trazem preocupação devida a elevada resistência a degradação e ao potencial de bioacumulação no sistema aquático (IKEM

et al., 2003; MORAES e JORDÃO, 2002; AHMAD et al., 2014), antigamente associava-se o efeito tóxico a densidade destes metais, caracterizando como metal pesado aos que apresentam densidade maior que 5g/cm³ ou com número atômico maior que 20 (MALAVOLTA, 1994). Entretanto a densidade contribui pouco para a previsão dos efeitos biológicos dos metais potencialmente tóxicos, uma vez que não apresenta grande importância em relação à reatividade de um metal, deste modo o termo metal pesado não foi empregado neste estudo mediante ser bastante impreciso em relação a classificação de metais em toxicidade ou ecotoxicidade (DUFFUS, 2002). Deste modo embora o termo metal pesado seja bastante utilizado em trabalhos de toxicidade ou ecotoxicidade, preferiu-se utilizar neste estudo o termo elementos potencialmente tóxicos e metais potencialmente tóxicos, devido as limitações anteriormente descritas do termo frequentemente utilizado.

Uma característica que estes metais potencialmente tóxicos possuem é o aspecto brilhante, além de serem bons condutores e normalmente participarem de reações químicas com íons enzimáticos positivos durante o metabolismo (LEE *et al.*, 1985; MENESES, 2008). Dentre os metais que mais se destacam pode-se citar o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn) (CANLI; ATLI, 2003; COSTA; HARTZ, 2009; CUI *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 1999; GOMES; SATO, 2011; IKEM *et al.*, 2003; LIMA JR. *et al.*, 2002; MUTO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2010; YI *et al.*, 2008, 2011; YI; ZHANG, 2012).

Atualmente, uma das grandes preocupações ecológicas refere-se ao impacto ambiental causado pela liberação de elementos químicos potencialmente tóxicos nos diversos ambientes naturais, provenientes dos efluentes industriais, mineração e das lavouras (AGUIAR, 2002).

Mesmo em baixa concentração (valores abaixo da permitida pela legislação para cada metal potencialmente tóxico), os cátions de metais sofrem o efeito de Ampliação Biológica, em virtude desses compostos não integrarem o ciclo metabólico dos organismos vivos, sendo assim armazenados e ampliados pela biomagnificação nos tecidos dos seres vivos que integram a cadeia alimentar do ecossistema (VIRGA, 2007). Os metais potencialmente tóxicos podem alterar as estruturas celulares, as

enzimas e substituírem co-fatores importantes para as atividades enzimáticas (MINDELL, 1996). Alguns desses metais são descritos abaixo.

2.2.1 Níquel

O níquel corresponde a um elemento químico com o símbolo Ni, número atômico 28, massa atômica 58,7 u e densidade $8,9 \text{ g.cm}^{-3}$ (DE CASTRO, 2006). A maior parte da produção de níquel no mundo é usada para fazer ligas, tais como aço inoxidável para processamento e construção de metal e para aviação, ligas de cobre-níquel para cunhagem, ligas de cromo-níquel para louças, ligas de ferro-níquel para ímãs, cobre-níquel-zinco (prata alemã), usadas para decoração e utensílios domésticos entre outros (LINS, 2003).

A introdução de níquel no meio ambiente é feita a partir de fontes naturais e de origem humana (HUGHES *et al*, 1995), circula em cada compartimento através de processos físicos, químicos e biológicos (LAUWERYS, 2001). O níquel proveniente de diversos processos industriais e de outras origens produzirá águas residuais, pois são geradas pelo tratamento prévio na estação de tratamento de águas residuais, sendo estas descartadas no oceano (HRUDEY, 1985; CARVALHO, 2000). De acordo com os dados disponíveis, a estação de tratamento de águas residuais contém aproximadamente 0,2 mg de níquel/L (CARVALHO, 2000).

A toxicidade do níquel para invertebrados aquáticos varia consideravelmente de acordo com as espécies e fatores abióticos (CALLEJA *et al*, 1992; CAIRNES JR, 1988). Os compostos de níquel liberados através de efluentes contaminados apresentam diversas implicações ambientais pois possuem a capacidade de ser bioacumulativo e, portanto, potencialmente perigoso para os organismos aquáticos, podendo promover alterações a nível da cadeia trófica e conseqüentemente levar a impactos negativos no meio ambiente (BATISTA, 2012)

2.2.2 Mercúrio

O mercúrio (Hg), elemento de número atômico 80, massa atômica 200,59 u e densidade $13,579 \text{ g/cm}^3$ (UNESP, 2015), têm despertado o interesse da comunidade científica por conta de seu elevado potencial tóxico, uma vez que corresponde há um

elemento químico considerado não essencial a qualquer processo metabólico, e dessa forma, é facilmente acumulado na maioria dos organismos (KISAKA, 2013).

Industrialmente, o mercúrio possuía grande aplicação, para a confecção de termômetros, amalgamas odontológicas, lâmpadas fluorescentes e interruptores elétricos (CETESB, 2012; COSTA, 2014), entretanto a ANVISA em março de 2017 proibiu o seu uso em serviços de saúde, de dispositivos de medição, tais como termômetros e esfigmomanômetros, além de que em setembro do mesmo ano proibiu também o uso do mercúrio e do pó metálicos para confecção de amálgama em serviços de odontologia, exceto quando contidos em cápsulas pré-dosadas.

Diversos estudos desenvolvidos no Brasil com relação ao mercúrio apontam a atividade garimpeira como principal responsável pela contaminação do meio ambiente (KISAKA, 2013; CALHEIROS e FERREIRA, 1996), além dos polos industriais e petroquímicos (OLIVEIRA, 2007)

Por meio do garimpo o principal metal potencialmente tóxico liberado é o mercúrio, pois seu uso no beneficiamento do ouro é imprescindível para captura e retenção deste elemento, formando a amálgama. Neste processo, uma parte do mercúrio vai para a atmosfera e retorna para os rios pela chuva. Os outros 10% são despejados diretamente nos corpos d'água (BONUMÁ, 2006; CESAR *et al.*, 2009; DESCHAMPS *et al.*, 2010; HALBACH *et al.*, 1998; LIMA, 1993; SOUZA *et al.*, 2008).

A forma química mais tóxica do mercúrio tem sido identificada como a do metilmercúrio (KITAHARA, *et al.* 2000). O mercúrio é transformado em metilmercúrio por ação de bactérias e em seguida os organismos aquáticos (normalmente os peixes) absorvem o metilmercúrio da água e, também, pela ingestão de outros organismos aquáticos (LACERDA; MALM; 2008). Mesmo em regiões com níveis normais de mercúrio na água, podem ser observados níveis altos de mercúrio nos organismos aquáticos, pois ao ser incorporado na cadeia trófica, o mercúrio é biomagnificado e bioacumulado, devido a sua longa meia-vida nos organismos (PETERSON, 1973).

2.2.3 Cobre

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu, número atômico 29, massa atômica 63,54 u e densidade 8.93 g/cm³ (LOZANO, 2016). Embora diversos organismos utilizem o cobre, acabam sendo bastante afetados quando expostos a quantidades elevadas deste metal. Dentre os diversos locais com contaminação por

este metal, pode-se destacar as áreas de viticultura pelo qual é bastante degradado pela intensa aplicação de produtos agrícolas que contem este metal em sua composição. Outro meio de enorme poder de contaminação e de grande risco a saúde dos seres vivos são as áreas de rejeito a mineração por conter altas concentrações de cobre e que se torna um potencial poluidor das áreas próximas a estes locais de mineração (ANDREAZZA, 2013).

O cobre é particularmente importante para o equilíbrio do sistema aquático e pode colocar em perigo a vida de organismos que vivem nesse ecossistema. Embora o cobre seja considerado um oligoelemento básico para certas atividades celulares em comunidades aquáticas, esse metal pode se tornar tóxico, podendo gerar morte ou estresse subletal, reduzindo assim a eficácia dos organismos aquáticos em seu habitat (MAZON *et al.*, 2000). Este efeito tóxico do cobre varia muito entre os diferentes organismos, pois depende da sensibilidade à exposição e de diversos fatores tais como o estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, atividade, ciclo de reprodução e estado nutricional (PELGROM, 1994).

A toxicidade desse elemento para organismos aquáticos é medida por meio da quantidade de concentração de íons livres ou de ligações com os grupos dos carbonatos, nitratos, sulfatos, cloretos, nitrogênio amoniacal, hidróxidos e materiais orgânicos, como os ácidos húmicos. Esta toxicidade pode ser influenciada ainda pelas características físicas e químicas da água (MAZON *et al.*, 2000).

Muitas vezes o cobre afeta a atividade das biomoléculas de organismos aquáticos. Alterações na atividade da fosfatase ácida foram descritas por Rajalakshmi e Mohandas (2005) em bivalve *Lamellidens corrianus* quando expostos a altas concentrações de cobre, com resposta maior em brânquias quando comparada ao hepatopâncreas. Peixes da espécie *Esomus danricus*, demonstraram alterações comportamentais como perda no equilíbrio, natação errática e agrupamento dos indivíduos. Além disso, foi constatada a inibição das enzimas da defesa antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase, resultados estes que demonstram riscos aos organismos aquáticos expostos a este metal (VUTUKURU *et al.* 2006).

2.2.4 Cádmi

O cádmio é um elemento químico de símbolo Cd de número atômico 48, de massa atômica igual a 112,4 u e densidade 8,7 g.cm⁻³ (DE CASTRO, 2006). Desde

1940, o uso generalizado de baterias de cádmio aumentou muito a poluição ambiental causada por este metal. Outros usos industriais do Cádmio são a fabricação de pigmentos, a fabricação de reagentes plásticos, a fabricação de solda e placas de circuito eletrônico e a produção de fertilizantes (GUIMARÃES, 2008). Tal elemento não é considerado essencial para as atividades fisiológicas, e tem sido classificado como tóxico para diferentes grupos de organismos, em diferentes níveis tróficos (GAUTAM, *et al.*, 2014).

O cádmio é encontrado em pequenas quantidades na natureza. Entretanto, estudos demonstram malefícios aos organismos quando expostos a este metal, como por exemplo, por interferir diretamente no sistema de defesa antioxidante dos bivalves marinhos, conforme demonstrado por Company *et al.* (2009) em *Bathymodiolus azoricus*. Além disso, mesmo em baixas concentrações, abaixo do permitido pela legislação (na ordem de $\mu\text{g/L}$), destacase que o cádmio apresenta efeitos toxicológicos sobre espécies de peixes (EIFAC, 1977).

2.2.5 Zinco

O Zinco (Zn) é o metal de número atômico 30 com massa atômica 65,4 u, densidade $7,14 \text{ g/cm}^{-3}$ (MAPELLI, 2017) e o 23º elemento mais abundante na Terra, sendo encontrado em praticamente todos os ambientes (CHANEY, 1993, BROADLEY *et al.* 2007). Esse elemento é um micronutriente essencial para os organismos, por ser um componente estrutural de muitas proteínas, além de ser particularmente indispensável para o crescimento das plantas (CHANEY, 1993, LI *et al.* 2002). No entanto, em altas concentrações, acima dos valores permitidos para descarte em efluentes, esse metal é potencialmente tóxico (LI *et al.* 2002).

