



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

BRUNA LUNARDELLI

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM DUAS ESPÉCIES DE  
PEIXES NEOTROPICAIS SUBMETIDAS A TESTES *IN SITU*  
EM UM RIO QUE RECEBE EFLUENTE DE CURTUME**

---

Londrina

2014

BRUNA LUNARDELLI

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM DUAS ESPÉCIES DE  
PEIXES NEOTROPICAIS SUBMETIDAS A TESTES *IN SITU*  
EM UM RIO QUE RECEBE EFLUENTE DE CURTUME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis  
Martinez

Londrina

2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L961a Lunardelli, Bruna.  
Análise de biomarcadores em duas espécies de peixes neotropicais submetidas a testes *in situ* em um rio que recebe efluente de curtume / Bruna Lunardelli. – Londrina, 2014.  
107 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Peixe – Efeito dos metais – Teses. 2. Biotransformação (Metabolismo) – Teses. 3. Cromo – Bioacumulação – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

BRUNA LUNARDELLI

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES  
NEOTROPICAIS SUBMETIDAS A TESTES *IN SITU* EM UM RIO QUE  
RECEBE EFLUENTE DE CURTUME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos  
Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Adalto Bianchini  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

---

Prof. Dr. José Luís Olivan Birindelli  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2014

## ***DEDICATÓRIA***

**Dedico esse trabalho a minha  
família, pelo amor incondicional,  
educação, apoio e incentivo.  
E a minha companheirinha, Princesa,  
que esteve ao meu lado durante  
todo o mestrado e agora deixa  
uma saudade imensa.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus.

Aos meus queridos pais, por TUDO...pelo amor, carinho, ensinamentos, exemplos, incentivos, força e por estarem sempre ao meu lado.

À minha irmã, Bianca, pelo companheirismo, amizade, alegrias, brincadeiras e saber que posso contar sempre com você.

À toda minha família, por me incentivar e toda nossa união.

À Prof<sup>a</sup> Claudia, pela orientação durante a graduação e no mestrado. Obrigada por acreditar em mim, me deixar crescer dentro do laboratório, pela paciência e por todos os ensinamentos.

À todos da equipe LEFA, Luciana, Carlos, Natara, Nadjha, Angélica, Déia, Cássia, Thais, Millena, Thiego, Matheus, Laura, Prof<sup>a</sup>. Juliana, Prof. Paulo e aos que já saíram do laboratório, mas que também fizeram parte dessa etapa de mestrado, Alexandre, Débora, Fernanda, Kelly, Carol, Claudinha, obrigada pela convivência, companheirismo e ajuda todo esse tempo. Sem vocês meu trabalho não sairia. Obrigada aos aventureiros que foram à campo comigo, a ajuda de vocês foi fundamental.

Em especial gostaria de agradecer a Luciana e ao Carlos, meus parceiros de campo e de laboratório, pela ajuda na montagem dos experimentos, nas amostragens, no laboratório, pelas milhões de dúvidas tiradas, pelas discussões de protocolos, sem vocês com certeza todo esse trabalho seria mais difícil. Obrigada pela amizade de vocês.

Ao Tiago, meu amor, por estar ao meu lado sempre, por deixar meus dias mais felizes, por me fazer rir, me ajudar nos momentos difíceis, ter me ajudado em campo e no laboratório quando precisei, pela paciência comigo durante os momentos de estresse durante a elaboração desse trabalho e me aturar durante tanto tempo juntos.

Aos meus amigos, em especial Maria Cecília, Lucas Milanez, Mari Hertel, Thaís e Cinthia, obrigada por fazer parte da minha vida, por estarem comigo durante todo o mestrado, por toda convivência, aprendizado, carinho e amizade. E que por mais a vida nos levar a caminhos diferentes, vou levar vocês comigo sempre.

À Millena Cabral por ter realizado as análises de danos genotóxicos.

Ao Wagner Risso pelas análises de metal.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEL, pelo fornecimento dos peixes.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia aquática (INCT-TA) pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida.

Aos órgãos financiadores CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À banca examinadora da qualificação, Prof. Paulo Meletti e Prof<sup>a</sup>. Juliana Simonato, que contribuíram para elaboração do trabalho.

À banca examinadora da dissertação, Prof. Adalto Bianchini e Prof. José Luís Birindelli por aceitarem o convite e por colaborarem com este trabalho.

À todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

LUNARDELLI, B. **Análise de biomarcadores em duas espécies de peixes neotropicais submetidas a testes *in situ* em um rio que recebe efluente de curtume.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

As indústrias de curtimento de couros eliminam grande quantidade e diversidade de contaminantes nos ecossistemas aquáticos e ainda apresentam a problemática decorrente da utilização do cromo no tratamento do couro. Com isso, o objetivo geral desta dissertação foi a aplicação de parâmetros bioquímicos e genotóxicos dos teleósteos *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas*, submetidos a testes *in situ*, para avaliar a qualidade do rio Bandeirantes do Norte (Rolândia-PR, Brasil), o qual recebe efluentes líquidos de um curtume. Para isso foi realizado um trabalho com juvenis de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* no rio Bandeirantes do Norte, durante o inverno, no qual foram analisados biomarcadores bioquímicos e genotóxicos, acúmulo de cromo nos tecidos dos peixes e a concentração de cromo na água e sedimento. Os pontos selecionados foram: ponto A - a montante do curtume, ponto B - próximo ao curtume, pontos C e D - localizados a jusante do curtume. Após 96 h de confinamento em gaiolas, foi realizada coleta de sangue e retirada dos tecidos dos animais e amostras de água e sedimento foram coletadas em todos os pontos. Os resultados mostraram maior concentração de cromo na água e sedimento do ponto B em comparação com o local sem influência do curtume, assim como maior acúmulo de cromo no fígado dos peixes expostos nesse ponto. Os animais expostos no ponto B apresentaram aumento na atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e da glutathione S-transferase (GST) e no conteúdo de glutathione (GSH) e proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT). Esses resultados indicam maior contaminação deste ponto, decorrente do efluente líquido eliminado próximo a este local, causando alterações biológicas nos animais expostos. O segundo trabalho foi realizado com *P. lineatus* e *S. notomelas* submetidos a testes *in situ*, no verão, nos mesmos pontos do rio Bandeirantes do Norte e foram analisadas alterações nos mesmos biomarcadores. Com os resultados pode-se aplicar o Índice Integrado das Respostas dos Biomarcadores (IBR), para cada ponto. Foram observadas várias alterações nos biomarcadores analisados, nas duas espécies confinadas nos diferentes pontos. Os pontos localizados próximo ao curtume (B e C) foram os locais que apresentaram os maiores valores de IBR para as duas espécies. Assim, foi possível concluir que o efluente eliminado pelo curtume causa comprometimento da qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte, com maior contaminação do ponto B, localizado logo após o curtume, resultando em alterações bioquímicas e acúmulo de cromo nos animais expostos esse ecossistema contaminado.

**Palavras-chaves:** Biotransformação. Bioacumulação. Cromo. Estresse oxidativo. Genotoxicidade. *Prochilodus lineatus*. *Serrapinnus notomelas*.

LUNARDELLI, B. **Analysis of biomarkers in two neotropical fishes submitted to *in situ* tests in a river that receives tannery effluents.** 2014. 107 p. Master Dissertation (Master in Biological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2014.

## ABSTRACT

The industries of leather tanning eliminate large amount and diversity of contaminants in aquatic ecosystems and still have the problems arising from the use of chromium in the treatment of leather. Thus the objective of this study was the application of biochemical and genotoxic parameters of teleost *Prochilodus lineatus* and *Serrapinnus notomelas* submitted to *in situ* tests in order to assess the quality of Bandeirantes do Norte River (Rolândia - PR, Brazil), which receives effluents from a tannery. For that it was performed one work with juveniles of *P. lineatus* submitted to *in situ* tests in Bandeirantes do Norte River, during the winter, and biochemical and genotoxic biomarkers, chromium accumulation in fish tissues and the concentration of chromium in water and sediment were analyzed. The selected sites were: site A - upstream of the tannery, site B - near the tannery, sites C and D - downstream of the tannery. After 96 h of confinement in cages, blood collection and removal of tissues of animals was carried and water and sediment samples were collected at all sites. Chromium accumulation was determined in liver, kidney and muscle samples. The results showed higher concentrations of chromium in water and sediment from site B in comparison with the other sites and a higher accumulation of chromium in liver of fish caged at site B. Fish from site B showed an increase in activity of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST), content glutathione (GSH) and metallothionein-like proteins (MT-like). These results indicate the higher contamination of site B, as the result of the input of liquid effluents in this location, causing biological changes in the exposed animals. A second study was performed with *P. lineatus* and *S. notomelas* submitted to *in situ* tests in the same sites as the other study, but during the summer, and changes in the same biochemical and genotoxic biomarkers were analyzed. The results obtained were used to calculate an index of integrated biomarkers responses (IBR) for each site. Several changes were observed in the biomarkers analyzed in the two fish species confined in different sites. For both species IBR values showed different patterns, indicating the points with higher contamination. The points near the tannery (B and C) were the sites that showed higher IBR for both species. Thus, it is concluded that the effluent eliminated by the tannery effluent causes the impairment of Bandeirantes do Norte River, with higher contamination at point B, located just past the tannery, resulting in biochemical changes and accumulation of chromium in animals exposed to this contaminated ecosystem.

**Keywords:** Biotransformation. Bioaccumulation. Chromium. Oxidative stress. Genotoxicity. *Prochilodus lineatus*. *Serrapinnus notomelas*.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	11
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1 Contaminação Aquática.....	12
1.2 Poluição Causada por Curtumes .....	13
1.3 Cromo nos Efluentes Líquidos.....	19
1.4 Bioacumulação de Metais.....	20
1.5 Biomonitoramento.....	21
1.5.1 <i>Modelo experimental</i> .....	23
1.5.2 <i>Teste de toxicidade in situ</i> .....	25
1.6 Biomarcadores .....	25
1.6.1 <i>Enzimas de biotransformação</i> .....	27
1.6.2 <i>Estresse Oxidativo</i> .....	30
1.6.3 <i>Antioxidantes</i> .....	31
1.6.4 <i>Danos Oxidativos</i> .....	32
1.6.5 <i>Acetilcolinesterase</i> .....	35
1.6.6 <i>Metalotioneínas</i> .....	36
1.7 Resposta Integrada de Biomarcadores: IBR.....	37
2 OBJETIVOS .....	38
2.1 Objetivo Geral .....	38
2.2 Objetivos Específicos .....	38
3 REFERÊNCIAS.....	39
4 MANUSCRITO I .....	49
4.1 INTRODUÇÃO .....	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1 Locais dos Testes in situ .....	52
4.2.2 Delineamento experimental .....	53
4.2.3 Acúmulo de cromo na água, no sedimento e nos tecidos.....	54
4.2.4 Biomarcadores bioquímicos .....	54
4.2.5 Ensaio do Cometa .....	57
4.2.6 Análises estatísticas .....	58
4.3 RESULTADOS.....	58

<b>4.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>4.6</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>MANUSCRITO II .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>5.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Locais dos Testes in situ .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Biomarcadores bioquímicos .....</b>	<b>84</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Ensaio do Cometa .....</b>	<b>86</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR).....</b>	<b>87</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>5.5</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>100</b>
<b>5.6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>106</b>

## **APRESENTAÇÃO**

O presente trabalho está constituído de uma introdução geral, que visa apresentar o assunto a ser tratado na forma de uma breve revisão bibliográfica, apresentando os principais elementos teóricos necessários para a compreensão do tema abordado. Em seguida estão apresentados os objetivos do trabalho e as referências utilizadas para elaboração da introdução. A parte prática do trabalho está dividida em dois manuscritos completos, referentes a dois experimentos distintos. Cada manuscrito apresenta uma breve Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. Os dois experimentos apresentam algumas semelhanças em suas metodologias, como foram realizados nos mesmos locais e a maioria das análises dos biomarcadores foram as mesmas. Assim, alguns trechos dos textos tornaram-se inevitavelmente repetitivos para que cada uma das metodologias fosse descrita completamente. Como último item da dissertação, são apresentadas considerações finais sobre o trabalho como um todo.