O zinco é um metal de larga utilização nas indústrias de galvanização e aço, devido às suas propriedades químicas e metalúrgicas (LINS, 2003). Também é usado como catalisador na vulcanização de borrachas sintéticas e naturais, óxido de zinco nas indústrias farmacêuticas, agrícola e de cosméticos, na forma de pó de zinco como tintura na indústria têxtil e como agente precipitante de prata e ouro, em soluções de cianeto. (LINS, 2008). Outros compostos de zinco, tais como o estearato de zinco e palmitato de zinco são detergentes usados para estabilizar plásticos e como agentes secantes de tintas (LINS, 2008)

Atualmente, a toxicidade advém de atividades de mineração e fundição em solos agrícolas tratados com lodo de esgoto que ocorre porque são materiais

orgânicos ricos em nutrientes com potencial para o uso agrícola, especialmente em solos de pH baixo, onde o metal é melhor absorvido (BROADLEY *et al.* 2007). Grandes quantidades de zinco entram no ambiente como resultados de atividades antropogênicas como a mineração, purificação do zinco, produção de aço e queima de carvão e lixo. O lixo de indústrias químicas que utilizam o zinco, os esgotos domésticos e as correntes de água pluvial de solos transportam esse metal e contaminam o ambiente aquático (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

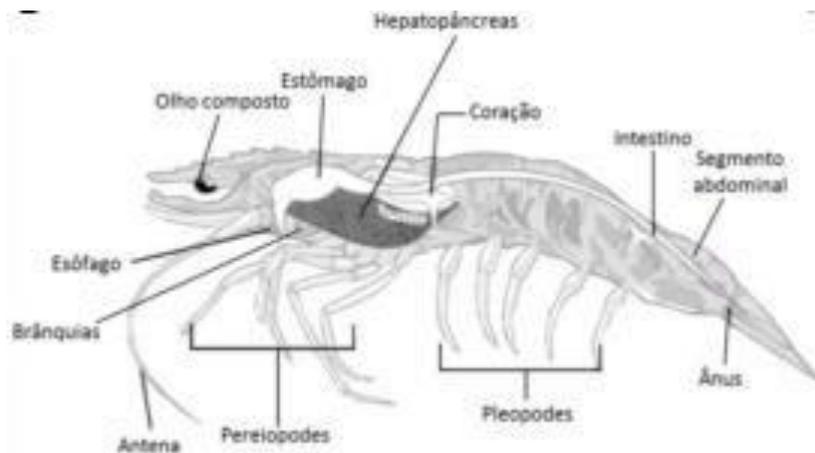
2.3 *Litopenaeus vannamei* e reaproveitamento de rejeitos da indústria pesqueira

Mediante os efeitos causados pelos contaminantes ambientais, medidas são necessárias para a biorremediação de ecossistemas aquáticos afetados. Dentro desse contexto, tem crescido o uso de rejeitos do cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, cujos subprodutos representam fontes de diversas moléculas com aplicações de biorremediação (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2016)

Uma das espécies de camarão mais cultivadas no mundo sob condições controladas até hoje é o *Litopenaeus vannamei* (Figura 1) (GAXIOLA, 2006; VALENTIM NETO, 2011; QUISPE GASPAS, 2013), sendo assim uma das espécies melhor sucedidas internacionalmente na aquicultura (OZÓRIO, 2013). De acordo com as estatísticas da FAO mostram que a produção total cultivada de *L. vannamei* aumentou continuamente de 8.000 toneladas em 1980 para 194.000 toneladas em 1998, em que no Brasil as fazendas de camarão começaram a operar na década de 1980, mas foi somente a partir de 1995, com a introdução do *L. vannamei*, que o setor passou por um período de rápido desenvolvimento. No ano de 2003, a produção brasileira total deste camarão atingiu 90.190 toneladas produzidas em 14.824 ha de viveiros de camarão. Em alguns Estados, a produtividade atingiu 8.700 kg / ha / ano com os melhores rendimentos obtidos na região Nordeste, que foi responsável por 95,2% da produção nacional total de camarão em 2003. O *L. vannamei*, também é conhecido como “Camarão Branco do Pacífico, Camarão Cinza ou Camarão de patas Brancas”, corresponde a uma espécie exótica no litoral brasileiro (NUNES, MARTINS 2002; MATOS, 2015).

Figura 1: Anatomia interna de camarões peneídeos *Litopenaeus vannamei*

Fonte: adaptado de Quispe Gaspar (2013)



O cultivo desta espécie, cuja tecnologia de reprodução e engorda já está em grande parte consolidada, tem contribuído de modo significativo para o desenvolvimento da carcinicultura marinha brasileira (MOSER, 2005). A preferência pelo cultivo deste peneídeo está associada a uma gama de fatores de boa adaptação como: alta taxa de crescimento dos indivíduos, tolerância a estocagem em grandes densidades, dieta com baixas necessidades de proteínas, grande sobrevivência na larvicultura, boa aceitação das pós larvas a rações e tolerância a uma ampla variação na salinidade da água (COSTA *et al.*, 2006; GAMBOA-DELGADO, 2003), curta duração dos ciclos de cultivo, além da boa aceitação dos mercados internacionais e altos preços do produto (NUNES, MARTINS, GESTEIRA, 2004; BRIGGS *et al.*, 2004; MOSER, 2005).

Pela grande exploração do cultivo de *L. vannamei*, uma grande quantidade de rejeitos é gerada, sendo também descartada no meio ambiente. Dentro deste contexto, os rejeitos do pescado correspondem a aproximadamente 50% do peso do animal, o que também leva à poluição ambiental por descarte em locais inadequados (SANTOS *et al.*, 2012). No entanto, estes subprodutos da indústria pesqueira podem ser reaproveitados para produzir moléculas de interesse biotecnológico (CAHU *et al.*, 2012).

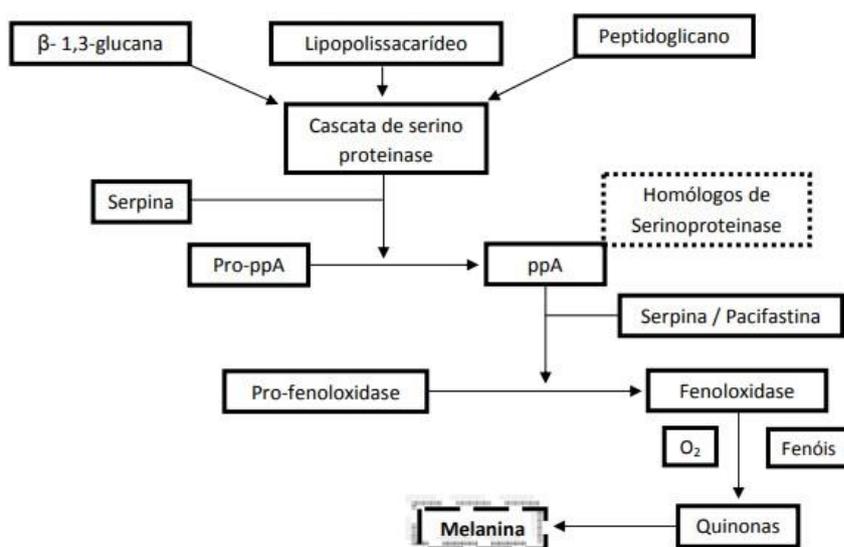
Os subprodutos descartados incluem cabeças, caudas, carapaças e hepatopâncreas (CAHU *et al.*, 2012). Este último merece destaque visto que é um órgão que é fonte de várias biomoléculas com aplicações biotecnológicas. O hepatopâncreas (retirado da cabeça dos camarões) é um órgão que é fonte de enzimas digestivas e de detoxificação (BUARQUE *et al.*, 2009).

Dentro desse contexto, tem sido estudado no hepatopâncreas do *L. vannamei* atividade das lacases (BARRETO, 2020), as quais são enzimas detoxificantes do tipo cobre oxidases (RIVA, 2006). Essas enzimas são muito caracterizadas em fungos e bactérias (JIANG et al., 2014; LI et al., 2014) e, nos últimos anos, sua atividade tem sido também descoberta em organismos aquáticos (THEERACHAT et al., 2019). Isto reforça o potencial do reaproveitamento dos subprodutos da indústria pesqueira como fonte de biomoléculas para combate aos danos ambientais.

2.4 Lacases

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que fazem parte do sistema das prófenoloxidasas, um tipo de resposta imune muito importante em camarões (SHI *et al.*, 2017). As fenoloxidasas (POs) correspondem a uma família de enzimas, incluindo tirosinases, catecolases e lacases, que desempenham um papel bastante importante nas defesas imunológicas de vários invertebrados (SHI, *et al.*, 2017). Essas enzimas são oxidoreduases que catalisam duas reações sucessivas: a primeira de hidroxilação de um monofenol a difenol e a segunda de oxidação do difenol a quinona. Por meio da produção de o-quinonas ocorre a síntese de melanina por meio de uma cascata de reações e tal produção de quinonas leva também a esclerotização da cutícula (CERENIUS; SODERHALL, 2004; BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Na Figura 2 é possível visualizar como acontece essa cascata de reações por um reconhecimento proteico, ao qual é proposto que seja regulado por meio de inibidores de proteases específicos (CERENIUS e SODERHALL, 2004; SOARES, 2011; FRANSSENS, 2008).

Figura 2: Sistema ativador da pró-fenoloxidase (proPO) de artrópodes. (SOARES, 2011)



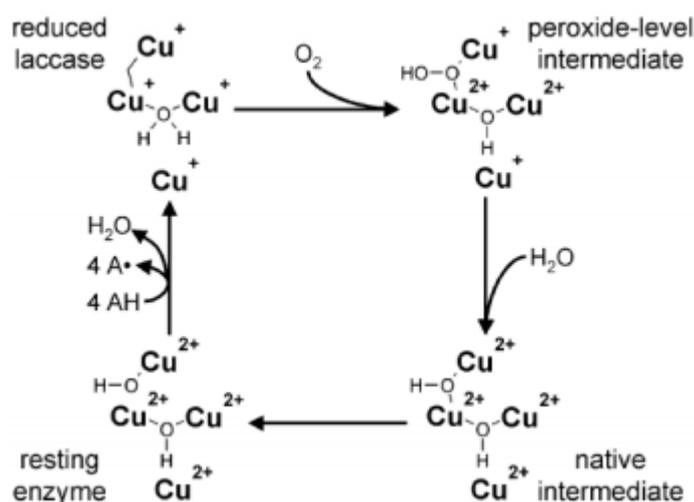
Como papel imunológico o sistema proPO, gera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres, uma vez que ocorre consumo de oxigênio molecular e que leva a destruição dos patógenos invasores (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Para minimizar os efeitos deletérios destes radicais livres, o pigmento escuro e insolúvel melanina atua como potente processo imunodefensor (NAPPI; VASS, 1993). Dentre as fenoloxidases, as lacases parecem ser as enzimas mais abundantes em peneídeos (BRIS *et al.*, 2016).

As lacases são enzimas que catalisam uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, por abstração de quatro elétrons com concomitante redução de oxigênio para água. Estes substratos incluem mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas (DURÁN, ROSA, D'ANNIBALE, GIANFREDA, 2002), além da variedade de compostos fenólicos e aromáticos (SHLEEV *et al.*, 2009), atuam também em alguns íons inorgânicos presentes em metais (BINOD *et al.*, 2011) e presentes também em alguns corantes (JADHAV, SINGHAL, 2013)

A lacase foi descoberta nos exsudatos da árvore japonesa produtora de verniz *Rhus vernicifera* e posteriormente foi encontrada em fungos e algumas espécies de bactérias, insetos e crustáceos (COLLINS, DOBSON, 1997; MAJEAU *et al.*, 2010). Essa enzima é uma multi-cobre oxidase, cujo sítio ativo inclui quatro íons cobre. O cobre tipo I age como doador de elétrons de fenóis e amidas substituídas (substratos típicos), enquanto o cobre tipo II transfere elétrons para o receptor final, di-oxigênio, o

qual é reduzido à água. Já os dois íons cobre tipo III agem como intermediários da transferência de elétrons (RIVA, 2006).