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Contaminação Aquática**

Os ambientes aquáticos estão sendo cada vez mais prejudicados pela poluição, decorrente do crescimento exacerbado da industrialização e da urbanização e suas atividades: produção, consumo e eliminação de produtos e resíduos. Mais de um terço da água doce acessível é utilizada em atividades industriais, agrícolas e domésticas (FREIRE et al., 2008). A poluição aquática pode ser definida como uma alteração química e/ou física de um corpo d'água decorrente do despejo de substâncias que podem impossibilitar a utilização da água (PEREIRA, 2004). Diversos compostos introduzidos nos ecossistemas aquáticos têm contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000).

Águas superficiais podem ser contaminadas por algumas fontes de poluição, as naturais, como chuvas e escoamento superficial, e decomposição de vegetais e animais; a poluição agropastoril, causada por agrotóxicos, fertilizantes, excremento de animais e erosão; a poluição urbana, provenientes dos esgotos domésticos; poluição industrial, oriunda dos resíduos industriais; e a poluição acidental, quando ocorre derramamento de contaminantes atingindo corpos d'água (LINS et al., 2010).

Além das diferentes fontes de poluição mencionadas, os contaminantes podem ser inseridos no ambiente aquático por duas vias principais de poluição, a pontual e a difusa. A poluição pontual ocorre com descarga direta de efluentes em um ponto específico do corpo hídrico, sendo principalmente despejos industriais, urbanos e domésticos, com os poluentes apresentando-se em elevadas concentrações. A poluição difusa é caracterizada pela entrada de contaminantes por diversos pontos de origem ao longo do rio, não apresentando um local específico de origem, como o escoamento superficial e a deposição atmosférica de resíduos agrícolas e urbanos, apresentando concentrações mais baixas dos poluentes, porém sujeitos ao acúmulo progressivo com o tempo (DOUST et al., 1994).

## 1.2 Poluição Causada por Curtumes

O setor industrial é um dos grandes responsáveis pela contaminação das águas, seja pela falta de tratamento de seus rejeitos antes de despejá-los nos rios, ou por acidentes que propiciam o vazamento de muitos poluentes nos ecossistemas aquáticos. Este também é a principal e mais diversificada fonte de introdução de metais no ambiente aquático. Destacam-se as indústrias de curtimento de couros (curtumes), as quais eliminam grande quantidade de efluentes nos ecossistemas aquáticos fluviais, apresentando a problemática decorrente da utilização do cromo no tratamento do couro (JORDÃO et al., 1999).

Apesar da tentativa de redução das emissões de poluentes, com a implantação de sistemas de controle e estações de tratamento por algumas indústrias, a carga de efluentes lançados nos cursos d'água ainda é consideravelmente elevada, em razão da diversidade de poluentes e principalmente do grande número de curtumes que ainda não estão dentro das normas de segurança (JORDÃO et al., 1999). Mesmo com a redução da emissão de poluentes, muitos compostos tóxicos originários dos curtumes ainda estão presentes nas águas e sedimentos, constituindo um risco potencial ao meio ambiente, com impacto direto ou cumulativo sobre a vida aquática e, em última instância, sobre a saúde humana (RODRIGUES, 2007). Essas considerações colocam a indústria de curtume entre as mais poluidoras, mesmo com o surgimento de uma preocupação ambiental sobre o destino dos resíduos provenientes do tratamento de couros (JORDÃO et al., 1999).

O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, com 14,4% do rebanho bovino mundial e foi o segundo maior produtor e exportador de couros em 2012, com cerca de 45 milhões de couros produzidos (BRAZILIAN LEATHER, 2013), representando aproximadamente 12,7% da produção mundial de couros naquele ano (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2013). As regiões Sul e Sudeste brasileiras juntas são responsáveis por cerca de 70% da produção total de couro do país e registram o maior número de curtumes (SANTOS et al., 2002). O Paraná está dentre os principais estados brasileiros exportadores de couro, com 11,6% da exportação nacional, São Paulo com 20,3%, o Rio Grande do Sul com 19,8% e Goiás com 12,5% (CICB, 2013).

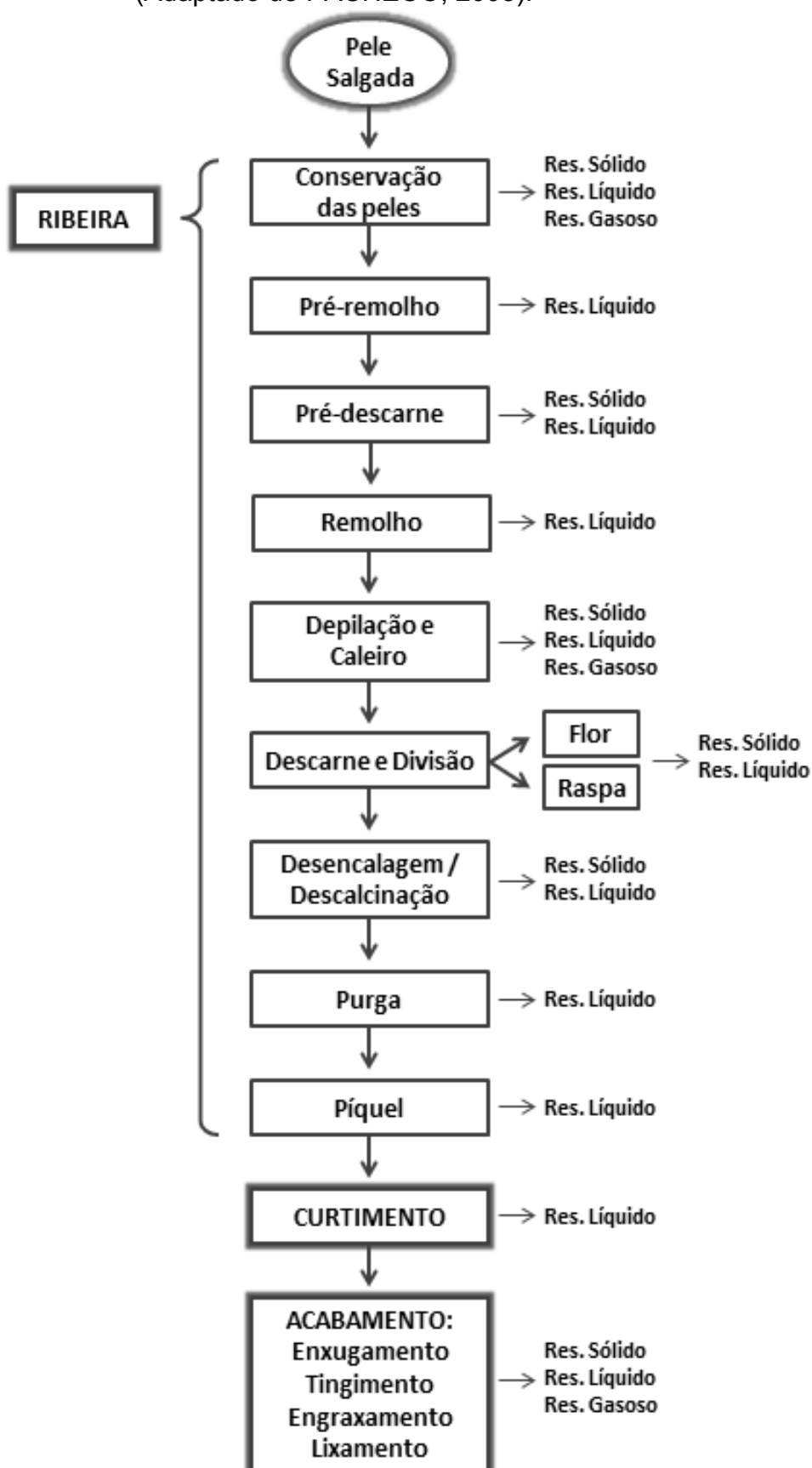
Para a produção do couro, a pele do animal passa por um processo de transformação, constituído de limpeza, de estabilização (curtimento) e de acabamento, para a então confecção de calçados, móveis e outros produtos. De toda pele “verde”

(não tratada), bruta úmida e salgada, que chega a um curtume, apenas cerca de 30 a 35% resultará em couro tratado. O restante da pele, juntamente com o excesso de produtos químicos e o grande volume de água utilizados nas diferentes etapas do tratamento, constitui os resíduos sólidos e líquidos. Esses resíduos possuem concentrações elevadas de cromo (Cr), sulfetos, cal e outros compostos inorgânicos e orgânicos, que podem contaminar o ambiente (OLIVEIRA, 2008).

O processo de produção do couro é dividido em três etapas principais: a ribeira, o curtimento e o acabamento (Figura 1). Na ribeira, todos os processos são realizados em meio aquoso. Inicialmente a pele “verde” é hidratada (etapa de pré-remolho), ocorre a limpeza e eliminação das diferentes partes e substâncias (gordura, extração de proteínas e materiais interfibrilares) que não irão constituir o couro (etapa de pré-descarne e remolho). Nesta etapa, os produtos químicos mais utilizados são: hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, tenso ativos não iônicos, bactericidas e enzimas proteolíticas. A pele então é depilada (etapa de depilação), ocorre remoção dos pelos e do sistema epidérmico, e na etapa de caleiro ocorre abertura e intumescimento da estrutura fibrosa e ação sobre as gorduras, preparando a pele para reagir com os produtos químicos do curtimento. Os produtos químicos mais utilizados nessas etapas são: cal hidratada (20,0 a 50,0 g kg<sup>-1</sup> de pele) e sulfeto de sódio (20,0 a 40,0 g kg<sup>-1</sup> de pele). Nesse sistema, o pH fica em torno de 11,5 a 12,0 (MARTINES, 2005; PACHECO, 2005).

Também são incluídas na etapa de ribeira, o descarne para eliminar os materiais aderidos ao tecido subcutâneo e adiposo e a divisão da pele nas camadas superior e inferior, flor e raspa, respectivamente. A flor dará origem ao couro e a raspa constituirá resíduo sólido dessa etapa. Em seguida, a pele passa pelo processo de desencalagem (ou descalcinação) para remoção de substâncias alcalinas, utilizando mistura de ácidos (sulfúrico, clorídrico, láctico, fórmico, acético, entre outros), sais amoniacais, tais como cloreto de amônio e sulfato de amônio e sais ácidos como o bissulfito de sódio. Na etapa da purga, enzimas proteolíticas são utilizadas para limpar a estrutura fibrosa da pele. Juntamente com sulfato de amônio, bissulfito de sódio ou ácidos orgânicos utilizados na etapa anterior, as enzimas, neutralizam a alcalinidade das peles e retiram materiais. E na etapa de píquel, última do processo de ribeira, também considerada de pré-curtimento, são utilizados mais produtos químicos, como cloreto de sódio, ácido sulfúrico e ácido fórmico, para preparar as fibras de colágenos para facilitar penetração dos produtos do curtimento (MARTINES, 2005; PACHECO, 2005).

**Figura 1** - Diagrama esquemático dos processos de fabricação do couro e resíduos produzidos nas operações de ribeira, curtimento e acabamento (Adaptado de PACHECO, 2005).



O curtimento consiste na transformação das peles, pré-tratadas na ribeira, em materiais estáveis e imputrescíveis, ou seja, a transformação das peles em couros. O curtimento pode ser classificado em três tipos principais: mineral, vegetal e sintético. O curtimento vegetal, com taninos vegetais, é geralmente utilizado para produção de solas e de alguns tipos especiais de couro. No curtimento sintético são empregados resinas ou taninos sintéticos, que proporcionam um curtimento mais uniforme e aumentam a penetração de outros curtentes, propiciando um melhor tingimento posterior. O curtimento vegetal e sintético são mais caros, relativamente aos outros curtentes, e são mais usados como auxiliares de curtimento (PACHECO, 2005; OLIVEIRA, 2008).

O curtimento mineral é utilizado mundialmente, pois apresenta como vantagens o tempo relativamente curto de processo e a qualidade que confere aos couros. Nessa etapa ocorre o aumento da estabilidade de todo o sistema colágeno, diminuindo a capacidade de intumescimento do mesmo, tornando a pele resistente ao calor e ao desgaste. O cromo é utilizado como reagente curtente, a fonte de cromo normalmente é o sal sulfato básico de cromo  $\text{CrOHSO}_4$ , onde o metal se encontra no estado trivalente ( $\text{Cr}^{+3}$ ). A reatividade do cromo com a pele é afetada pelo pH da solução de Cr (III) e ocorre em duas etapas: difusão e fixação do sal de cromo. Na difusão, a penetração dos sais de Cr (III) em toda a espessura da pele é facilitada em meio ácido (originado na etapa de pique). Na etapa de fixação ocorre um aumento da alcalinidade e temperatura, fazendo com que o complexo de cromo reaja com o colágeno da pele, promovendo a fixação do Cr (III) (MARTINES, 2005; PACHECO, 2005; OLIVEIRA, 2008).

Visualmente, o couro curtido com cromo tem aspecto umedecido, de cor azul, chamado de couro "wet blue". Em alguns curtumes, com estruturas mais modernas, a etapa de curtimento é realizada em tambores rotativos separados, onde o efluente gerado, com cromo, pode ser reciclado e reutilizado no processo de curtimento ou conduzido para estações de tratamento de efluente, tratado separadamente. O tratamento consiste na precipitação do cromo em meio básico, formando hidróxido de cromo trivalente ( $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ), o qual origina um resíduo sólido com alta concentração de cromo (MARTINES, 2005). No entanto, esforços crescentes para a substituição do cromo vêm sendo verificados, devido ao seu impacto ambiental potencialmente negativo, utilizando sais de alumínio e zircônio (PACHECO, 2005).

A etapa de acabamento compreende várias operações (como enxugamento, tingimento, engraxamento, secagem e lixamento) por via úmida ou seca, e destina-se a conferir ao couro aspecto e propriedades necessárias ao produto final, como cor básica, resistência à tração, impermeabilidade, maciez, flexibilidade, toque e elasticidade (PACHECO, 2005; OLIVEIRA, 2008).

No processamento convencional do couro, cada 1000 kg de peles salgadas gera somente 200 a 250 kg de couros acabados. Esse processo gera cerca de 600 kg de resíduos sólidos (podendo chegar até 1000 kg), o que implica um potencial de impacto ambiental significativo da geração de resíduos sólidos na produção de couros. Em relação ao consumo de água e geração de efluentes líquidos, o consumo total médio atual do setor brasileiro está estimado em 25-30 m<sup>3</sup> água por tonelada de pele salgada – cerca de 630 litros água por pele salgada, em média, sendo que o volume total de efluentes líquidos gerados é normalmente similar ao total de água captada (PACHECO, 2005).

Os efluentes líquidos provêm dos banhos e lavagens das peles, a maior parte é produzida na fase de ribeira (67,6%), seguido do curtimento (21,7%) (considerando a etapa de píquel) e do acabamento (10,7%). Também devem ser considerados os efluentes líquidos gerados pelas águas de lavagem do piso e das máquinas. Porém, em termos de vazões efetivas de geração e de lançamento para fora dos curtumes (regime de geração e de lançamento), estas dependem dos procedimentos operacionais da estação de tratamento de efluentes (ETE) - também denominada sistema de tratamento de águas residuárias (STAR) - de cada curtume (PACHECO, 2005). Nas ETE os efluentes líquidos passam por tratamentos físico-químicos (tratamento primário) e depois por um tratamento biológico (tratamento secundário), resultando na água residuária, que deve ter qualidade para lançamento no meio ambiente (MARTINES, 2005).

Os resíduos sólidos gerados nos curtumes compreendem os não-curtidos, como sal (gerado na etapa de remoção do conservante das peles), a carnaça (originada na etapa de pré-descarne e que pode ser utilizada como matéria prima na fabricação de sebo, sabões e ração para a alimentação animal), as aparas (são constituídas pelos recortes de peles e outras partes rejeitadas no processamento); os curtidos (aparas de couro curtido e pó de lixadeira); e também o lodo gerado nas ETE (MARTINES, 2005), em grande quantidade, 100 a 200 kg de matéria seca por tonelada de pele salgada processada (PACHECO, 2005). No processo de

acabamento, o couro “wet blue” é aparado para ganhar uniformidade na sua espessura e cortado, esse processo pode gerar cerca de 225 kg de resíduos sólidos por tonelada de pele salgada, considerados pela norma NBR 10.004 (ABNT, 2004) como resíduo industrial perigoso, por conter cromo (OLIVEIRA, 2008).

Também são gerados resíduos gasosos no processamento das peles nos curtumes. Na etapa de ribeira há principalmente liberação de amônia (proveniente da decomposição da parte proteica das peles) e gás sulfídrico e subprodutos aminados, e na etapa de acabamento pode haver emissões de compostos voláteis provenientes de solventes orgânicos e material particulado sólido (no rebaixamento e lixamento) (MARTINES, 2005; PACHECO, 2005).

No quadro a seguir estão representados os principais resíduos gerados pelo processamento do couro e seus impactos ambientais.

**Quadro 1** - Etapas do processo de curtimento e seus resíduos gerados (Adaptado de GANEM, 2007).

<b>Etapa</b>	<b>Poluição</b>	<b>Poluente</b>	<b>Impactos Ambientais</b>
Conservação e Armazenamento de peles	Gasosa	Amônia, compostos orgânicos voláteis	Odor desagradável
	Líquida	Líquidos eliminados pela pele e restos animais, sal	Contaminação das águas superficiais
	Resíduos Sólidos	Restos animais e sal	Contaminação do solo e águas subterrâneas
Ribeira	Gasosa	Gás sulfídrico, amônia, compostos orgânicos voláteis	Odor desagradável
	Líquida	Cal, sulfeto de sódio, cloreto de sódio, aminoácidos e albuminas	Contaminação das águas superficiais
	Resíduos Sólidos	Restos animais	Contaminação do solo e águas subterrâneas
Curtimento	Líquida	Ácidos minerais e orgânicos, cromo e taninos	Contaminação de águas superficiais
Acabamento	Gasosa	Compostos orgânicos voláteis	Odor desagradável
	Líquida	Banhos residuais contendo cromo, taninos, sais, etc.	Contaminação das águas superficiais
	Resíduos Sólidos	Restos de couros, pó de lixa, resíduos de tintas e resinas	Contaminação do solo e águas subterrâneas

### 1.3 Cromo nos Efluentes Líquidos

Dentre as substâncias que compõem os efluentes dos curtumes o que mais se destaca, pelo seu alto potencial de contaminação ambiental, é o metal cromo. Os resíduos com a presença de cromo, segundo a norma brasileira NBR-10004 da ABNT, são classificados como perigosos, necessitando de tratamento e disposição específica (SANTOS et al., 2002).

Normalmente, o cromo utilizado no processamento do couro está na forma de sulfato básico de cromo  $\text{Cr}(\text{OH})\text{SO}_4$ , e atua como ponte, interligando os grupos proteicos do couro, formando um complexo polinuclear de Cr (III), envolvendo a coordenação do cromo com os grupos carboxílicos das cadeias polipeptídicas do colágeno, resultando em um extensivo reticulado destas fibras intermediado pelo Cr (III), proporcionando as características do produto final do couro (RODRIGUES, 2007). A presença do cromo também aumenta as possibilidades de interações iônicas entre o couro “wet blue” e os corantes do tingimento. Isso é proporcionado pelo caráter eletropositivo do Cr, que interage com compostos aniônicos, o que proporciona maior adsorção dos corantes. Tanto nos efluentes líquidos quanto nos resíduos sólidos gerados nos curtumes, há grande quantidade de Cr (III), isso porque aproximadamente 60% do cromo total utilizado interage com a pele durante o curtimento. O restante é rejeitado com os efluentes líquidos, o que acarreta problemas sérios para sua deposição (OLIVEIRA, 2008).

O cromo apresenta diversos estados de oxidação ( $\text{Cr}^{+2}$  a  $\text{Cr}^{+6}$ ), porém nem todos apresentam a mesma estabilidade. O Cr (III) é a forma mais comum na natureza, e também a forma mais estável tanto no solo quanto em soluções aquosas naturais e nas de uso industrial. Este elemento está presente na atmosfera, em alguns alimentos e faz parte de muitos sistemas biológicos, sendo considerado como elemento-traço essencial para o homem. É encontrado naturalmente no solo, a partir do minério cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), amplamente distribuído na superfície terrestre, porém em concentrações variáveis, inferiores às consideradas tóxicas para os diversos organismos (KOTAS e STASICKA, 2000).

A toxicidade do cromo em efluentes industriais depende do estado de oxidação em que é lançado, sendo que o Cr (VI) apresenta maior toxicidade, por ser permeável às membranas celulares. Apesar dos efluentes de curtumes

apresentarem o Cr (III), a oxidação deste à Cr (VI) pode ocorrer dependendo de alguns parâmetros característicos do corpo hídrico receptor do efluente, podendo causar contaminação da fauna, da flora e da população que utilizam estas águas. A conversão do Cr (III) a Cr (VI) e vice-versa podem ocorrer naturalmente no meio, embora a forma hexavalente normalmente se apresente em menor concentração (JORDÃO et al., 1999).

Tanto o cromo Cr (III) quanto o Cr (VI) podem ser biologicamente ativos, porém diferem em sua capacidade de atravessar membranas biológicas. O Cr (III) é potencialmente mutagênico, mas não representa um perigo imediato para células porque é incapaz de atravessar as membranas celulares, embora possam ser ambientalmente transformados em Cr (VI), os quais são altamente permeáveis nas membranas celulares (MATSUMOTO et al., 2006). O Cr (VI) entra nas células através do sistema de transporte de membrana, por transportadores inespecíficos de fosfato ou sulfato, e no interior da célula é reduzido (por redutores não enzimáticos) rapidamente através de intermediários reativos, tais como Cr (V) e (IV), à Cr (III) mais estável, mas que induz efeitos genotóxicos na célula por se ligar diretamente ao DNA (SUGIYAMA, 1992). Além disso durante essa redução ocorre a formação de radicais livres, que podem causar diversos danos celulares (VALKO et al., 2006).

Desta forma, deve-se considerar que mesmo que os efluentes dos curtumes apresentem o Cr (III), o qual apresenta baixa toxicidade na natureza, este pode ter impacto direto ou cumulativo na biota aquática (JORDÃO et al., 1999).

#### **1.4 Bioacumulação de Metais**

Os metais são constituintes naturais da biosfera, pedosfera e litosfera em baixas concentrações, e também participam da constituição de algumas moléculas e de reações nos organismos. Porém, estes elementos podem ser tóxicos e prejudiciais quando em excesso ou bioacumulados, pois não apresentam propriedades biodegradáveis, podendo interferir nos processos fisiológicos normais e em altas concentrações sua presença pode ser fatal (GOEL, 2006).