Figura 3: Ciclo catalítico da enzima lacase mostrando a redução de um oxigênio molecular à duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres. *Fonte:* adaptado de WESENBERG et al., 2003



Por meio da análise da sequência de aminoácidos predita de uma lacase de *L. vannamei* é possível caracterizar esta enzima ao observar os domínios Cu-oxidase (Figura 3). Esses domínios Cu-oxidase apresentam dez resíduos de histidina conservados, uma cisteína e um resíduo de metionina, os quais são importantes para ligação de íons cobre (SHI, 2017).

Figura 4: Análise da sequência de aminoácidos predita de lacase de *L. vannamei*. Os domínios Cu-oxidase são sombreados por cinza claro e, entre esses domínios, as 10 histidinas, 1 cisteína e 1 metionina que se prevê que se ligue ao cobre estão destacadas em amarelo. *Fonte:* adaptado de Shi *et al.* (2017).

M A V A C Q C S A V C A A T M

gaggagcctgaacggggtagecgcgtggcgggtatataaaggcgtgATGGCGGTGGCGTGCAGTGTAGTGTCTGTGCGCAACCA
 V A L V L A A A I A T L T S V I T A Q E P P T A G S N **C Y R**
 TGGTGGCTCTTGTCTAGCAGCGCCATAGCGACTCTCACTTCTGTGCATAACCGCACAGGAACCTCTACAGCAGGTTCGAAGTGTACC
K C V P G D R R L C H F T F E Y H P Y Q T M S R A C H N C P
 GAAAATGCGTTOCTGGGACAGGAGGCTCTGCCACTTCAOCTTCGAGGTCCATCCTTATCAGACTATGTCCAGGGCGTGCACAAGTCC
 R N A S D C S L P D C V P G D G V Q R R I I A I N K Q M P G
 CAAGAAATGCGTCTGACTGCTCTACCGACTGCGTCCCGGTGACGGCGTGAACGGAGAATCATCGCTATCAACAACAGATGCCAG
 P P I Q V C E G D T I V V D V K N L L P D G G L T V **H W H** G
 GACCTCCTATTAGGTATGTGAAGGAGACAGATCGTCTGATGTGAAGAACCCTCTTCCGACGGCGCTTGACAGTCCACTGGCAGC
 L T M L G G I R D G I Q Y P S T P H M D G T P G I T Q C P I
 GCTTGACAATGCTCGGGGAATCCGGATGGCATCCAATACCGAGCACGCCACATGGATGGCACTCCGGGTATCAGCAGTGCACCA
 H F G G S F R Y T F Y A L N P G T H W Y **H A H** T G F H R A D
 TCCACTTCGGGGCTCGTTCAGATACACCTTCTACGCCCTAATCCTGGGACCCACTGGTATCAGGCCATACAGGATTCACCGCGCGG
 G V L G A I V I R Q P P G K D H A T G L Y D Y D L P Q H T M
 ACGGTGCTCTCGAGCCATCGTCATCCGTCAGCCACCGGGGANGGACCACGGCAGGGCCTCTACGACTACGATCTGCCGACGACACGA
 V I H D W L H M P T E D K F V L R H H G G G D D F P E S M L
 TGGTATCCAGACTGGCTACACATGCCCACTGAGGATAAATTCGTGTTGAGACACCATGGCGGGCGGACGACTTCCCGGAATCCATGT
 I N G L G P H Q N I A A T P T S A A M P Y K R F K V S P G A
 TGATCAACGGACTCGGACCCACCAGAATATCGCCGCCACCCCACTTCTGCCCATGCCTTACAGGGTTCAAGGTGTCCGACAGGAG
 R Y R F R I I N T G I L N C P I T V H I D E H Q L T V I A T
 CGAGGTACCGTTCCGCATCAACACGGGCATCCTCAACTGTCCCATCACAGTCCACATCGACGAGCACCAACTTACCGTTATCCGGA
 D G N P V V P T N A S S V V V Y S G E R W D V I V K T E N T
 CAGATGGTAACCCGTTGTGCCACGAATGCCTCCTCTGTGTGCTTTATTACGGGAGAGATGGGACGTGATGTCAAACCGAAAACA
 K V G T F W I S F M G G V D C A P S S A H Q F A L F E Y E Q
 CCAAAGTCGGAACCTTCTGGATCAGTTTCATGGGCGGCTAGACTGCGCCCGTCTCTGCCACCAGTTTGGCTGTTTCAGTACGAGC
 V G Q F Y K T P A Y V K Q Q D G Q Q E I P D S V L L R H M P
 AGGTGGCCAGTTCTACAAGACCCCGGCTACGTGAAGCAGCAGGATGGACAGCAGGAGATCCCGGACAGTGTCTGCTTCGCCACATGC
 P K P V Y T E A P P A G Y Q V N S I N S A C Y D D L I C V A
 CCCCCAAGCCCGTGTACACAGAGGCTCCTCCAGCCGGCTTCAAGTGAACAGCATCAACAGCGCATGTTACGATGACCTGATCTGCGTGG
 G L R S P V P M P E V L R T P R A N F T F Y L A F E M R Q I
 CTGGCCTGAGGTACCCGTTGCCAATGCCGAAGTGTGAGGACGCCGAGAGCCAACTTACGTTCTATTGGCCTTTGAGATGAGACAGA
 H N A H F Y S R A F Y N F E S A D E D Q Q I P T P Q V N N L
 TCCACAATGCTCATTCTACTCTGTGCTTCTACAATTCGAATCAGCGGACGAGGACCAGAGATCCCAACGCCACAAGTAAACAACC
 S F V G P S T P L L L S G G R Y D T R V C S L E N P I P G R
 TCTCCTCGTCCGACCGTCCACGCCCTGCTGCTGAGTGGCGCCGCTACGACACCCGTTGCTGCTCGAAAATCCGATCCCGGAC
 S C H D D Y C E C L H M Y H V P L G A T V E M V F I D E G Q
 GAAGCTGCCACGACTACTGCGAGTGTCTTACATGTATCAGTGCCTTGGGAGCCACTGTGGAGATGGTGTTCATAGACGAAGGCC
H G D E N H P I H L H G H H F W V V G M D R P N D V V G A A
 AACCGGTGACGAGAACCATCCCACTTACACGGACACCCTTCTGGGTGGTGGCATGGACCGCCCTAACGACGTGGTGGGGCAG
 I T R D E V I N L D R S G Q L M R N F Y H P V R K D T V T I
 CCATTACGAGGGACGAGGTCAATTAATTTGGACAGGTGAGGACAGTAAATGAGAACTTCTACCACCCAGTGGAAAAGGACAGTACTA
 P D G G Y T V V R F I A D N P G Y W L M **H C H** L I F **H** S A A
 TCCTGATGGAGGCTATACCGTTGTTTCGATTCATTGCAGATAATCCAGGTAAGTGGTAAATGCACGTGCACCTCATTTCCTACTCTGCGG
G M E V V F K V G **E** V T D I P P S P P G F P S C G N F K Y H
 CCGAATGGAAGTGGTTTTCAAGGTGGGGAAGTGACCCGACATCCCTCCGCTCCACCTGGCTTCCCTTCTCGGGAACTTCAAATACC
 G L *

Devido à sua habilidade de catalisar a oxidação de uma ampla variedade de substratos, a lacase tem sido utilizada em várias aplicações, dentre elas a detoxificação de poluentes ambientais (GOLVEIA, 2016). O poder catalítico das enzimas está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura, força iônica do meio, presença de inibidores e outros (BETTIN, 2010).

As lacases estão associadas ao processo de detoxificação de alguns compostos e são consideradas importantes ao permitirem a sobrevivência de organismos em ambientes impactados (REBOUÇAS, 2017). Essas enzimas têm contribuído no combate aos subprodutos tóxicos liberados no ambiente por diversos tipos de indústria, como a têxtil e a de produção de papel (NAIR *et al.*, 2013). Além disso, essas enzimas são capazes de degradar diversos tipos de hidrocarbonetos como o benzeno e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CHANDRA *et al.*, 2005).

A análise dessas enzimas mediante a presença de contaminantes pode servir como parâmetro para entender se eles podem interferir na atividade enzimática. Isto é muito importante, visto que o ideal é que enzimas com ação detoxificante permaneçam ativas em um ambiente poluído para que possam degradar componentes tóxicos e danosos ao meio ambiente (DURÁN, ROSA, D'ANNIBALE, GIANFREDA, 2002). Como tem sido relatado que metais potencialmente tóxicos estão associados à diversos contaminantes que podem ser degradados pelas lacases (ALENCAR *et al.*, 2016), torna-se importante entender se estes metais potencialmente tóxicos interferem na atividade das lacases. Este parâmetro é fundamental para viabilizar futuras aplicações da lacases de rejeitos de camarão para a biorremediação de compostos nocivos ao meio ambiente.

O presente estudo verificou o efeito de metais potencialmente tóxicos em enzimas do tipo lacase de extratos brutos do hepatopâncreas de *L. vannamei*. Diante do exposto, o hepatopâncreas contém diversas enzimas, as quais podem sofrer a ação dos mesmos contaminantes. Por exemplo, as metaloproteinases são caracterizadas como uma família de endopeptidases Zn²⁺- dependente, que promovem a degradação da matriz extracelular (DE SOUZA ARAÚJO, 2011), deste modo há uma família de metaloproteinases presentes em crustáceos chamada Astacinas (BODE *et al.*, 1993; HOOPER, 1994; STÖCKER *et al.*, 1995; MATSUI *et al.*,

2000; FOX; SERRANO, 2005; WANG et al, 2005; GOMIS-RUTH, 2009; SANTOS, 2011), por apresentarem sequência de ligação a metais (STÖCKER et al., 1995), supõe-se que possam sofrer a interferência de metais potencialmente tóxicos (GOMIS-RÜTH et al., 1994) assim como ocorre com as lacases (ALENCAR et al., 2016). Então, em estudos utilizando extratos brutos, é importante verificar se a presença ou ausência do efeito desses contaminantes nas lacases é subestimada pela interferência de outras enzimas com estes contaminantes, como as metaloproteinases.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito de metais potencialmente tóxicos na atividade de enzimas do tipo lacase do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*, visando gerar informações sobre enzimas candidatas à biorremediação de contaminantes do ambiente aquático (pesticidas, hidrocarbonetos, corantes etc.).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de níquel, mercúrio, cobre, cádmio e zinco na atividade de enzimas do tipo lacase de *L. vannamei*.
- Determinar o efeito de níquel, mercúrio, cobre, cádmio e zinco na atividade de enzimas do tipo metaloproteinase de *L. vannamei*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos brutos

Para a preparação dos extratos brutos, os camarões *L. vannamei* obtidos pelo Laboratório de Enzimologia do departamento de bioquímica da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) no qual foram anestesiados em gelo e os hepatopâncreas foram excisados. Então, os hepatopâncreas foram homogeneizados em NaCl 0,15 M a 4°C, na concentração 40 mg/mL. Em seguida, os extratos brutos (n=3) (3 pools para 3 extratos) foram obtidos a partir dos sobrenadantes após centrifugação a 10.000 x g por 25 minutos a 4°C para a remoção de tecidos debrís. A proteína solúvel total foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA), como proteína padrão.