Os metais em ambientes aquáticos podem estar na sua forma iônica, complexada (principalmente à moléculas orgânicas) e particulada (principalmente como componente dos detritos e da biomassa). Em rios, a carga total de metais depende das características geológicas das bacias de drenagem e do tipo de

atividade humana presente. O transporte desses metais em rios é realizado principalmente sob forma dissolvida ou ligada ao material particulado em suspensão (ESTEVEZ, 1998).

Nos ecossistemas aquáticos, os metais e outros compostos tendem a acumular no sedimento, associados à matéria orgânica ou inorgânica (SHRIVASTAVA et al., 2003) e, dependendo das condições ambientais, podem começar a ser liberados na coluna d'água tornando-se biodisponíveis. Alguns fatores químicos e físicos (pH, oxigênio dissolvido, dureza, temperatura, matéria orgânica, salinidade) da água podem interferir no processo de especiação dos metais (forma iônica do metal) e modificar sua toxicidade (GÓMEZ et al., 1998).

Quando compostos químicos são assimilados e ficam retidos nos organismos ocorre o processo chamado de bioacumulação, ou seja, quando a velocidade de eliminação do composto químico é menor que a velocidade de entrada deste no animal, ocorre o acúmulo do composto. O acúmulo de metais em peixes ocorre através da absorção pela superfície do tegumento (pele e escamas), via respiração (brânquias) e através da alimentação (BURATINI e BRANDELLI, 2006). Segundo Chen e Folt (2000), a concentração de metais na água nem sempre condiz com a concentração de metais na biota, sendo normalmente a concentração na água menor.

A bioacumulação direta (ou bioconcentração) ocorre pelo acúmulo direto do composto químico a partir da água pelas brânquias ou pela pele. Já a bioacumulação indireta, também chamada de biomagnificação, ocorre pelo acúmulo via alimentação com transferência do contaminante de um nível trófico a outro, ou seja ocorre um incremento progressivo de concentrações a partir da fonte de exposição à medida que passam para níveis tróficos mais elevados (VAN DER OOST et al., 2003). Os peixes podem estar sujeitos a ambos os processos, tanto bioconcentração quanto biomagnificação de metais.

## **1.5 Biomonitoramento**

Durante muito tempo o monitoramento ambiental e a avaliação da qualidade da água dos ambientes impactados concentraram-se apenas em análises físicas e químicas. Embora essas análises apresentem informações sobre os níveis de contaminação, não fornecem informações sobre os efeitos os contaminantes nos

sistemas biológicos (LAM, 2009; CAJARAVILLE et al., 2000). A ocorrência de uma determinada substância tóxica no ambiente, detectada por meio de análises químicas, não significa necessariamente que ela está biodisponível, nem podem ser tiradas conclusões sobre seus efeitos nocivos, ou mesmo qualquer efeito mensurável que essa substância possa causar em sistemas biológicos (LAM, 2009). Sendo assim, o uso de animais como ferramentas de monitoramento do meio apresenta a vantagem de detectar os efeitos sub-letais nos organismos (ZHOU et al., 2008). A avaliação dos efeitos dos poluentes aquáticos pode ser realizada por meio de testes de toxicidade. Estes testes estão sendo cada vez mais utilizados para a determinação dos efeitos de contaminantes em organismos aquáticos e também para a avaliação da qualidade da água (FERREIRA, 2003).

O monitoramento para avaliação dos efeitos dos poluentes pode ser realizado utilizando organismos, o chamado “monitoramento biológico” ou “biomonitoramento” (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). O biomonitoramento é o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas (BUSS et al., 2003). Este deve ocorrer de forma integrada, considerando-se conceitos químicos, toxicológicos e biológicos. Assim, é possível compreender os efeitos ecotoxicológicos de ecossistemas contaminados (FENT, 2004).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA – Resolução nº 357/2005) determina que a qualidade dos ambientes aquáticos seja avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas como instrumentos para monitorar e avaliar a situação de corpos d’água. Esses indicadores biológicos abrangem os bioindicadores e os biomarcadores.

Define-se como bioindicador um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento (VAN DER OOST et al., 2003). Bioindicadores também podem ser definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental, alterando suas funções vitais ou acumulando agentes tóxicos ou modificando sua composição química, com isso fornecem informações sobre a situação ambiental (TOTTI et al., 2007).

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois estão presentes em vários ambientes, apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos, sendo considerados

excelentes modelos biológicos. Entretanto, poucas espécies nativas têm sido utilizadas em testes de toxicidade no Brasil e assim, pouco se sabe sobre a sensibilidade das espécies de peixes neotropicais às diversas classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004).

### 1.5.1 Modelo experimental

As espécies de peixes *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915), são nativos da região Neotropical. A espécie *P. lineatus* (Figura 2), pertencente à ordem Characiformes e família Prochilodontidae, popularmente conhecido com curimba ou curimbatá, é amplamente distribuído em toda a bacia do Rio Paraná-Rio Paraguai, em rios do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia, e rio Paraíba do Sul (CASTRO e VARI, 2004). A espécie *S. notomelas* (Figura 3), pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Cheirodontinae, popularmente chamado de pequirá, lambari, lips ou piabinha, é encontrada na Bacia do rio Alto Paraná (MALABARBA, 2003).

**Figura 2** – Foto de um indivíduo jovem de *Prochilodus lineatus*..



Foto: LEFA-UDEL

**Figura 3** – Foto de um indivíduo de *Serrapinnus notomelas*..



Foto: LEFA-UDEL

A espécie *Prochilodus lineatus* possui corpo de porte médio a grande (comprimento total máximo registrado de 74 cm (CASTRO e VARI, 2003)) com coloração clara a prateada com dorso mais escuro, especialmente a região da cabeça, nadadeiras moderadamente escuras, com nadadeira pélvica amarelo-avermelhada, boca terminal com lábios carnudos, com lábio superior mais espesso, e dentes diminutos finos e depressíveis implantados nos lábios. Apresenta um pequeno osso, formando um espinho, antes da nadadeira dorsal. É uma espécie migradora e apresenta hábito alimentar detritívoro (CASTRO e VARI, 2004; BRITTO, 2008). Devido ao seu hábito alimentar é considerada uma espécie adequada para

estudos de monitoramento ambiental, pois está exposta a qualquer tipo de substância que possa estar depositada no sedimento, incluindo compostos tóxicos. Além disso, esta espécie é considerada como um bioindicador em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais poucos impactados (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). A sensibilidade desta espécie está comprovada em vários estudos de ecotoxicologia, tanto testes de toxicidade realizados *in situ* (em ribeirões do Município de Londrina (WINKALER, 2002), em um ribeirão urbano de Londrina (CAMARGO e MARTINEZ, 2006, 2007) e em um ribeirão de região agrícola em Londrina (LUNARDELLI, 2011)) como em laboratório expondo o *P. lineatus* à fração solúvel do óleo diesel (VANZELLA et al., 2007; SIMONATO et al., 2008), ao agrotóxico Roundup (CAVALCANTE et al., 2008), ao glifosato (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), ao alumínio (CAMARGO et al., 2009), ao chumbo (MONTEIRO et al., 2011), ao cobre e (NASCIMENTO et al., 2012), à atrazina (SANTOS e MARTINEZ, 2012) e à cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (GARCIA e MARTINEZ, 2012).

Os peixes da espécie *S. notomelas* apresentam corpo claro, nadadeiras transparentes, as nadadeiras dorsal e anal são escuras na porção proximal, dentes multi-cuspidados em uma série no prémaxilar e possui na nadadeira caudal uma mancha escura ovalada longitudinalmente na base do pedúnculo caudal seguida de pequena área de coloração amarela (DA GRAÇA e PAVANELLI, 2007; BRITTO, 2008). São peixes pequenos com comprimento total máximo de aproximadamente 4 cm (DA GRAÇA e PAVANELLI, 2007). Podem ocupar toda a coluna d'água, são considerados algívoros, consomem principalmente algas filamentosas e podem persistir em uma grande variedade de habitats (LUIZ et al., 1998). Suas características propiciam respostas, químicas, fisiológicas e biológicas, rápidas da espécie às variações ambientais (PIANA et al., 2006). Essa espécie é recomendada para uso em testes de toxicidade aquática pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993), pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1990) e pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1990), que a utiliza em seus testes, porém ainda são poucos os trabalhos científicos que utilizam esta espécie em teste de toxicidade.

### **1.5.2 *Teste de toxicidade in situ***

Trabalhos de campo são ferramentas úteis em Ecotoxicologia principalmente porque integram relevância ecológica em testes de toxicidade, representando mais fielmente a realidade a qual os animais estão expostos (CASTRO et al., 2004). Estes testes apresentam a vantagem de avaliar em tempo real os processos dinâmicos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos, considerando todas as variações que possam ocorrer, como mudanças de temperatura, pluviosidade ou pela presença de diferentes concentrações de poluentes (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). Também pode-se padronizar o sexo e a idade dos animais, fatores que podem influenciar nas respostas apresentadas. Outra vantagem dos estudos em campo é de não haver a necessidade de se extrapolar os resultados obtidos para o ecossistema, já que refletem a realidade (CAMARGO, 2004).

Nesse tipo de teste, os organismos sadios são mantidos em gaiolas no local que se deseja estudar. Os animais ficam expostos no ambiente durante determinado tempo e depois analisa-se a mortalidade, crescimento e reprodução, ou parâmetros biológicos ou comportamentais (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). Tais parâmetros podem ser bioquímicos, genéticos, fisiológicos e histológicos, podendo constituir os chamados biomarcadores. O uso de múltiplos biomarcadores fornece uma melhor caracterização de uma dada área durante um período de tempo em estudos de biomonitoramento. Entretanto, a interpretação dos resultados obtidos em estudos de campo é sempre muito complicada, pois vários fatores que não podem ser controlados podem interferir e influenciar as respostas a variáveis analisadas (ZANETTE et al., 2006).

## **1.6 Biomarcadores**

Os biomarcadores são definidos como qualquer resposta e/ou efeito de um contaminante ambiental, no nível individual, medidos no organismo ou seus produtos, que indica desvio do status normal, e não são detectadas no organismo intacto (VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996). Ou seja, são alterações que ocorrem nos níveis celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, que podem ser mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos e órgãos dentro do organismo e que podem indicar a exposição e/ou efeito de um xenobiótico (LAM, 2009). Desta

forma, os biomarcadores são capazes de prenunciar a incidência de um evento de contaminação ambiental ou uma doença (WHO, 2001).

Os biomarcadores refletem a interação entre o sistema biológico e os contaminantes, podendo ser um ou mais, e são normalmente sinais precoces de alterações biológicas a serem detectados nos organismos. Além de serem sensíveis a diversas classes de poluentes, também apresentam relativamente alta especificidade, dependendo do biomarcador, e fornecem informações sobre o efeito metabólico causado pelo xenobiótico (VAN DER OOST et al., 2003).

O uso destes biomarcadores no monitoramento ambiental oferece mais algumas vantagens, pois são capazes de medir os efeitos sub-letais promovidos pela interação do contaminante com o organismo, podem detectar ações de contaminantes conhecidos ou não, e ainda são aplicáveis para estudos laboratoriais e em campo (MARTINEZ, 2006; JESUS e CARVALHO, 2008). Outra importante característica dos biomarcadores é a possibilidade de antecipar alterações em níveis superiores de organização biológica, como populações, comunidades ou ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000).

Desta forma, auxiliam na priorização de sistemas de controle e estratégias de intervenção, preventivas ou de remediação, que possam ser desenvolvidas antes que danos ambientais e ecológicos irreversíveis aconteçam (CAJARAVILLE et al., 2000; MARTINEZ, 2006; JESUS e CARVALHO, 2008). Sendo assim, os biomarcadores têm sido empregados em diversos países em estudos de monitoramento de ecossistemas aquáticos impactados, como por exemplo: em Hong Kong, na China (CHAN, 1995), nos EUA (ROBERTS e ORIS, 2004), no Brasil (CAMARGO e MARTINEZ, 2006), na Grécia (KONSTANTINOOU et al., 2006), na Suécia (ABRAHAMSON et al., 2007); no México (TEJEDA-VERA et al., 2007), na Ucrânia (FALFUSHYNSKA e STOLYAR, 2009), na Argentina (CAZENAVE et al., 2009) e no Paquistão (SHAKIR et al., 2012).

Em estudos ecotoxicológicos aconselha-se o uso de diversos tipos de biomarcadores simultaneamente, pois a avaliação de um único biomarcador pode não refletir de forma completa os danos à saúde dos organismos ou as adaptações destes frente aos ambientes impactados ou até mesmo resultar em interpretações errôneas do que está acontecendo (CAJARAVILLE et al., 2000; ZORITA et al., 2008). Os biomarcadores bioquímicos mais estudados são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, as enzimas de defesa

antioxidante, os antioxidantes não enzimáticos e a ocorrência de danos oxidativos nos diferentes tecidos (MARTINEZ, 2006).

### **1.6.1 Enzimas de biotransformação**

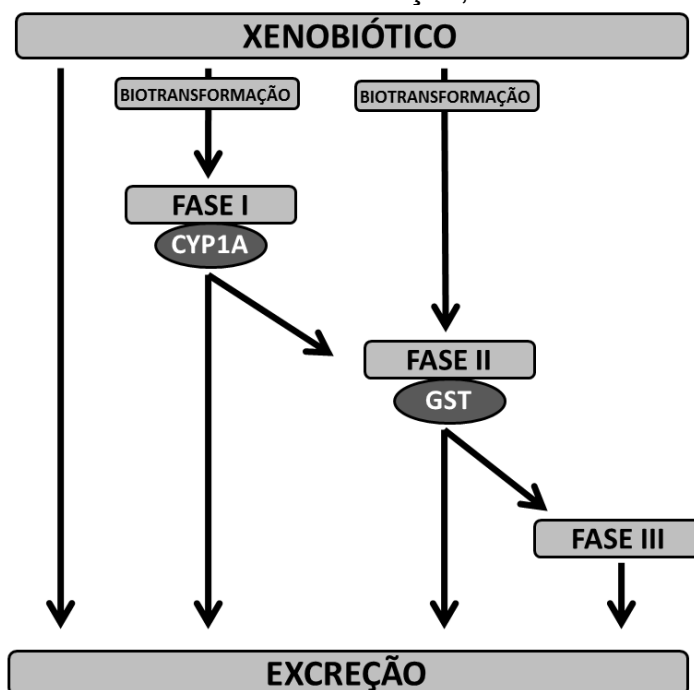
Dentre os mais sensíveis biomarcadores bioquímicos estão as enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação, e em peixes as atividades destas enzimas podem ser tanto inibidas quanto induzidas frente à exposição aos xenobióticos (BUCHELI e FENT, 1995). A biotransformação de xenobióticos envolve sistemas enzimáticos diferentes, que vão atuar em diferentes substratos orgânicos. De modo geral, os xenobióticos orgânicos podem ser eliminados pelo organismo em sua forma original (sem alteração de sua estrutura) ou podem ser biotransformados, ter suas estruturas alteradas para que assim sejam mais facilmente eliminados (VAN DER OOST et al., 2003).

Essas enzimas apresentam como principal função alterar a estrutura química dos compostos orgânicos, formando derivados mais polares, convertendo estruturas lipofílicas em estruturas hidrofílicas, e normalmente ocorre redução ou perda dos efeitos toxicológicos do xenobióticos. Desta forma, acontece a conversão de um composto tóxico em uma forma menos tóxica, para que assim essas substâncias possam ser mais facilmente excretadas, sendo este processo também conhecido como detoxificação (AZEVEDO e DE LIMA, 2003; VAN DER OOST et al., 2003). As enzimas de biotransformação não apresentam especificidade a algum ou grupo de compostos químicos, reagindo da mesma forma por meio de reações de oxidação e redução independentemente do tipo de substância (AZEVEDO e DE LIMA, 2003). Porém, algumas vezes os produtos das reações de biotransformação podem ser mais tóxicos ou reativos que o composto original, reação chamada de bioativação (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

O processo de biotransformação é dividido normalmente em duas fases principais (I e II) e pode apresentar também uma terceira fase de eliminação (Figura 4). A fase I envolve reações de oxidação, hidrólise e redução, conferindo maior polaridade aos xenobióticos por inserir ou disponibilizar grupamentos hidroxila (-OH), amina (-NH<sub>2</sub>), carboxila (-COOH) ou sulfidril (-SH), tornando os compostos mais hidrofílicos. Os produtos desta fase podem ser eliminados diretamente ou submeter-se a transformações de fase II. As enzimas de fase II são responsáveis

pela conjugação de compostos endógenos (como acetato, cisteína, ácido glucurônico, sulfato, glicina, glutamina ou glutatona) com os xenobióticos ou com os metabólitos gerados na fase I ou também produtos da peroxidação lipídica, para serem detoxificados ou para acelerar sua eliminação. As reações de fase II podem ocorrer sem que reações de fase I tenham ocorrido, dependendo se o contaminante apresenta grupamentos funcionais onde as enzimas de fase II irão atuar (VAN DER OOST et al., 2003; NEWMAN e CLEMENTS, 2008). A fase III do processo de biotransformação está relacionada com a eliminação dos metabólitos provenientes da fase II e xenobióticos através de glicoproteínas-P (P-gp) associadas às membranas plasmáticas, processo esse também chamado de mecanismo de resistência a multixenobiótico (MXR). Como os xenobióticos são transformados em compostos mais hidrofílicos nas fases I e II, a difusão destes para fora das células através da bicamada lipídica é reduzida, necessitando de proteínas de transporte ativo (as P-gp) que facilitam o efluxo destes compostos (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

**Figura 4** - Processo de biotransformação, envolvendo fase I, II e III



Adaptado de (VAN DER OOST et al., 2003).

Em peixes há dois tipos principais de enzimas envolvidas no processo de biotransformação: as enzimas de fase I, dentre as quais se destacam as enzimas da

subfamília CYP1A, e as enzimas de fase II, como as enzimas da família da glutathione S-transferase (GST) (VAN DER OOST et al., 2003).

Reações de fase I são mediadas pelas enzimas da família do citocromo P450 (CYP 450), que são hemoproteínas com um átomo de ferro no seu núcleo envolvidas no transporte de elétrons. Essas enzimas estão localizadas na membrana do retículo endoplasmático e estão presentes em diversas espécies, desde bactérias até vertebrados. Além de estarem envolvidas nos processos de metabolização de muitos xenobióticos, também metabolizam compostos endógenos (como esteroides e ácidos graxos) (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

No processo de biotransformação de fase I, o P450 necessita oxidar um NADPH para ativar o oxigênio e, finalmente, inserir um átomo de oxigênio na molécula do xenobiótico (ZANGAR et al, 2004). Com isso, um produto indesejado na biotransformação de fase I é a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela oxidação do NADPH pelo P450, contribuindo significativamente com a formação de ERO nas células (SEVANI et al., 1990).

O fígado é o principal local de expressão do P450, mas outros tecidos também contêm níveis mais reduzidos de enzimas P450. Em peixes, a fase I é mediada principalmente pela subfamília CYP1A. A subfamília CYP1A catalisa a enzima etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), quando ocorre indução da CYP1A na presença do xenobiótico, esta indução pode ser detectada indiretamente através da medida da atividade da enzima EROD. Geralmente, é observada uma boa correlação entre níveis proteicos de CYP1A e atividade da EROD (VAN DER OOST et al., 2003).

As enzimas de biotransformação de fase II de maior interesse como biomarcadores em testes toxicológicos são as glutathione S-transferases (GST). As GSTs estão envolvidas na conjugação de moléculas endógenas, como a glutathione (GSH) e ácido glucurônico, com compostos eletrofílicos, como o xenobióticos diretamente (sem passar pela fase I) ou seus metabólitos provenientes da fase I de biotransformação e também a produtos da peroxidação lipídica, resultando desta forma em produtos mais solúveis em água, menos tóxicos e ionizáveis, facilitando assim a sua excreção. Desta forma, reduzem a probabilidade de que esses compostos tóxicos se liguem a outras moléculas do organismo (VAN DER OOST et al., 2003). Os produtos da conjugação formados pela atividade da GST são geralmente excretados na bile, através de mecanismos de extrusão dependentes de

ATP, ou também são degradados e acetilados formando ácidos mercaptúricos, os quais são excretados na urina (HERMES-LIMA, 2004).

As GSTs são uma família de enzimas multifuncionais, encontradas principalmente no citosol das células, mas também presentes no núcleo (VAN DER OOST et al., 2003). São amplamente distribuídas em todas as formas de vida, sendo encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Existem diferentes isoformas identificadas de GST e podem ser agrupadas em diferentes classes: Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta e Omega, porém em laboratório mede-se, geralmente, a atividade total da GST (HERMES-LIMA, 2004). Estas enzimas também apresentam o papel de proteínas carreadoras de compostos lipofílicos endógenos ou xenobióticos até os locais de ocorrência da biotransformação de fase I (DI GIULIO et al., 1995). Algumas isoformas da GST, como as GSTs da classe Pi, são responsáveis pela inativação de produtos da lipoperoxidação e inativação de espécies reativas de oxigênio (DOYEN et al., 2005).

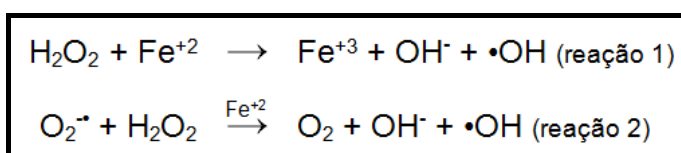
### **1.6.2 Estresse Oxidativo**

A entrada de um xenobiótico na célula pode causar um aumento na produção de ERO. Contaminantes orgânicos e metais podem estimular a produção de ERO de diferentes maneiras, por ciclo redox, reações redox de metais de transição, ou também durante os processos de biotransformação, bem como durante o metabolismo celular basal, podem ser formadas ERO, tais como ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (LIVINGSTONE, 2001). Se as ERO não forem adequadamente combatidas pelos antioxidantes, ocorrerá um desbalanço redox pró-oxidantes celulares, que pode resultar no processo de estresse oxidativo, no qual pode haver danos oxidativos nos componentes celulares, tais como: oxidação de proteínas, quebras nas moléculas de DNA, peroxidação lipídica e até a morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

As ERO representam a classe mais importante de espécies de radicais geradas nos organismos. O radical hidroxil pode ser considerado o mais reativo dentre todos os radicais de oxigênio, sendo produzido principalmente quando há um excesso de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Nos organismos, grande parte do  $\cdot OH$  é gerada através da Reação de Fenton com a quebra do  $H_2O_2$

(Figura 5 - reação 1) ou também pode ser formada pela reação de Haber Weiss na presença do  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (Figura 5 - reação 2). A reatividade do ânion radical superóxido, comparada com a do radical  $\cdot OH$ , é muito menor, apesar de bastante variável. Este radical pode ser formado em diversos locais nos organismos, como por exemplo, nos peroxissomos, pela oxidação de moléculas biologicamente importantes (adrenalina, noradrenalina e dopamina). Todavia, a principal fonte de produção do  $O_2^{\cdot-}$  é a cadeia de transporte de elétrons presente nas mitocôndrias. Já o peróxido de hidrogênio é formado espontaneamente nos peroxissomos e nas mitocôndrias. Não é considerado um radical, por não apresentar elétrons desemparelhados, e apresenta uma reatividade química moderada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