4.2 Determinação da atividade das lacases

A atividade foi determinada a partir da incubação desses extratos, onde foram utilizados 50 µL de água, 50 µL do tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4, 50 µL de extrato e 50 µL do substrato hidroquinona (3 mg/mL), específico para lacases. Além disso, também foi feito um branco sem extrato e outro branco sem substrato. A quantificação da absorbância ($A_{380\text{nm}}$) foi feita em uma leitora de microplaca após 40 minutos de incubação. A atividade enzimática específica (mU/mg) das lacases foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligramas de proteínas. A determinação da atividade foi feita de acordo com os trabalhos de Söderhäll e Häll, 1984.

4.3 Determinação da atividade das metaloproteinases

A atividade colagenolítica das metaloproteinases do hepatopâncreas de *L. vannamei* foi determinada por adaptação do protocolo de OLIVEIRA *et al.* (2017). Para tal, extratos brutos previamente tratados com Tosil Lisina Clorometil Cetona (TLCK) (8 mM) e Tosil Fenilalanina Clorometil Cetona (TPCK) (8 mM) foram incubados com Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e colágeno impregnado com o corante azo (Azocoll) 5 mg/mL a 55°C por 30 minutos. Após esta etapa, foi adicionado ácido tricloroacético 40% para interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. A leitura das absorbâncias foi feita em uma leitora de microplaca no comprimento de onda $A_{595\text{nm}}$. A atividade enzimática específica (mU/mg) das metaloproteinases foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligramas de proteínas.

4.4 Efeito de elementos químicos potencialmente tóxicos

Os efeitos dos metais potencialmente tóxicos na atividade das enzimas do tipo lacases em hepatopâncreas de *L. vannamei* foram analisados incubando os extratos com soluções de cloreto de níquel, cloreto de mercúrio, cloreto de cobre, cloreto de cádmio e sulfato de zinco em concentrações variando de 0,001 a 10 mM, para cada concentração também foi feito um branco. Então, foi obtida a atividade residual percentual das enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* mediante comparação com o grupo controle sem metais potencialmente tóxicos (100%).

4.5 Análise estatística

Para os experimentos descritos acima, foram utilizados três extratos, sendo feitas triplicatas para cada amostra em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e a análise estatística utilizada foi ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos resultados obtidos com os experimentos, foi possível observar a influência de diferentes metais potencialmente tóxicos na atividade de enzimas do tipo lacase de *L. vannamei*. Estudos já demonstraram que metais podem interferir na atividade dessas enzimas em outros organismos (FANG et al., 2012). Entretanto, esta é a primeira vez que esse estudo é feito com essas enzimas de *L. vannamei*.

Para que essa análise fosse feita com mais eficácia, o presente estudo também verificou o efeito dos metais potencialmente tóxicos nas metaloproteínas. Estas enzimas também estão presentes no hepatopâncreas de camarões e podem ser afetadas pela presença de íons metálicos (GARCIA-CARREÑO et al., 1994; LIAN et al., 2019). Assim, tornou-se possível entender melhor se a ação dos metais potencialmente tóxicos nas enzimas do tipo lacase foi subestimada pela interferência gerada pela da atuação desses contaminantes nas metaloproteínas dos extratos brutos, que por conter uma diversidade de enzimas, tais metais podem interferir na atividade de ambas.

Para a determinação da atividade das metaloproteínas foi utilizado um substrato de colágeno associado a um corante. Isto ocorreu, pois é reconhecido que as metaloproteínas de camarões apresentam atividade colagenolítica (GARCIA-CARREÑO et al., 1994). No entanto, tripsina e quimotripsina, que são as principais enzimas digestivas de camarões (BUARQUE et al., 2009), também apresentam esta atividade (GARCIA-CARREÑO et al., 1994). Por este motivo, para a determinação do efeito dos metais potencialmente tóxicos na atividade de enzimas do tipo metaloproteína, foi feita uma incubação prévia dos extratos brutos com Tosil Lisina Clorometil cetona (TLCK) e Tosil Fenilalanina Clorometil Cetona, reconhecidos inibidores de tripsina e quimotripsina, respectivamente (BUARQUE et al., 2009), dessa maneira por meio da inibição destas enzimas, podemos ter resultados mais

confiáveis para determinação do efeito dos metais potencialmente tóxicos na atividade de enzimas do tipo metaloproteinase, pois uma vez as enzimas tripsina e quimotripsina inibidas não serão mais capazes de ligar-se aos metais.

A seguir, será descrito e discutido o efeito dos metais potencialmente tóxicos na atividade das enzimas do tipo lacase e do tipo metaloproteinase.

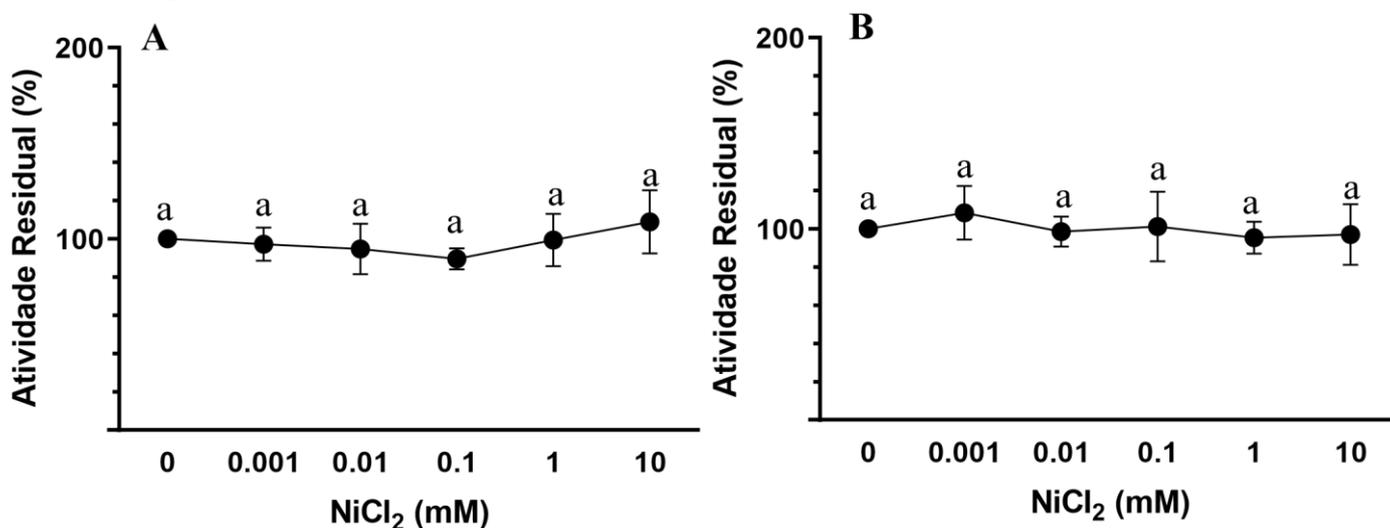
5.1. Níquel

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que o cloreto de níquel não foi capaz de inibir as enzimas do tipo lacase e do tipo metaloproteinase (Figura 4). Resultados similares foram verificados para a determinação do efeito do níquel em enzimas da hemolinfa do caranguejo *Neohelice granulata* (AIRES, 2012). Por outro lado, estudos apontam que esse metal é tóxico para *Daphnia magna* por prejudicar a absorção de íons de magnésio, além de ser prejudicial para a atividade enzimática de outros organismos marinhos (DELEEBEECK, 2007).

O valor permitido pela legislação vigente para o níquel em efluentes industriais corresponde a 0,034 mM (FAVERO *et al.*, 2018), porém, nossos resultados demonstraram que a atividade das enzimas do tipo lacase não foi afetada por níquel em concentrações até 10 mM. Isto é interessante, pois tem sido relatado que o níquel na concentração de 0,1 mM já é capaz de gerar prejuízos ao meio ambiente e à biodiversidade aquática (GENCHI *et al.*, 2020). Por exemplo, o níquel 0,1 mM é capaz de inibir diferentes enzimas importantes para o metabolismo de alguns organismos, incluindo as metaloproteinases (NIEMIROWICZ *et al.*, 2007). No entanto, o mesmo não ocorreu com as lacases e metaloproteinases do hepatopâncreas de *L. vannamei*.

O fato das enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* não terem sido inibidas por níquel 10 mM é importante para as aplicações biotecnológicas dessa enzima. O níquel é bastante abundante e pode ser uma fonte de contaminação de ecossistemas aquáticos, pois está presente no descarte de resíduos industriais e esgoto (GENCHI *et al.*, 2020). Portanto, aplicações da lacase de camarão na biorremediação desses resíduos poderia ser viabilizada, uma vez que o níquel parece não interferir na atividade dessa enzima.

Figura 5: Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metaloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de níquel (NiCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM). As atividades foram determinadas em mili unidades por miligrama de proteínas por mg de tecido (mU/mg). Em seguida, foi calculada a atividade residual percentual utilizando como 100% o controle sem metais potencialmente tóxicos (lacases – 31 mU/mg; metaloproteinases – 15 mU/mg). Cada barra representa média \pm desvio padrão ($n = 3$) e apenas a letra a em todos os grupos significa que não houve diferenças estatisticamente significativas.



5.2 Mercúrio

Normalmente, enzimas são inibidas por mercúrio quando apresentam na sua estrutura grupos tiol (-SH) (GARCIA, *et al*, 2006; CARDELLO, 1995). As alterações na atividade enzimática ocorrem por meio da afinidade do mercúrio com o enxofre. Dessa maneira, a enzima não irá atuar normalmente, ao qual resulta em inibição de sua atividade (FARINA *et al.*, 2003). Além dos grupos tiol, o mercúrio é também capaz de ligar-se aos seguintes grupamentos químicos em ordem decrescente de afinidade: sulfidril, amida, amina, carboxila e fosfato (HAYES, 1983). Assim, era esperado que as enzimas do tipo lacase fossem inibidas por mercúrio, porém isto não ocorreu.

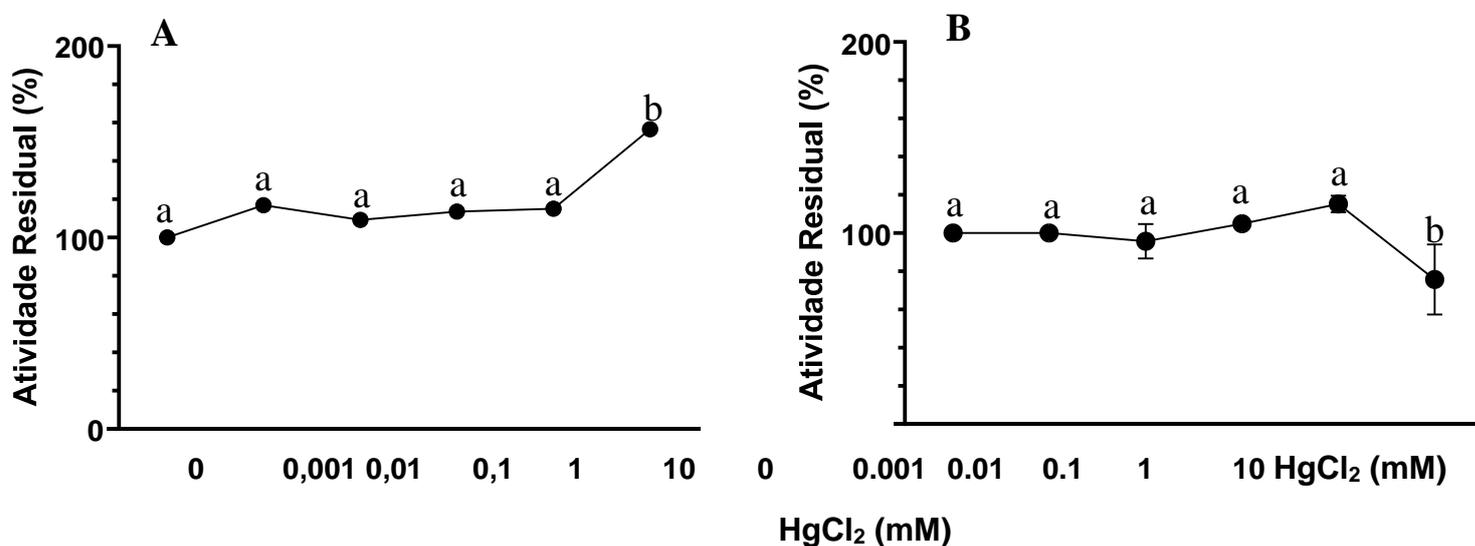
As enzimas do tipo lacase e metaloproteinase do hepatopâncreas de *L. vannamei* não foram inibidas por mercúrio em concentrações até 1 mM (Figura 5A e B). O valor admissível desse metal nos efluentes corresponde a 0,00005 mM (CONAMA, 2011), pois dentre todos os metais, o mercúrio é o mais tóxico e o que tem maior capacidade de se espalhar no ambiente aquático (LACERDA; MALM; 2008). Assim, esses resultados sugerem que as enzimas do tipo lacase podem ser utilizadas

na biorremediação de contaminantes que sejam descartados na água juntamente à concentrações de mercúrio acima do permitido.