**Figura 5** – Reação de Fenton (reação 1) e Reação de Haber Weiss (reação 2).



### 1.6.3 Antioxidantes

Para prevenir danos celulares causados pelas ERO, os organismos aeróbicos apresentam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante. As principais enzimas que participam deste sistema são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx). Quanto aos antioxidantes não-enzimáticos, estes possuem baixo peso molecular e são representados principalmente pelas moléculas hidrossolúveis, glutathione (GSH) e ácido ascórbico (vitamina C), e pelas moléculas lipossolúveis como o  $\beta$ -caroteno (vitamina B) e o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (MARTINEZ, 2006).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a GSH é a que mais se destaca. Este tripeptídeo endógeno, de baixo peso molecular, composto por  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina, é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma das células. É amplamente distribuído em plantas, animais, fungos e bactérias. Está presente nas células principalmente na forma reduzida e um aumento na proporção da forma oxidada (GSSG) indica estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

A GSH tem importante papel antioxidante, pois atua no sequestro de radicais livres, impedindo danos celulares causados por eles. Sua capacidade antioxidante se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo da cisteína altamente polarizável. Considerado um bom redutor, apresentando alta habilidade em doar elétrons a outros compostos. A GSH também apresenta outras funções nas células, tais como: participa no processo de biotransformação de fase II como co-fator para que a GST possa realizar sua atividade catalítica; e participa do processo de defesa antioxidante sendo oxidada pela GPx e reduzida pela GR (HERMES-LIMA, 2004). A GSH pode responder muito bem a contaminação ambiental, variando sua concentração de acordo com o tempo de exposição, sendo assim considerada como um ótimo biomarcador em peixes (MARTINEZ, 2006).

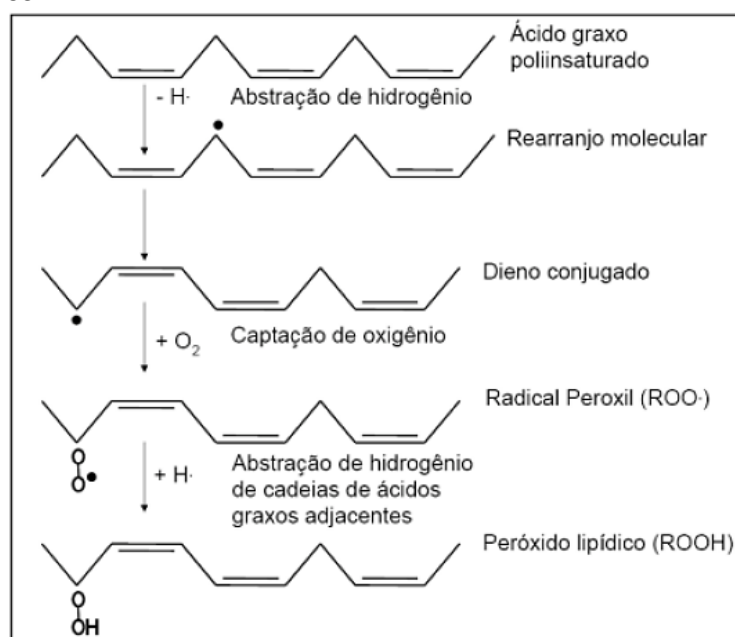
#### **1.6.4 Danos Oxidativos**

O sistema de defesa antioxidante pode não ser suficiente ou adequado para combater as ERO provenientes da metabolização de produtos endógenos e exógenos. Desta forma, ocorre uma alteração do balanço redox, e assim estabelece-se um desequilíbrio pró-oxidante celular, denominado de estresse oxidativo. Quando a célula encontra-se neste estado podem ocorrer danos celulares e teciduais, como danos em proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e quebras no DNA (MASELLA et al., 2005; AMADO et al., 2009). Os eventuais danos biológicos podem servir como ferramenta para entender os efeitos de um poluente no organismo, e podem ser utilizados também como biomarcadores (VALAVANIDIS et al., 2006).

A peroxidação lipídica (LPO) é definida com reação em cadeia iniciada por um radical livre, principalmente pelo radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), esse oxidante causa a quebra dos fosfolipídios de membrana que contém ácidos graxos poli-insaturados. A LPO consiste na incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo de membrana produzindo um hidroperóxido lipídico. O processo de LPO (Figura 6) inicia-se quando uma ERO retira um átomo de hidrogênio do grupo metileno ( $-\text{CH}_2$ ) dos ácidos graxos insaturados (PUFAs) formando um radical carbono ( $-\text{C}\bullet-$ ). Este radical se estabiliza através de um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O radical inicialmente formado pode reagir com um átomo de oxigênio formando o radical peroxil, que é suficientemente reativo para atacar ácidos graxos adjacentes da cadeia lateral, desta forma o radical peroxil pode extrair um átomo de

hidrogênio, formando um hidroperóxido lipídico e resultando em outro radical carbono, continuando as reações em cadeia (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

**Figura 6** - Esquema das reações que ocorrem durante o processo de peroxidação lipídica



(Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

Este processo de lipoperoxidação é considerado um dos maiores causadores de injúria e morte celular. A gravidade dos danos às membranas biológicas consequentes da peroxidação lipídica pode variar, como redução local na fluidez da membrana, alteração na sua permeabilidade, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída substâncias, alteração no fluxo transmembrana e até o rompimento da integridade da bicamada (HERMES-LIMA, 2004).

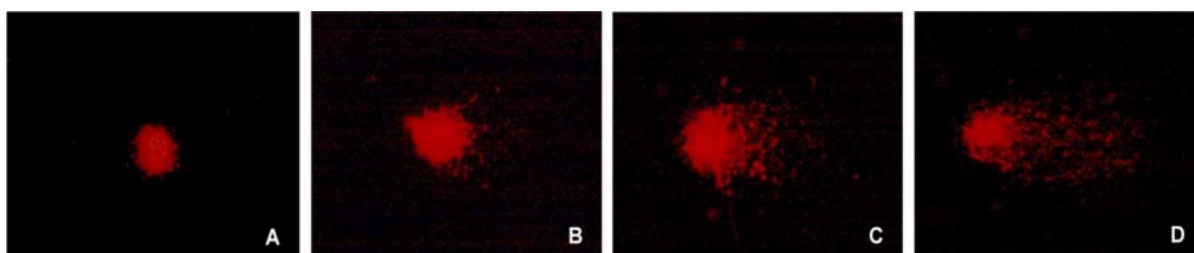
O rompimento da membrana pode produzir uma gama de produtos altamente citotóxicos, como o malondialdeído (MDA). O malondialdeído é um dos produtos finais da LPO, é considerado um composto mutagênico e cancerígeno, e normalmente é empregado em ensaios ecotoxicológicos para quantificar os níveis de peroxidação lipídica através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e alta temperatura, formando um composto fluorescente de cor rosa (HERMES-LIMA, 2004).

Se as espécies reativas de oxigênio não forem adequadamente combatidas dentro do corpo do animal, o estresse oxidativo pode ocasionar danos nas moléculas de DNA (HERMES-LIMA, 2004). Porém nem todos os danos no DNA podem ser classificados como oxidativos, pois existem substâncias, denominadas de genotóxicas, que apresentam a capacidade de interagir, comprometer e danificar a estrutura da molécula do DNA (SHUGART, 2000). Os metais, por exemplos, podem ser considerados agentes genotóxicos, de forma direta e/ou indireta, através da formação das ERO (GALARIS e EVANGELOU, 2002).

Os radicais livres, principalmente o radical hidroxil, se ligam às bases nitrogenadas do DNA, causando modificações nas bases púricas, pirimídicas e na cadeia de desoxirribose. Essas alterações podem resultar em quebras de fita simples ou dupla e formação de cross-links. Também podem ocorrer alterações no DNA através da formação de ligações covalentes do contaminante ou seu metabólito nesta molécula, formando os chamados adutos (TICE et al., 2000; NEWMAN e CLEMENTS, 2008). Esses danos são passíveis de reparos, mas se não forem devidamente reparados, podem induzir mutações (HERMES-LIMA, 2004).

As quebras nas ligações da molécula de DNA interferem na sua integridade e isto pode servir como uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de poluentes em peixes, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis a esse tipo de dano (OHE et al., 2004). O objetivo do ensaio do cometa não é revelar mutações, mas avaliar a genotoxicidade de substâncias através de alterações no material genético que, se não forem corrigidas, podem resultar em mutações (GONTIJO e TICE, 2003). O ensaio do cometa resumidamente consiste em, durante a corrida de eletroforese, fragmentos de DNA migram do centro nuclear mais rápido do que o DNA intacto, dando origem assim a um cometa com cauda (Figura 7) (TICE et al., 2000).

**Figura 7** - Classificação visual dos cometas de acordo com o grau de dano no DNA. A - dano 0 (sem danos); B - dano 1; C - dano 2; D - dano 3 (máximo dano).



### 1.6.5 *Acetilcolinesterase*

Outro tipo de biomarcador bioquímico bastante utilizado é a acetilcolinesterase (AChE), cuja principal função é quebrar a acetilcolina (ACh), durante a transmissão do impulso nervoso, em colina e ácido acético. A AChE encontra-se nas fendas sinápticas e evita a ação contínua da acetilcolina durante o impulso nervoso, mantendo assim o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (VAN DER OOST et al., 2003).

São conhecidos principalmente dois tipos de colinesterases (ChE), a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (BChE), também chamada de pseudocolinesterase. As duas enzimas se distinguem funcionalmente pela especificidade ao substrato, diferente susceptibilidade aos seus inibidores e distribuição tecidual (MONTEIRO et al., 2005). A AChE apresenta elevada afinidade ao neurotransmissor acetilcolina, por outro lado a BChE apresenta maior afinidade pela butirilcolina (BCh) e baixa atividade pela acetilcolina, porém o significado fisiológico para esta enzima ainda não é muito esclarecido para peixes (STURM et al., 2000). De modo geral, nos ensaios com peixes avalia a atividade da AChE no músculo e no cérebro. O tecido cerebral contém predominantemente AChE e o tecido muscular pode conter apenas AChE ou as duas colinesterases juntas, AChE e BChE (STURM et al., 2000; MONTEIRO et al., 2005).

A atividade da AChE é um dos principais biomarcadores utilizados para o monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos, uma vez que essa enzima é inibida por pesticidas organofosfatos e carbamatos (FERRARI et al., 2007). Porém outros estudos comprovam que peixes submetidos a concentrações sub-letais de agrotóxicos podem apresentar alterações na atividade da acetilcolinesterase (FERRARI et al., 2007), como o diflubenzuron (PEREIRA MADUENHO e MARTINEZ, 2008), o Roundup® (MODESTO e MARTINEZ, 2010a), o Roundup Transorb® (MODESTO e MARTINEZ, 2010b), o clomazone (MIRON et al., 2005) e outros pesticidas e herbicidas (SANCHO et al., 2000). Estudos também já indicam a alteração da atividade desta enzima com outros contaminantes, como os metais (FRASCO et al., 2005; ALVES COSTA et al., 2007).

A atividade da AChE é extremamente importante em muitas funções fisiológicas, como na localização de presas, fuga do predador e orientação para o encontro de alimentos (DUTTA e ARENDS, 2003). Alterações na atividade da AChE

podem provocar a superestimulação das fibras musculares ocasionando paralisação e até morte do animal (FERRARI et al., 2007), bem como alterações comportamentais importantes como agitação, tremores, nado errático, letargia, e convulsões (FERNANDEZ-VEGA et al., 2002). Distúrbios na sua atividade podem afetar além dos fatores já citados, como também no equilíbrio, apetite e comportamento reprodutivo (BRETAUD et al., 2000).

#### **1.6.6 Metalotioneínas**

Existem também importantes biomarcadores específicos para exposição a determinadas substâncias, como as metalotioneínas (MTs), as quais estão diretamente relacionadas com a exposição à metais (VIARENGO et al.; 2007). Estas são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, ricas em cisteínas, devido a presença de grupos tiol (-SH) dos resíduos de cisteínas, apresentam uma alta afinidade por íons metálicos livres, se ligando tanto ao excesso de metais essenciais quanto aos não essenciais, desta forma protegendo o organismo dos efeitos desses compostos tóxicos (MONSERRAT et al., 2007). Sendo assim, como função biológica das MTs, destaca-se a detoxificação de metais, pois atuam como quelantes destes compostos quando se encontram em excesso nas células, e também atuam na homeostase de metais essenciais (Cu e Zn), mantendo a concentração destes nas células (MONSERRAT et al., 2007; VIARENGO et al., 2007).

Geralmente, o aumento da expressão de MTs é induzido pelo aumento da concentração de metais que entram no tecido, o que torna estas metaloproteínas biomarcadores diretamente associados à contaminação por metais (MONSERRAT et al., 2007; VIARENGO et al., 2007). Além de atuar como quelantes de metais, as MTs podem atuar como antioxidantes, sequestrando espécies reativas de oxigênio, evitando as possíveis lesões oxidativas causadas pelas ERO (SUZUKI et al., 2002; FALFUSHYNSKA e STOLYAR, 2009).

As metalotioneínas são indicadoras de concentrações sub-letais de metais, logo apresentam grande importância biológica, indicando a presença destes poluentes em ambientes aquáticos (CHAN, 1995). Em organismos aquáticos, as brânquias, fígado e rim possuem grande capacidade de produção de MTs, pois são órgãos relacionados com a entrada, estocagem e excreção de metais, respectivamente (FREIRE et al., 2008).

## 1.7 Resposta Integrada de Biomarcadores: IBR

Como já mencionado, os biomarcadores são estudados no campo desde o final de 1980 e são considerados ferramentas úteis para o monitoramento dos efeitos biológicos de poluentes e de estresse ambiental. No entanto, a validação dos métodos, embora básica e necessária para o processo de interpretação dos dados, não é suficiente. O potencial do uso de uma abordagem de monitoramento baseado em biomarcadores, como uma ferramenta para a avaliação ambiental, é muitas vezes limitado pela falta de análises estatísticas integradas. Desta forma, fez-se necessária uma metodologia capaz de avaliar e integrar as variações nas respostas de uma bateria de biomarcadores em um único valor ou gráfico, facilitando a interpretação e compreensão das alterações encontradas nos vários biomarcadores utilizados para o diagnóstico ambiental (BELIAEFF e BURGEOT, 2002).

Uma dessas metodologias foi criada por Beliaeff e Burgeot (2002), chamada de "Integrated Biomaker Response" ou "Resposta Integrada de Biomarcadores" (IBR). Esse índice é descrito pelo uso de gráficos de radar, onde a área do gráfico é calculada, dando a resposta dos biomarcadores integrados, permitindo a integração visual de um conjunto de respostas dos biomarcadores analisados. Esse índice tem sido utilizado em estudos de campo e de laboratório (DAMIENS et al., 2007; ARZATE-CARDENAS e MARTINEZ-JERONIMO, 2011; SERAFIM et al., 2011).

Porém, o IBR apresentava dois pontos fracos: seus resultados eram fortemente dependentes do arranjo dos biomarcadores no gráfico em radar e eram consideradas apenas respostas de indução ou respostas de inibição de todos os biomarcadores analisados, não eram consideradas indução e inibição em um mesmo gráfico. Com isso, Sanchez e colaboradores (2013) propuseram uma segunda versão para o índice (IBRv2) com o objetivo de modificar o cálculo IBR para evitar erros devido aos pontos fracos. Para isto, utilizaram o conceito baseado nos desvios encontrados dos resultados dos biomarcadores do local estudado (contaminado) comparados com os resultados dos biomarcadores de um local referência, comparando um estado de perturbação com um estado sem perturbações. Assim, através da aplicação do IBRv2, pode-se classificar diferentes ambientes em relação ao grau de contaminação de acordo com os valores obtidos do IBR de cada local.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Analisar biomarcadores bioquímicos e genotóxicos dos teleósteos *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* para avaliar a qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte, o qual recebe efluentes líquidos de um curtume.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar testes *in situ* por períodos de 96 h em 4 pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte, o qual recebe diversos tipos de efluentes, destacando os de curtume.
- Analisar os biomarcadores: etoxiresorufina-O-deetilase, glutathione-S-transferase, glutathione, acetilcolinesterase, peroxidação lipídica (por meio do ensaio TBARS), proteínas carboniladas, metalotioneína e danos no DNA (por meio do ensaio do cometa), nos peixes *P. lineatus* e *S. notomelas* submetidos a testes *in situ* em rio que recebe efluentes de curtume.
- Quantificar a concentração do cromo na água, no sedimento e em tecidos de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* no rio Bandeirantes do Norte.
- Comparar a sensibilidade das duas espécies *P. lineatus* e *S. notomelas*, submetidas a testes de toxicidade *in situ* nos mesmos locais do rio Bandeirantes do Norte.
- Aplicar e avaliar o IBR para *P. lineatus* e *S. notomelas* nos 4 pontos do rio Bandeirantes do Norte para avaliar a qualidade desse rio, que recebe efluentes de curtume no seu percurso.

### 3 REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12714: Água – ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema Estático**. Rio de Janeiro, p.15, 1993.
- \_\_\_\_\_. **NBR 10004: Classificação de Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.
- ABRAHAMSON, A.; ANDERSSON, C.; JÖNSSON, M.E.; FOGELBERG, O.; ÖRBERG, J.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish - A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 1-8, 2007.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2115–2123, 2009.
- ARZATE-CARDENAS, M.A.; MARTINEZ-JERONIMO, F. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. **Aquatic Toxicology**, v.105, p.528-534, 2011.
- AZEVEDO, F.A.; DE LIMA, I.V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A; CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.2, p.1316-1322, 2002.
- BRAZILIAN LEATHER BOOK, Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil (CICB), 2013. Disponível em: <http://brazilianleather.com.br/#br-leather-book>. Acesso em: 06 dez. 2013.
- BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.
- BRITTO, S.G.C. **Peixes do Rio Paranapanema**, Duke Energy International Geração Paranapanema, 2008.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.25, p.201-268, 1995.

BURATINI, V.B.; BRANDELLI, A. Bioacumulação in: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Ed. Rima, São Carlos, 478p. 2006.

BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno da Saúde Pública**, v. 19, p. 465-473, 2003.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTED, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.P. **Parâmetros morfo-funcionais de *Prochilodus lineatus* submetidos a testes in situ no Ribeirão Cambé (Londrina-PR)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

\_\_\_\_\_. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CAMARGO, M.M.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.94, p.40-46, 2009.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, A. An In Situ Bioassay Integrating Individual and Biochemical Responses Using Small Fish Species. **Ecotoxicology**, v. 13, p.667–681, 2004

CASTRO R.M.C.; VARI, R.P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n.622, 2004.

\_\_\_\_\_. Family Prochilodontidae. In: R. E. REIS, S. O. KULLANDER, C.J.JR. FERRARIS (Eds.). Check list of the freshwater fisher of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 65-70. 2003.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina).

**Environmental Pollution**, v.157, p.3025-3033, 2009.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.

Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1989.

**Relatórios Ambientais**, ISSN 0103-4103, p.164, 1990.

CHAN, K.M. Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy

Metallothionein: metal pollution in fish around Hong Kong. **Marine Pollution**

**Bulletin**, v. 31, p.411-415, 1995.

CHEN, C.; FOLT, C. Bioaccumulation and Diminution of Arsenic and Lead in a Freshwater Food. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p.3878-3884. 2000.

CICB - Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil. Disponível em:

<http://www.cicb.org.br/wp-content/uploads/2013/11/TOTAL-RED-OUT13.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2013.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente.

Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>. Acesso em: 07 dez. 2013.

DA GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Eduem, 2007.

DAMIENS, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; LOQUES, F.; ROMEO, M.; SALBERT, V. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. **Chemosphere**, v.66, p.574-583, 2007.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Eds)

**Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, 2 ed. Taylor & Francis, Washington, p.523-562, 1995.

DOUST, J.L.; SCHMIDT, M.; DOUST, L.L. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. **Biological Reviews**, v. 69, p.147-189, 1994.

DOYEN, P.; VASSEUR, P.; RODIUS, F. cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.140, p.300-308, 2005

DUTTA, H.M.; ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p.157-162, 2003.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, p.575, 1998.

FALFUSHYNSKA, H.I.; STOLYAR, O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.729-736, 2009.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v.205, p.223-240, 2004.

FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72, p.55-63, 2002.

FERREIRA, C.M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental. **Biológico**, v.65, p.17-18, 2003.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p.308–313, 2007.

FRASCO, M.F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, v.10, p.360-375, 2005.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.347-354, 2008.

GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, p. 93-103, 2002.

GANEM, R.S. **Curtumes: Aspectos Ambientais**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2007. Disponível em: [http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1281/curtumes\\_aspectos\\_senna.pdf?sequence=1](http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1281/curtumes_aspectos_senna.pdf?sequence=1). Acesso em: 05 dez. 2013.

GARCIA, C.Z.; MARTINEZ, C.B. Biochemical and genetic alterations in a freshwater neotropical fish after acute exposure to *Microcystis aeruginosa*. **Neotropical Ichthyology**, v.10, p.613-622, 2012.

GOEL, P.K. **Water pollution: causes, effects and control**. 2 ed. New Delhi: New Age International, 2006.

GÓMEZ, S.; VILLAR, C.; BONETTO, C. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Rio de La Plata Estuary. **Environmental Pollution**, v. 99, p.159-165, 1998.

GONTIJO, A.M.M.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: SALVADORI, D.M.; MARQUES, E.K. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Ulbra, Canoas, p. 173-200, 2003.

GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2013. Disponível em:  
<http://www.guiabrasileirodocouro.com.br>. Acesso em: 06 dez. 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Claredon Press, Oxford, p.146-148, 2005.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K. B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York: John Wiley & Sons, Inc., p.319-368, 2004.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de bioensaios para a avaliação da toxicidade de agentes químicos**. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1990.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.680-693, 2008.

JORDÃO, C.P.; ALESSANDRO, C.S.; JOSÉ, L.P.; BRUNE, W. Contaminação por Crômio de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, v.22, p.47-52, 1999.

KONSTANTINOU, I.K.; HELA, D.G.; ALBANIS, T.A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**. v.141, p.555-570, 2006.

KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, v.107, p.263-283, 2000.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v.52, p.348–354, 2009.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.147, p.222-231, 2008.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M.; Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, p.469-484, 2010.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p. 656-666, 2001.

LUIZ, E.A.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C., HAHN, N.S. Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, 58, p.273-285, 1998.

LUNARDELLI, B. **Biomarcadores bioquímicos do peixe *Prochilodus lineatus* para monitoramento da qualidade da água do ribeirão Três Bocas em Londrina, PR**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.355-381, 2008.

MALABARBA, L. R. Subfamily Cheirodontinae. In: REIS, R. E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 215-221, 2003.