Além disso, as enzimas do tipo metaloproteinase do hepatopâncreas de *L. vannamei* foram inibidas por cloreto de mercúrio 10 mM (Figura 5B). Isto pode ser justificável pelo fato de que compostos de mercúrio e até mesmo o cloreto de mercúrio modificam o sítio ativo destas enzimas por meio de alterações conformacionais capazes de perturbar a interação do zinco (importante para a atividade das metaloproteinases) com o sítio catalítico, reduzindo assim a sua atividade (FERREIRA, 2010; TORRE, 2014; KUNTZE, 2012; CUELHO, 2016; BALBINO, 2005). Isto pode justificar a ausência de inibição das enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* por mercúrio, pois, aparentemente, o mercúrio inibiu prioritariamente as metaloproteinases e não exerceu efeito inibitório nas lacases.

Por outro lado, a atividade das enzimas do tipo lacase teve um aumento significativo na presença de cloreto de mercúrio 10 mM. Resultados similares foram observados para lacase do fungo *Fusarium solani* incubada com cloreto de mercúrio de 20 a 40 mM (WU *et al.*, 2010). Assim, é possível que o contra íon cloreto possa ser um efector positivo para as lacases de *L. vannamei*. Dentro deste contexto, FANG *et al.* (2012) demonstraram que o cloreto em concentrações até 80 mM elevou consideravelmente a atividade de uma lacase bacteriana. Esses autores relataram que essa ativação enzimática pode ser por via alostérica, onde a ligação do modulador positivo promove uma mudança conformacional na enzima e aumenta a afinidade pelo substrato. Isto sugere que as lacases de *L. vannamei* podem ser adequadas para aplicações em remoção de contaminantes da indústria de papel e da têxtil, cujos resíduos são descartados junto a uma elevada concentração de cloro (VANHULLE *et al.*, 2008).

Figura 6: Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metaloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de mercúrio (HgCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM). As atividades foram determinadas em mili unidades por miligrama de proteínas por mg de tecido (mU/mg). Em seguida, foi calculada a atividade residual percentual utilizando como 100% o controle sem metais potencialmente tóxicos (lacases – 29 mU/mg; metaloproteinases – 14 mU/mg). Cada barra representa média \pm desvio padrão ($n = 3$) e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ por ANOVA de um fator seguido por Tukey) são indicadas pelas letras diferentes (a, b).



5.3 Cobre

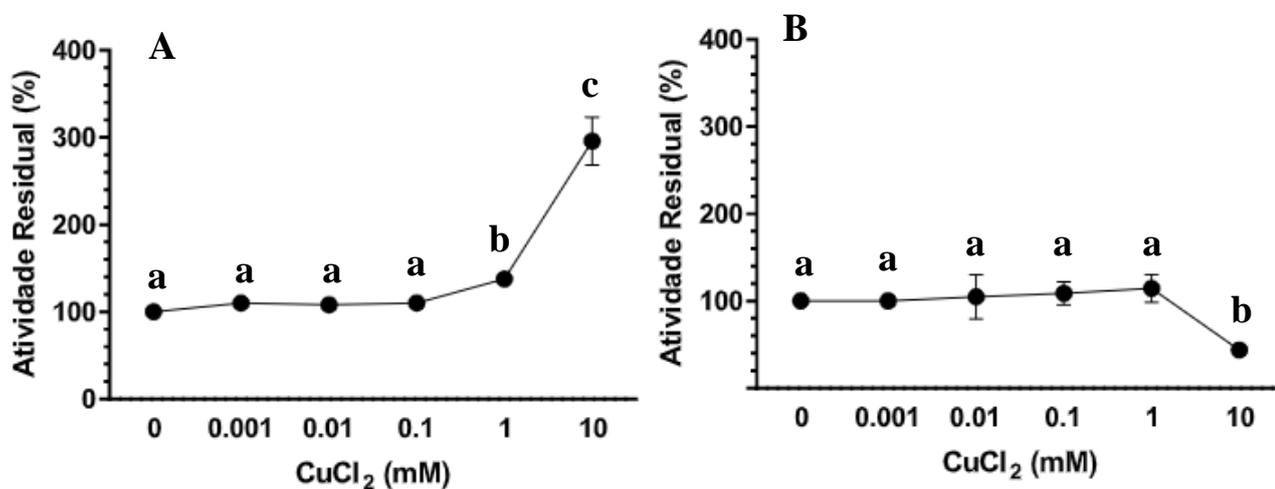
As enzimas do tipo lacase e metaloproteinase de *L. vannamei* não foram inibidas por cobre até a concentração de 1 mM (Figura 6). Nesse contexto, o metal potencialmente tóxico cobre vem se tornando um dos principais contaminantes dos ambientes aquáticos, cujo valor máximo de emissão aceitável na água é 0,00008 mM (CONAMA, 2011). Portanto, as lacases de *L. vannamei* não são afetadas por cobre em concentrações muito superior à permitida.

Por meio da incubação do extrato de hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* com cobre foi possível verificar a inibição das metaloproteinases apenas com o cloreto de cobre 10 mM (Figura 6B). Isto pode ser observado em outros trabalhos que analisam o efeito deste metal nessas enzimas que apresentaram potente efeito inibidor na atividade das metaloproteinases (DE SOUZA, 2000).

Por outro lado, observa-se um aumento significativo na atividade das enzimas do tipo lacase (30% e 200%, respectivamente) com 1 e 10 mM de cloreto de cobre (Figura 6A). Lacase do fungo *Trametes hirsuta* teve aumento de 42% na atividade na

presença de sulfato de cobre 10 mM (NAVADA; KULAL; 2021). Assim, parece que o efeito observado nas enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* é proveniente do papel do cloreto (já descrito anteriormente) e do cobre na atividade dessas enzimas. Visto que as lacases são oxidases dependentes de cobre, tem sido relatado que esses íons podem se ligar ao sítio ativo da enzima e aumentar a sua atividade (ZOU *et al.*, 2012).

Figura 7: Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metaloproteínase (B) mediante incubação com cloreto de cobre (CuCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM). As atividades foram determinadas em mili unidades por miligrama de proteínas por mg de tecido (mU/mg). Em seguida, foi calculada a atividade residual percentual utilizando como 100% o controle sem metais potencialmente tóxicos (lacases – 30 mU/mg; metaloproteínases – 17 mU/mg). Cada barra representa média \pm desvio padrão ($n = 3$) e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ por ANOVA de um fator seguido por Tukey) são indicadas pelas letras diferentes (a, b, c).



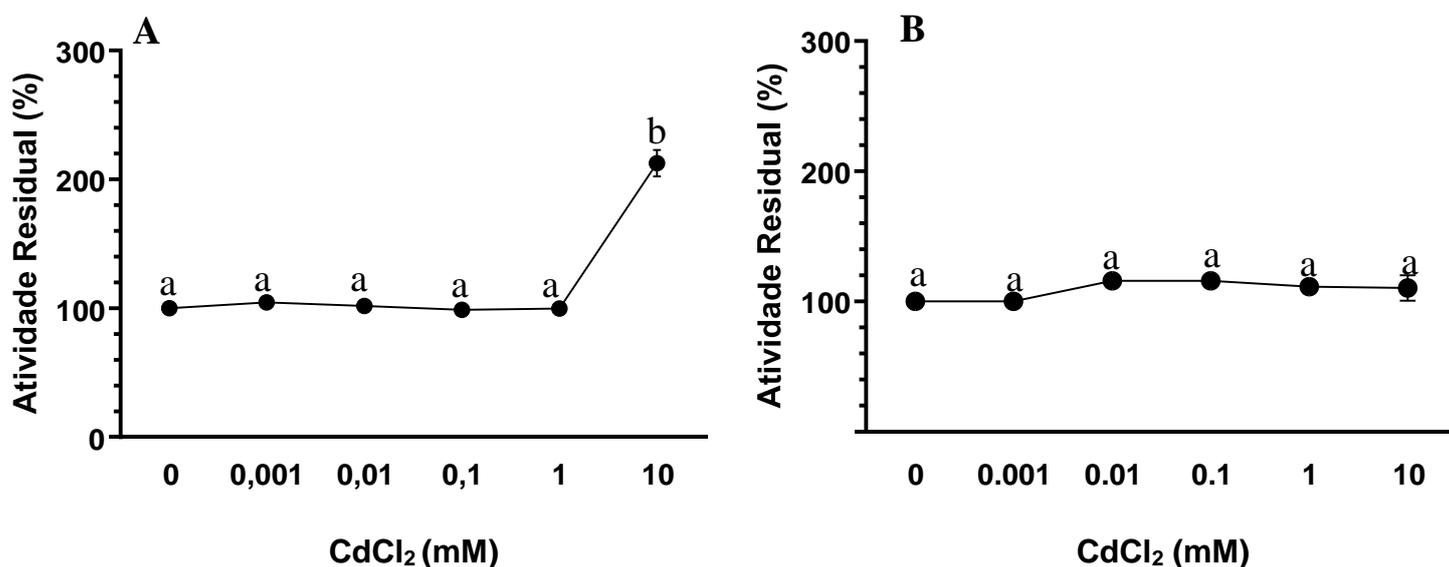
5.4 Cádmi

O valor admissível de cádmio total em efluentes corresponde a 0,004 mM (CONAMA, 2011). Entretanto, por ser um metal tóxico e não essencial para os organismos, é notável uma maior preocupação com os seus níveis presentes nos ambientes aquáticos (CALEFI, 2019). O cádmio de 0 a 1 mM não interferiu na atividade das enzimas do tipo lacase e metaloproteínase (Figura 7). Isto indica que as enzimas do tipo lacase podem ser aplicadas para a biorremediação de contaminantes descartados junto com o cádmio na água.

Como é possível observar, o cloreto de cádmio na concentração de 10 mM foi capaz de aumentar a atividade das enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* (Figura 7). Resultados similares também foram encontrados por BALDRIAN e GABRIEL (2002)

para lacase de fungo. Estes autores relataram que o cádmio pode contribuir na estabilização e proteção da enzima contra fatores externos, o que parece ter correlação com os nossos resultados, visto que a lacase de camarão também tem aumento na atividade pelo menos na maior concentração de cádmio testada. Estes resultados corroboram BALDRIAN e GABRIEL (2002) que mostrou a influência da adição de cobre ou cádmio na indução de lacases independentemente do tempo em que estes são adicionados para *Pleurotus ostreatus*, além de aumentar também a estabilidade destas enzimas.

Figura 8: Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metaloproteinase (B) mediante incubação com cloreto de cádmio (CdCl_2) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM). As atividades foram determinadas em mili unidades por miligrama de proteínas por mg de tecido (mU/mg). Em seguida, foi calculada a atividade residual percentual utilizando como 100% o controle sem metais potencialmente tóxicos (lacases – 31 mU/mg; metaloproteinases – 16 mU/mg). Cada barra representa média \pm desvio padrão ($n = 3$) e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ por ANOVA de um fator seguido por Tukey) são indicadas pelas letras diferentes (a, b).



5.5 Zinco

De acordo com a incubação do extrato do hepatopâncreas com sulfato de zinco, foi possível verificar que as enzimas do tipo lacase de *L. vannamei* foram inibidas apenas na concentração de 10 mM (Figura 8A). Estes resultados são similares aos encontrados por NAVADA e KULAL (2021), que também não observaram inibição de lacase de fungo com menos de 10 mM de zinco.

Assim, os resultados do nosso trabalho demonstraram que as lacases de *L.*

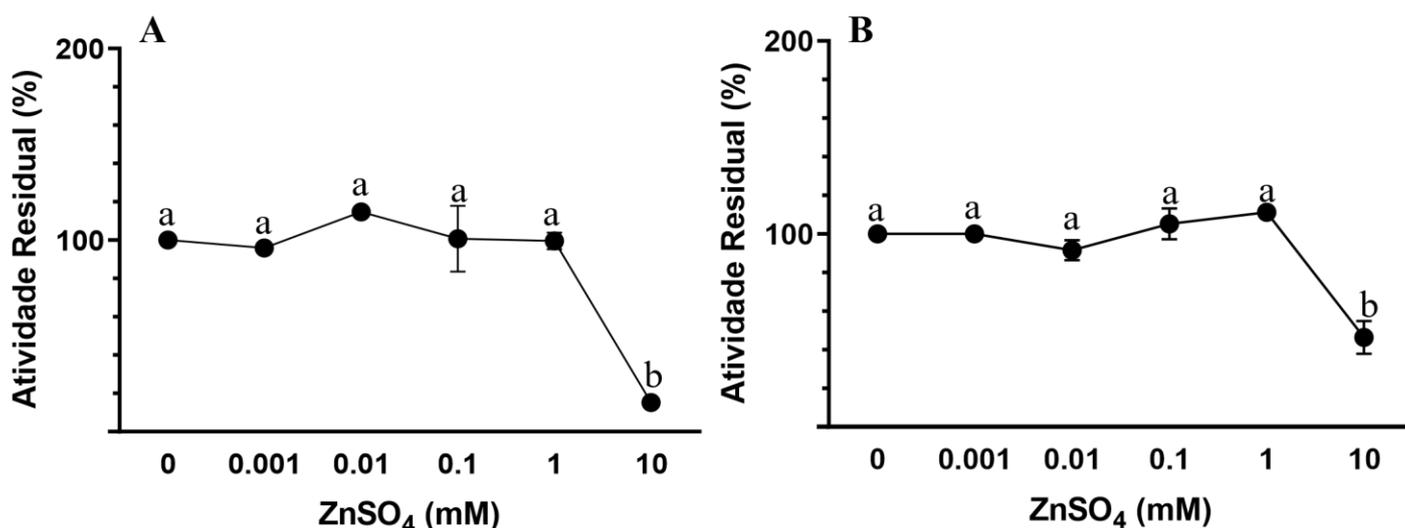
vannamei são inibidas em concentrações de zinco bastante superior à permitida em efluentes, que é de 0,015 mM (LINS, 2003). Isto é bastante importante, pois um dos grandes problemas atuais de poluição corresponde à contaminação de água por meio de efluentes industriais acima da concentração máxima estabelecida. Nesse contexto, tem sido demonstrado que milhares de animais aquáticos são mortos periodicamente em nossos rios por causa do descarte de substâncias que contêm zinco no combate a fungos que constituem pragas da lavoura (MARCANTONIO, 2015). Assim, é fundamental para uma enzima que poderá degradar diversos tipos de contaminantes que ela esteja ativa (o que foi observado para as lacases do nosso estudo) mesmo se estes contaminantes estiverem na presença de zinco.

No entanto, sulfato de zinco 10 mM inibiu aproximadamente 90% das enzimas do tipo lacase de *L. vannamei*. Inibição utilizando cloreto de zinco 20 mM também foi observada para lacase bacteriana e fúngica (aproximadamente 55 e 35%, respectivamente) (WU *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2012). Assim, uma maior inibição das enzimas de *L. vannamei* pode estar relacionada ao efeito negativo do zinco na atividade somado ao efeito do contra íon utilizado no nosso trabalho que foi o sulfato, diferente dos trabalhos acima citados que utilizaram o cloreto como contra íon. De acordo com o exposto, o sulfato pode interferir em enzimas de outros organismos, como a ATP sulfúrilase 2 da planta *Stanleya pinnata*, cuja atividade foi inibida em 50% com sulfato (JIANG *et al.*, 2018).

A determinação da atividade das enzimas do tipo metaloproteinase mediante a presença de sulfato de zinco (Figura 8B) reforça a hipótese de que o sulfato pode contribuir para a inibição enzimática. Assim como demonstrado para as enzimas do tipo lacase, metaloproteinases também foram inibidas (aproximadamente 60%) com o sulfato de zinco 10 mM. Entretanto, tem sido relatado que as metaloproteinases presentes em animais são enzimas dependentes de zinco e que são ativadas na presença deste metal (WILD *et al.*, 2017; BJARNASON, FOX, 1995; WANDERLEY, 2016.), deste modo estudos também afirmam que o zinco consiste em um metal traço essencial para camarão *L. vannamei*, participando da constituição do pigmento respiratório hemocianina e de diversos processos enzimáticos, respectivamente (RAINBOW *et al.*, 1988). Portanto, sugere-se que o sulfato tenha exercido efeito negativo na atividade das enzimas do tipo metaloproteinase de *L. vannamei* e, por esta razão, essas enzimas foram inibidas mesmo na presença do zinco como possível

ativador. Porém, mais estudos são necessários para entender se o sulfato de fato inibe as lacases e as metaloproteinases de organismos como *L. vannamei*.

Figura 9: Determinação da atividade das enzimas do tipo lacase (A) e do tipo metaloproteinase (B) mediante incubação com sulfato de zinco ($ZnSO_4$) em diferentes concentrações (0,001 – 10 mM). As atividades foram determinadas em mili unidades por miligrama de proteínas por mg de tecido (mU/mg). Em seguida, foi calculada a atividade residual percentual utilizando como 100% o controle sem metais potencialmente tóxicos (lacases – 28 mU/mg; metaloproteinases – 15 mU/mg). Cada barra representa média \pm desvio padrão ($n = 3$) e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ por ANOVA de um fator seguido por Tukey) são indicadas pelas letras diferentes (a, b).



6. CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi desenvolvido, pode-se concluir que as enzimas do tipo lacase do hepatopâncreas de *L. vannamei* não foram inibidas por cloreto de níquel, cloreto de mercúrio, cloreto de cobre e cloreto de cádmio. Por outro lado, os três últimos metais citados ativaram essas enzimas na concentração de 10 mM. Nesta mesma concentração, o cloreto de mercúrio e o cloreto de cobre inibiram as enzimas do tipo metaloproteinase, a qual foi utilizada como um controle para uma verificação mais precisa da atividade das enzimas do tipo lacase. Além disso, ambas as enzimas testadas foram inibidas por sulfato de zinco apenas na concentração de 10 mM. Por fim, os metais potencialmente tóxicos interferem na atividade das enzimas do tipo lacase apenas em concentrações bastante superiores aos valores admissíveis. Portanto, as enzimas do tipo lacase do hepatopâncreas de *L. vannamei* podem ser candidatas à aplicações de biorremediação de diversos contaminantes por meio da

utilização de rejeitos do pescado, os quais são descartados junto com metais potencialmente tóxicos em ecossistemas aquáticos. Entretanto, são necessários estudos futuros com a lacase de *L. vannamei* purificada, para verificar se os metais estudados interferem nos parâmetros cinéticos da enzima.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Mônica Regina Marques Palermo de; NOVAES, Amanda Cardoso; GUARINO, Alcides Wagner Serpa. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Química Nova*, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002.
- AHMAD, K.; AZIZULLAH, A.; SHAMA, S.; KHATTAK, M. N. K. Determination of heavy metal contents in water, sediments, and fish tissues of *Shizothorax plagiostomus* in river Panjkora at Lower Dir, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, p. 7357-7366, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-014-3932-1>
- AIRES, M.S. Efeitos bioquímicos e fisiológicos da exposição ao níquel no caranguejo euraliano *neohelice granulata*. Dissertação de Mestrado, 2012.
- Alberto Ribeiro Lamego, *Campo dos Goytacazes/RJ*, v. 10, n. 2, p. 7-24, 2016.
- ALENCAR, T. S. et al. Contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo: uma ameaça para os manguezais. *Boletim do Observatório Ambiental*
- ANDREAZZA, Robson et al. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC Nº 145, de 21/03/2017 e RDC Nº 173, de 15/09/2017. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 10 de março 2021.
- Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2011.
- ARAÚJO, M. E.; RAMALHO, C.W.N.; MELO, P.W. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Atheneu, 353 p. 2003.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. Metais: gerenciamento da toxicidade. São Paulo:
- BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and Cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters, v. 206(1), p. 69 – 74, 2002.

BARBIERI JÚNIOR, R.C., OSTRENSKY NETO, A. Camarões Marinhos (Engorda). v. II. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 370 p, 2002.

BARRACO, M. A.; PERAZZOLO, L. M; ROSA, R. D. Inmunologia de crustáceos, com ênfase em camarões. In: (eds) CYTED. Patología y Inmunología del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Panamá, 2008.

BARRETO, L. A. S. *Vibrio parahaemolyticus* Inativado por calor pode modular a atividade de fenoloxidase no hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2020. TCC Bacharelado ciências Biológicas. Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

BATISTA, Amanda Alfonso. Efeitos da contaminação in situ por níquel em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). 2012.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources antifoam and Tween 80. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36, 1-9, 2010.

BINOD, P., et al. Chapter 10 – Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes, 229-250, 2011.

Biotechnology Letters, v. 43, p. 613 – 626, 2021.

BJARNASON, J. B., FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. Methods Enzymol., v. 248, p. 345-368, 1995.

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysis, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincs'. Federation of European Biochemical societies FEBS Letters, v. 331, p. 134-140, 1993.

BONUMÁ, N. B. Avaliação da qualidade da água sob impacto das atividades de implantação de garimpo no município de São Martinho da Serra. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, (jan- mai), 1976.

BRASIL. (2011). CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 430, de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, completa e altera a Resolução n° 357, de março de 2005, do Conselho
Brazil.Cadernos de Saúde Pública, 36(1),
<https://doi.org/10.1590/0102311X00230319>, 2020.

BRIGGS, M. et al. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, p. 92. 2004.

BRIS, Cédric Le et al. Melanosis in *Penaeus monodon*: Involvement of the Laccaselike Activity of Hemocyanin. Journal of agricultural and food chemistry, v. 64, n. 3, p. 663-670, (out-jan), 2016.

BROADLEY, Martin R. et al. Zinc in plants. New phytologist, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007.

BUARQUE, DS. et al. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture Research, v. 40, p. 861–870, 2009.

cadmium and freshwater fish. 1ed. Food and agriculture organization of the United

CAHU, TB. et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* processing waste. Process Biochemistry, v. 47, p. 570 – 577, 2012.

CAIRNS JR, J. Should regulatory criteria and standards be based on multispecies evidence. Environ. Prof, v. 10, p. 157-165, 1988.

CALEFI, Fabíola Carreira. Influência de níveis subletais de amônia na toxicidade de metais em duas espécies de invertebrados. 2019.

CALHEIROS, Débora Fernandes; FERREIRA, Celso João Alves. Alteracoes limnologicas no Rio Paraguai ("dequada") e o fenomeno natural de mortandade de peixes no Pantanal Mato-Grossense-MS. Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 1996.

CALLEJA, Mabel C.; PERSOONE, Guido. Cyst-based toxicity tests IV, the potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. Atla, v. 20, p. 396-405, 1992.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, v. 121, p. 129–136, 2003.

Cap 1, p. 1–24. 2014

CARDELLO, Leonardo; LOURENÇO, Euclides J. Efeito de mercuriais na atividade da pectinametilesterase de berinjela (*Solanum melongena* L.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 6, n. 1, 1995.

CARVALHO, Maria Cristina de Moraes Caldas Antão Santos. Avaliação da toxicidade de compostos de níquel para o cladóceros *Daphnia magna*: ensaios in vivo e in vitro. 2000.

CERENIUS, L.; SODERHALL. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, v. 198, p. 116-126, 2004.

CERENIUS, Lage *et al.* Crustacean immunity. *In: Invertebrate immunity*. Springer, Boston, MA, p. 239-259, 2010.

CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H.; RODRIGUES, A. P. C.; FERNANDES, V. A.; SILVA, M. B.; CASTILHOS, Z. C. ARAUJO, P. C. Metais pesados em solos e sedimentos fluviais em antiga área de garimpo de ouro em Descoberto, Minas Gerais. Rio de Janeiro: CETEM, 2009. 9p. (Comunicação Técnica).

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Ficha de Informação Toxicológica – Mercúrio e seus Compostos. 2012. Disponível em . Acesso em 20 nov. 2017.

CHANDRAN R, SIVAKUMAR AA, MOHANDASS S & ARUCHAMI M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and physiology Part C* n. 140. p.422-426. 2005

CHANEY, R. ál. Zinc phytotoxicity. *In: Zinc in soils and plants*. Springer, Dordrecht, p. 135-150. 1993.

COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology*. 63, 3444-3450, 1997.

COMPANY R, Serafim A, Cosson R, Camus L, Shillito B, Fiala-Médioni A, Bebianno MJ. The effect of cadmium on antioxidant responses and the susceptibility to oxidative stress in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* n.148: p.817-825. 2009.

COSTA, F. H. F.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, I. R. C. B.; PONTES, G. C.; SILVA, C. M.; da SILVA NETO, J. F.; da SILVA, F. L. S.; NUNES, E. V.; de SOUZA, A. L. F.; LIMA-JUNIOR, T. B. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. In: III Simpósio Internacional sobre a indústria do camarão cultivado. Natal, 2006. Anais...Natal: 2006.

COSTA, Luciano T.; DAMAS, Giane B.; BERTOLDO, Bruno. Mercúrio: da antiguidade aos dias atuais. Revista Virtual de Química, v. 6, n. 4, p. 1010-1020, 2014.

COSTA, S. C.; HARTZ, S. M. Evaluation of trace metals (cadmium, chromium, copper and zinc) in tissues of a commercially important fish (*Leporinus obtusidens*) from Guaíba Lake, Southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, n. 1, p. 241-250, 2009.

CUELHO, Camila Helena Ferreira et al. *Ilex paraguariensis* A. St Hil. Efeitos na prevenção das alterações cutâneas induzidas por radiação UVB. 2016.

CUI, B.; ZHANG, Q.; ZHANG, K.; LIU, X.; ZHANG, H. Analyzing trophic transfer of heavy metals for food webs in the newly-formed wetlands of the Yellow River Delta, China. Environmental Pollution, v. 159, p. 1297-1306, 2011.

DE CASTRO, Sebastião Venâncio. Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto Rio das Velhas. 2006.

DE SOUZA ARAÚJO, Rosângela Vidal et al. Metaloproteínas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.

DE SOUZA, Ana Paula et al. Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade de metaloproteases da matriz secretadas por células do tecido gengival. 2000.

DELEEBEECK, N. M. E.; MUYSSSEN, B. T. A.; DE LAENDER, F.; JANSSEN, C. R.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C. Comparison of nickel toxicity to cladocerans in soft versus hard surface waters. Aquatic Toxicology, v. 84, n. 2, p. 223-235, ago. 2007.

DESCHAMPS, E.; MOREIRA, R.; MATTOS, S.; WEMECK, G. Pesquisa da contaminação por mercúrio em garimpo do Estado de Minas Gerais, seu impacto na saúde e no meio ambiente. 2010. Disponível em: Acesso em: 05 jan. 2019.

DUFFUS, John H. "Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). Pure and applied chemistry, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L.; Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and microbial technology*, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

EIFAC - EUROPEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION. Report on

EKASARI, Julie; AZHAR, M. H; SURAWIDJAJA, E. H.; *et al.* Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*, v. 41, n. 2, p. 332-339, (jan-ago), 2014.

FANDÉ, Morto Baiém; PEREIRA, V. F. G. C. Impactos ambientais do turismo: um estudo sobre a percepção de moradores e turistas no Município de Paraty-RJ. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental-REGET*, v. 18, n. 3, p. 1170-1178, 2014.

FANG, Z.E. *et al.* A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decoloration ability. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 36 – 41, 2012.

FAO. Agricultural production: primary crops. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 10 março. 2021. FAO.

FARINA, M.; BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; SOARES, F. A. A.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of δ-aminolevulinatase dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol. Letters*, vol. 139, n. 20, p. 55-66, 2003.

FAVERO, Ana Carolina *et al.* 57.; Caracterização de efluente de indústria metalmeccânica após tratamentos combinados de filtração, ozonização e neutralização vis.2018.

FERREIRA, Anna Laura Bechara Jacob *et al.* Interação toxicogenética de polimorfismos da metaloproteinase-9 (MMP-9) da matriz extracelular e exposição ao mercúrio= efeitos sobre a atividade plasmática da MMP-9. 2010.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, v. 45, p. 969-985, 2005.

FRANSSENS, V.; SIMONET, G.; BREUGELMANS, B.; SOEST, S. V.; HOEF, V. V.; BROECK, J. V. The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 29: 235-241, 2008.

GAMBOA-DELGADO, Julián; MOLINA-POVEDA, César; CAHU, Chantal. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture research*, 34.15: 1403-1411. 2003.

GARCIA, T. A. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnopus sanguineus*. Tese. Instituto de Ciências Biológicas. UNB., 2006.

GARCÍA-CARREÑO, F.L.; HERNÁNDEZ-CORTÉZ, M.P.; HAARD, N.F. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of agriculture and food chemistry*, v. 42, p.1456-1461, 1994.

GAUTAM R. K. et al. Contamination of heavy metals in aquatic media: transport, toxicity and technologies for remediation. In: SHARMA, S. K. (ed). *Heavy metals in water: presence, removal and safety*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, .

GAXIOLA, Gabriela, et al. Nutrición y Domesticación de *Litopenaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuicola*, 2006.

GENCHI, G. et al. Nickel: human health and environmental toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v. 17, p. 679 – 700, 2020.

GOLVEIA, Jhêssica Cavalcante de Souza, et al. Indução de lacase de *Pycnopus sanguineus* CCT 4518 induzida por resíduos agroindustriais e ensaio de biorremediação de estrogênio sintético (EE2). 2016.

GIORDANO, Gandhi et al. Tratamento e controle de efluentes industriais. *Revista ABES*, v. 4, n. 76, p. 1-84, 2004.

GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2011.

GOMIS-RÜTH, F. X.; KRESS, L. F.; KELLERMANN, J.; MAYR, I. et al. Refined 2.0 Å X-ray Crystal Structure of the Snake Venom Zincendopeptidase Adamalysin II: Primary and Tertiary Structure Determination, Refinement, Molecular Structure and Comparison with Astacin, Collagenase and Thermolysin. *Journal of Molecular Biology*, 239, n. 4, p. 513-544, 1994/06/16/ 1994.

GOMIS-RUTH, F.X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *The Journal Biological Chemistry*, v. 23, p. 15353-15357, 2009.

GUIMARÃES, J. R. D.; FOSTIER, A. H.; FORTI, M. C.; MELFI, J. A.; KEHRIG, H.; MAURO, J. B. N.; MALM, O.; KRUG, J. F. Mercury in human and environmental

samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon. *Ambio*, v. 28, n. 4, p. 296-301, 1999.

GUIMARÃES, Marcelo de A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 2, p. 58-68, 2008.

HALBACH, S.; KREMERS, L.; WILLRUTH, H.; MEHL, A.; WELZL, G.; WACK, F. X.; HICKEL, R.; GREIM, H. Systemic Transfer of Mercury from Amalgam Fillings before and after Cessation of Emission. *Environmental Research*, v. 77, p. 115-123, 1998.

HAYES, J. A. Metal toxicity. In: MOMBURGUER, F.; HAYES, J. A.; PELIKAN, E. W. (Eds.). *A guide to gen. toxicol.*. New York: Karger, p. 232-233, 1983

HOOPER, N. Families of zinc metalloproteases. *Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters*, v. 354, p. 182-191, 1994.

HRUDEY, Steve E. Residues from hazardous waste treatment. *Effluent & water treatment journal*, v. 25, n. 1, p. 7-12, 1985.

HUGHES, K. et al. Speciation in health risk assessments of metals: evaluation of effects associated with forms present in the environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 22, n. 3, p. 213-220, 1995.

IKEM, A.; EGIEBOR, N. O.; NYAVOR, K. Trace elements in water, fish and sediment from Tuskegee Lake, Southeastern USA. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 149, p. 51–75, 2003.

JADHAV, Swati B.; SINGHAL, Rekha S. Polysaccharide conjugated laccase for the dye decolorization and reusability of effluent in textile industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85:271-277, 2013.

JESUS, G.J. Aplicação de *Neurospora crassa* para a avaliação da biosorção e biodegradação de corantes ácido, xanteno, direto e reativo. 2005. 172f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

JIANG, J. et al. In vitro antibacterial analysis of phenoloxidase reaction products from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 39(2), p. 458–463, 2014.

JIANG, Ying et al. Comparison of ATP sulfurylase 2 from selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* and non-accumulator *Stanleya elata* reveals differential intracellular localization and enzyme activity levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1862, n. 11, p. 2363-2371, 2018.

KENNISH, M. J. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. Boca Raton: CRC Press. 494p., 1991.

KHALILI, Shayan. Biocatalytic fibers for bioremediation. 2016. Tese de Doutorado.

KISAKA, Tiago Borges. Análise quantitativa de mercúrio no bioma Cerrado: estudo de caso na Lagoa Bonita, Planaltina, DF. 2013.

KITAHARA, S.E.; OKADA, I.A.; SAKUMA, A.M.; ZENEBO, O.; JESUS, R.S.; TENUTA-FILHO, A. Mercúrio total em pescado de água doce. Cienc. Tecnol. Aliment , v.20, n. 2, p. 267-273, 2000.

KUNTZE, Luciana Bãrg. Efeito inibitório do captopril sobre a Metaloproteinase-2 da LACERDA, L.D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em sistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. Estudos avançados, v. 22(63), p. 173 – 190, 2008.

LAUWERYS, Robert R.; HOET, Perrine. Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring. CRC Press, 2001.

LE MOULLAC, Gilles; HAFFNER, Philippe. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, v. 191, n. 1-3, p. 121-131, (mar-set), 2000.

LEE, Y. H.; HULTBERG, H.; ANDERSSON, I. Catalytic effect of various metal ions on the methylation of mercury in the presence of humic substances. Water, Air, and Soil Pollution, v. 25, p. 391-400, 1985.

LI, L. et al. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of southern China. AMB Express, v. 4(60), p. 60, 2014.

LI, X. et al. Multiple tolerances and dye decolorization of a novel laccase identified from *Staphylococcus haemolyticus*. The Journal of microbiological technology, v. 30 (4), p. 615 – 621, 2020.

LI, Xiaolin et al. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of Zn phytotoxicity and mineral nutrition of host plants. 17th WCSS, Thailand, 2002.

LIAN, Y.Y. et al. Functional Characterization of a matrix metalloproteinase 2 gene in *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. v. 84, p. 404 – 413, 2019.

LIMA JUNIOR, R. G. S.; ARAÚJO, F. G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. Environmental Research Section, v. 89, p. 171-179, 2002.

LIMA, H. M. Estudo de flotação de mercúrio metálico. 1993. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia metalúrgica e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

- LIN, Yong-Chin *et al.* Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. PLoS One, v. 8, n. 7, p. e69722, (jan-jul), 2013.
- LINS, D. C.; MEIRELLES, M. E.; MALM, O.; LIMA, N. R. W. Mercury concentration in the freshwater bonefish *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) and its parasite the crustacean *Riggia paranensis* (Cymothoidae). Neotropical Ichthyology, v. 6, n. 2, p. 283-288, 2008.
- LINS, Flaviany Afonso. Remoção de níquel e zinco utilizando zeólita natural estabilizada através do processo de troca iônica. 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- LOZANO, Leonardo; ROSSINI, Matheus Henrique; MACEDO, Rodrigo. CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DO COBRE PURO (Cu). 2016.
- LUNA-ACOSTA, A. *et al.* Recent findings on phenoloxidases in bivalves. Marine pollution bulletin, v. 122, n. 1-2, p. 5-16, (nov-jun) 2017.
- MAJEAU, J.; BRAAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresource Technology, n.101, 2331-2350, 2010.
- MALAVOLTA, E. Fertilizantes e seu impacto ambiental. São Paulo: Prodquímica, p. 93-95. 1994.
- MAPELLI, Ricardo Fagundes. Zinco—características e aplicações como elemento no desenvolvimento de tecnologia. Revista Tecnologia e Tendências, v. 9, n. 1, p. 86-98, 2017.
- MARCANTONIO, Adriana Sacoto. Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos. 2015.
- MATOS, Gabriel Machado, et al. Expressão heteróloga da ubiquitina de *Litopenaeus vannamei* e avaliação da sua transcrição frente à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). 2015.
- Matriz Extracelular (MMP-2) in vitro. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.
- MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochemica et Biophysica Acta: BBA 1477, p. 146-156, 2000.
- MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da

toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae) p.327- 340. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; NETO, A.L.O., Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI. 1.ed. São Carlos, RIMA, 575p. 2000.

MENESES, T. S. Fauna, pesca e contaminação por metais pesados em pescado no litoral de Sergipe. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.

MICHELIN, Rita Lourdes. Turismo na Preservação dos Recursos Naturais: Vilão ou Solução? O caso do Parque Estadual de Itapuã-RS. IV SeminTUR–Seminário de Pesquisa em Turismo do MERCOSUL. Universidade de Caxias do Sul (RS), 2006.

MINDELL, Earl. Vitaminas: guia prático das propriedades e aplicações. Melhoramentos, 1996.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista Saúde Pública, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MOSER, Juliana Righetto et al. Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da necrose hipodermal e hematopoiética infecciosa-IHHNV. 2005.

MUTO, E. Y.; SOARES, L. S. H.; SARKIS, J. E. S.; HORTELLANI, M. A.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N. Biomagnificação de mercúrio na teia trófica marinha da baixada Santista (SP). Oceanografia e Políticas Públicas, v. 43, p. 12-17, 2011.

Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. DF.

NAIR, R.R.; DEMARCHE, P.; AGATHOS, S.N. Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. New Biotechnology, v. 30, p. 814–823, 2013.

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. Pigment Cell research, v.6, p.117-126, 1993.

Nations: Rome. 21p. 1977

NAVADA, K.K.; KULAL, A. Kinetic characterization of a purified laccase from *Trametes hirsuta*: a study on laccase catalyzed biotransformation of 1,4-dioxane.

NIEMIROWICZ, G. et al. Two metalloproteinases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. *Biochemical Journal*, v. 401, p. 399–410, 2007.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 14, p. 37-51, 2004.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões Marinhos na Engorda. *Revista Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, vol.12, p. 23-33, 2002.

NÚÑEZ-GÓMEZ, Dámaris et al. Potencial dos resíduos do processamento de camarão para remediação de águas contaminadas com drenagem ácida mineral. *Polímeros*, v. 26, n. SPE, p. 1-7, 2016.

OLIVEIRA, Mara Lucia Jacinto et al. Mercúrio total em solos de manguezais da Baixada Santista e Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 519-524, 2007.

OLIVEIRA, V. M. et al. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application. *Boletim do Instituto de Pesca*. v. 43(1), p. 52-64, 2017.

OZÓRIO, Renata Ávila, et al. Desempenho zootécnico, enzimas digestivas e imunocompetência em camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com extrato de polissacarídeo da microalga *Porphyridium cruentum*. 2013.

PELGROM, S.M.G.J. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. *Aquat. Toxicol.*, v. 30, p. 117-135, 1994.

PERAZZOLO, Luciane M.; BARRACCO, Margherita A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 21, n. 5, p. 385-395, (set-out), 1997.

PEREIRA, P.; PABLO, H.; PACHECO, M.; VALE, C. The relevance of temporal and organ specific factors on metals accumulation and biochemical effects in feral fish (*Liza aurata*) under a moderate contamination scenario. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 805–816, 2010.

- PETERSON, C.L.; KLAWE, W..L.; SHARP, G.D. Mercury in tunas: a review. , v. 71, n. 3, p. 603- 613, 1973.
- POPE, Edward C. *et al.* Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. Plos one, v. 6, n. 6, p. e20960, (fev-jul), 2011.
- QUISPE GASPAR, Ruth Liliám *et al.* Avaliação da expressão de genes associados ao sistema imune durante os estágios de desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2013.
- RAINBOW, P.S. The significance of trace metal concentrations in decapods. Symp. Zool. Soc. Lond., v. 59: 291-313, 1988.
- RAJALAKSHMI, S.; MOHANDAS, A. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 62, n. 1, p. 140-143, 2005.
- REBOUÇAS, Rosa Helena *et al.* *Vibrio* spp. como patógenos na carcinicultura: alternativas de controle. 2017.
- RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. TRENDS in Biotechnology, 24, 219 – 226, 2006.
- SANTOS, Camilla Alves. Anotação genômica e caracterização de locos microsatélites em sequências expressas do genoma do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 2011.
- SANTOS, SD. *et al.* Shrimp Waste Extract and Astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. Journal of Food Science, v. 77, p. 141-146, 2012.
- SHI, L. *et al.* Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. Fish & shellfish immunology, v. 66, p. 1-10, 2017.
- SHLEEV, Sergey *et al.* Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. Enzyme and Microbial Technology, 39(4):841-847, 2009.
- SILVEIRA, A. S. *et al.* An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. Developmental & Comparative Immunology, v. 79, p. 44-50, 2018.
- SMITH, Val H.; SCHINDLER, David W. Eutrophication science: where do we go from here?. Trends in ecology & evolution, v. 24, n. 4, p. 201-207, (fev-abr), 2009.

SOARES, Tatiana. Hemócitos da aranha *Lasiadora* sp (Araneae: Theraphosidae): ultracaracterização e purificação de inibidor de serino proteases. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SÖDERHÄLL, Kenneth; HÄLL, Lena. Ativação do sistema de ativação de propenoloxidase induzida por lipopolissacarídeo em lisado de hemócitos de lagostas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Assuntos Gerais*, v.1, n. 797, p. 99-104, (marjul), 1984.

SOUZA, L. C. D.; CARVALHO, M. A. C.; CORRÊA, B. S.; SILVA, M. P. Consequências da atividade garimpeira nas margens do rio Peixoto de Azevedo no perímetro urbano do município de Peixoto de Azevedo – MT. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 8, n. 2, p. 220-231, 2008.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.X.; MCKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science*, v.4, p. 823-840, 1995.

THEERACHAT, Monnat et al. Laccases from marine organisms and their applications in the biodegradation of toxic and environmental pollutants: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 187, n. 2, p. 583-611, 2019.

TORRE, Eliana do Nascimento. Metaloproteínases da matriz extracelular e cárie dentária: avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas. 2014.

UCHOA, V. BBC News Brasil. Danos do óleo no litoral do nordeste vão durar décadas, dizem oceanógrafos. <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-50131560> Acesso em 24/10/2019.

UNESP. 2015. http://www2.fc.unesp.br/lvq/LVQ_tabela (acessa em 10/01/2015)

VALENTIM NETO, P. A. Caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) infectado versus não infectado com o vírus da mancha branca. 2011. 113f. Tese (Doutorado em

VANHULLE, S. et al. Decolourisation, cytotoxicity and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye contaminated wastewater. *Environmental Science Technology*, v. 42, p. 584–589, 2008.

VIRGA, Rossana Helena Pitta; GERALDO, Luiz Paulo; SANTOS, Fabiana Henrique dos. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 4, p. 779-785, (out – dez) 2007.

VUTUKURU, Sesha Srinivas et al. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish physiology and biochemistry*, v. 32, n. 3, p. 221-229, 2006.

WANDERLEY, M. C. D. A. Produção, caracterização parcial e purificação de colagenase produzida por *Penicilium* sp. UCP 1286 isolado da caatinga. Pró-reitoria pesquisa e pós-graduação programa de pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos. 2016.

WANG, W.J.; SHIH, C.H.; HUANG, T.F. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinases, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie*, v. 87, p. 1065-1077, 2005.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* v. 22, p. 161-187, 2003

WILD, B.; ST-PIERRE, M.; LANGLOIS, S.; COWAN, K.L. Elastase and matrix metalloproteinase activities are associated with pulmonary vascular disease in the nitrofen rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Journal Of Pediatric Surgery*, v. 52, n. 1, p.693-701, 2017.

WU, Jui Pin; CHEN, Hon-Cheng. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*, v. 57, n. 11, p. 1591-1598, 2004.

WU, Yi-Rui et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 24, p. 9772-9777, 2010.

YI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, K.; YU, G.; DUAN, X. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. *International Journal of Sediment Research*, v. 23, p. 338-347, 2008.

YI, Y.; YANG, Z.; ZHANG, S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environmental Pollution*, v. 159, p. 2575-2585, 2011.

YI, Y.; ZHANG, S. Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, p. 3989–3996, 2012.

ZHUO, Rui et al. The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. *Chemosphere*, v. 234, p. 733-745, 2019.

ZOU, Ya-Jie et al. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Hericium coralloides*. *The Journal of Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 72-78, 2012.