MARTINES, A.M. **Impacto do lodo de curtume nos atributos biológicos e químicos do solo**. Dissertação (em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica. p.551-577, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal Biology**, v.64, p.797-807, 2004.

MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.577-586, 2005.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, R.M.; MORSCH, M.V.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, A.M.; MORAES, G.; VIEIRA, P.L.V. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.61, p.398-403, 2005.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MODESTO, K.A., MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, p. 781-787, 2010.

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

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Characterization of the cholinesterases present in the head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.341-347, 2005.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.; VILÉLA, M.B.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.104, p.291-298, 2011.

NASCIMENTO, C.R.; SOUZA, M.M.; MARTINEZ, C.B. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.155, p.456-461, 2012.

NEWMAN, M.C.; CLEMENTS, W.H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**. New York: CRC Press, 2008.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**. v.567, p.109–149, 2004.

OLIVEIRA, R.C. **Contaminação do solo por alguns resíduos de curtume**. Tese (em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

PACHECO, J.W.F. **Curtumes (Série P + L)**. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, 2005.

PEREIRA, R.S. Identificação e Caracterização das Fontes de Poluição em Sistemas Hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v.1, p.20-36, 2004.

PEREIRA MADUENHO, L.; MARTINEZ, C. B. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.148, p.265-272, 2008.

- PIANA, P.A.; GOMES, L.C.; CORTEZ, E.M. Factors influencing *Serrapinnus notomelas* (Characiformes: Characidae) populations in upper Paraná river floodplain lagoons. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 81-86, 2006.
- ROBERTS, A.P.; ORIS, J.T. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.138, p.221-228, 2004.
- RODRIGUES, M.L.K. **Origem, distribuição e mobilidade potencial de metais pesados em ambiente fluvial impactado por curtumes**. Tese (doutorado em Geociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science Pollution Research**, v.20, p.2721-2725, 2013.
- SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHEZ, M.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p.57-63, 2000.
- SANTOS, A.M.M.M.; CORREA, A.R.; ALEXIM, F.M.B.; PEIXOTO G.B.T. **Panorama do Setor de Couro no Brasil**. BNDES Setorial, n. 16, p. 57-84, 2002.
- SANTOS, T.G.; MARTINEZ, C.B. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v.89, p.1118-1125, 2012.
- SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; FONSECA, V.F.; FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R.P.; BEBIANNO, M.J.; CABRAL, H.N. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. **Ecological Indicators**, v.19, p.215-225, 2011.
- SEVANI, A.; NORDENBRAND, K.; KIM, E.; ERNSTERM L.; HOCHSTEIN, P. Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, p.145-152, 1990.
- SHAKIR, L.; EJAZ, S.; ASHRAF, M.; QURESHI, N.A.; ANJUM, A.A.; ILTAF, I.; JAVEED, A. Ecotoxicological risks associated with tannery effluent wastewater. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.32, p.181-191, 2012.
- SHRIVASTAVA, P.; SAXENA, A.; SWARUP, A. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (M. P.) India. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v.8, p.1-4, 2003.
- SHUGART, L. R. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. **Ecotoxicology**, v.9, p.329-340, 2000.
- SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.112-120, 2008.

- STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three - spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, p.1607-1615, 2000.
- SUGIYAMA, M. Role of physiological antioxidants in chromium (VI)-induced cellular injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.12, p.397-407, 1992.
- SUZUKI, K.T.; SOMEYA A.; KOMADA Y.; OGRA Y. Roles of metallothionein in copper hemeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.88, p.173-182, 2002.
- TEJEDA-VERA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, E.; SEDEÑO-DÍAZ, J.E. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. **Environment International**, v.33, p.521-531, 2007.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.
- TOTTI, A.; CHIDA, A.Y.; TOMITA, H.K.; PORTO, J.; OGURA, L.L.; LEAL, S. Marcadores de Poluição. **Química das Águas**. QFL – 3201. São Paulo, 2007
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p, 178–189, 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.
- VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, p. 217-225, 1996
- VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p.36-43, 2007.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.146, p.281-300, 2007.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. **Environmental Health Criteria**. Geneva: **World Health Organization**. v.222, p.238, 2001.

WINKALER, E.U. **Biomarcadores bioquímicos e fisiológicos de curimbas (*Prochilodus lineatus*) submetidos a testes in situ em ribeirões do município de Londrina, Paraná**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**. v.143, p.187-195, 2006.

ZANGAR, R.C.; DAVYDOV, D.R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.199, p.316-331, 2004.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v.606, p.135-150, 2008.

ZORITA, I., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., APRAIZ, I., CANCIO, I., ORBEA, A., SOTO, M., MARIGÓMEZ, I., CAJARAVILLE, M.P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**, v.153, p.157-168, 2008.

## 5 MANUSCRITO I

### **Testes *in situ* e análise de biomarcadores no teleósteo *Prochilodus lineatus* na avaliação da qualidade de um rio contaminado por efluente de curtume**

Bruna Lunardelli, Millena Terezinha Cabral e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Laboratório de Ecofisiologia Animal - Departamento de Ciências Fisiológicas  
Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

---

#### **RESUMO**

Para testar as possíveis alterações causadas na biota aquática de um rio que recebe efluente de um curtume, juvenis de *Prochilodus lineatus* foram submetidos a testes *in situ* em quatro pontos do rio Bandeirantes do Norte (Rolândia/PR - Brasil): ponto A - a montante do curtume, ponto B - próximo ao curtume, pontos C e D - localizados a jusante do curtume. Após 96 h de confinamento em gaiolas, os animais foram anestesiados para a coleta dos tecidos e amostras de água e sedimento do rio foram coletadas para quantificação de cromo. Para analisar o acúmulo de cromo nos tecidos foram utilizados o fígado, rim e músculo. As seguintes análises bioquímicas foram realizadas no fígado e nas brânquias: atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glutathione S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH), peroxidação lipídica (LPO), e conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT). No cérebro e o músculo foi determinada a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Para análise de danos do DNA, por meio do ensaio do cometa, foram utilizadas células sanguíneas. Os resultados mostraram maior concentração de cromo dissolvido na água e no sedimento coletados no ponto B em comparação com o local sem influência do curtume e maior acúmulo de cromo no fígado dos peixes confinados nesse ponto. Em comparação com os peixes do ponto A, os animais mantidos no ponto B também apresentaram aumento na atividade da EROD e GST, no conteúdo de GSH e PSMT. Esses resultados indicaram que o efluente eliminado pelo curtume, apesar de apresentar tratamento prévio, causa comprometimento da qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte, com maior contaminação do ponto B, localizado logo após o curtume, causando alterações bioquímicas e acúmulo de cromo nos animais expostos esse ecossistema contaminado.

**Palavras-chave:** Bioacumulação, biotransformação, estresse oxidativo, cromo.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O setor industrial é um dos grandes responsáveis pela contaminação das águas, seja pela falta de tratamento de seus rejeitos antes de despejá-los nos rios, ou por acidentes que propiciam o vazamento de muitos poluentes. Dentre as indústrias, destacam-se as de curtimento de couros (curtumes), as quais eliminam grande quantidade e diversidade de contaminantes no efluente líquido, como álcalis, sulfetos, sais de amônio, enzimas proteolíticas, ácido sulfúrico e outros compostos. Porém a grande problemática dos efluentes de curtumes é a presença do metal cromo utilizado no tratamento do couro (JORDÃO et al., 1999).

Mesmo com a redução da emissão de poluentes, com a implantação de sistemas de controle por alguns curtumes, muitos compostos tóxicos originários dessas indústrias continuam presentes nas águas e sedimentos, principalmente o metal cromo, sendo um risco ao ambiente, com impacto direto e cumulativo sobre a biota aquática (RODRIGUES, 2007). A toxicidade do cromo (Cr) em efluentes industriais depende do estado de oxidação em que é lançado. Apesar dos efluentes de curtumes apresentarem o Cr (III), a oxidação deste à Cr (VI) pode ocorrer dependendo de alguns parâmetros característicos do corpo hídrico receptor (JORDÃO et al., 1999). Tanto o cromo Cr (III) quanto o Cr (VI) podem ser biologicamente ativos, porém diferem em sua capacidade de atravessar membranas biológicas. O Cr (III) é potencialmente mutagênico, mas não representa um perigo imediato para células porque é incapaz de atravessar as membranas celulares, embora possa ser ambientalmente transformado em Cr (VI), o qual é altamente permeável nas membranas celulares (MATSUMOTO et al., 2006). O Cr (VI) entra nas células e é reduzido rapidamente à Cr (III), mais estável, porém induz efeitos genotóxicos na célula por se ligar diretamente ao DNA (SUGIYAMA, 1992).

Durante muito tempo, o monitoramento ambiental e a avaliação da qualidade da água dos ambientes impactados concentraram-se apenas em análises físicas e químicas. Embora essas análises apresentem informações sobre os níveis de contaminação, não fornecem informações sobre os efeitos dos contaminantes nos sistemas biológicos (CAJARAVILLE et al., 2000; LAM, 2009). Sendo assim, o uso de animais como ferramentas de monitoramento do meio apresenta a vantagem de

detectar os efeitos sub-letais nos organismos (ZHOU et al., 2008). O biomonitoramento é o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas (BUSS et al., 2003). Algumas ferramentas são usadas para a realização do biomonitoramento, sendo os biomarcadores uma delas. Os biomarcadores são definidos como alterações que ocorrem no nível celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, que podem ser mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos e órgãos dentro do organismo e que podem indicar a exposição e/ou efeito de um xenobiótico (LAM, 2009).

Em estudos Ecotoxicológicos aconselha-se o uso de diversos tipos de biomarcadores simultaneamente, pois a avaliação de um único biomarcador pode não refletir de forma completa os danos à saúde dos organismos ou até mesmo resultar em interpretações errôneas do que está acontecendo (CAJARAVILLE et al. 2000; ZORITA et al., 2008). Sendo assim, dentre os biomarcadores bioquímicos mais investigados estão as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, como a etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathione S-transferase (GST) e os antioxidantes, como a glutathione (GSH) (MARTINEZ, 2006). A ocorrência de danos oxidativos nos diferentes tecidos também pode ser utilizada como biomarcador, como a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e os danos no DNA. Outro biomarcador muito utilizado é a enzima acetilcolinesterase (AChE), relacionada com contaminantes neurotóxicos e as metalotioneínas (MTs), biomarcador diretamente associada a exposição a metais (VAN DER OOST et al., 2003).

Os peixes são amplamente utilizados para avaliar a saúde dos sistemas aquáticos e suas alterações bioquímicas servem como biomarcadores de poluição ambiental. A espécie *Prochilodus lineatus* é considerada adequada para estudos de monitoramento ambiental devido ao seu hábito alimentar detritívoro, que o deixa exposto a qualquer tipo de substância que possa estar depositada no sedimento, incluindo compostos tóxicos. Além disso, esta espécie é considerada como um bioindicador em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais poucos impactados (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). A sensibilidade desta espécie está comprovada em vários estudos de Ecotoxicologia, tanto testes de toxicidade realizados *in situ* (CAMARGO e MARTINEZ, 2006, 2007) como em laboratório expondo o *P. lineatus* a derivados de petróleo, como à fração solúvel do óleo diesel

(VANZELLA et al., 2007; SIMONATO et al., 2008), à agrotóxicos como ao Roundup (CAVALCANTE et al., 2008; MODESTO e MARTINEZ, 2010), ao glifosato (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), à atrazina (SANTOS e MARTINEZ, 2012) e também aos metais, como o alumínio (CAMARGO et al., 2009), o chumbo (MONTEIRO et al., 2011) e o cobre (NASCIMENTO et al., 2012).

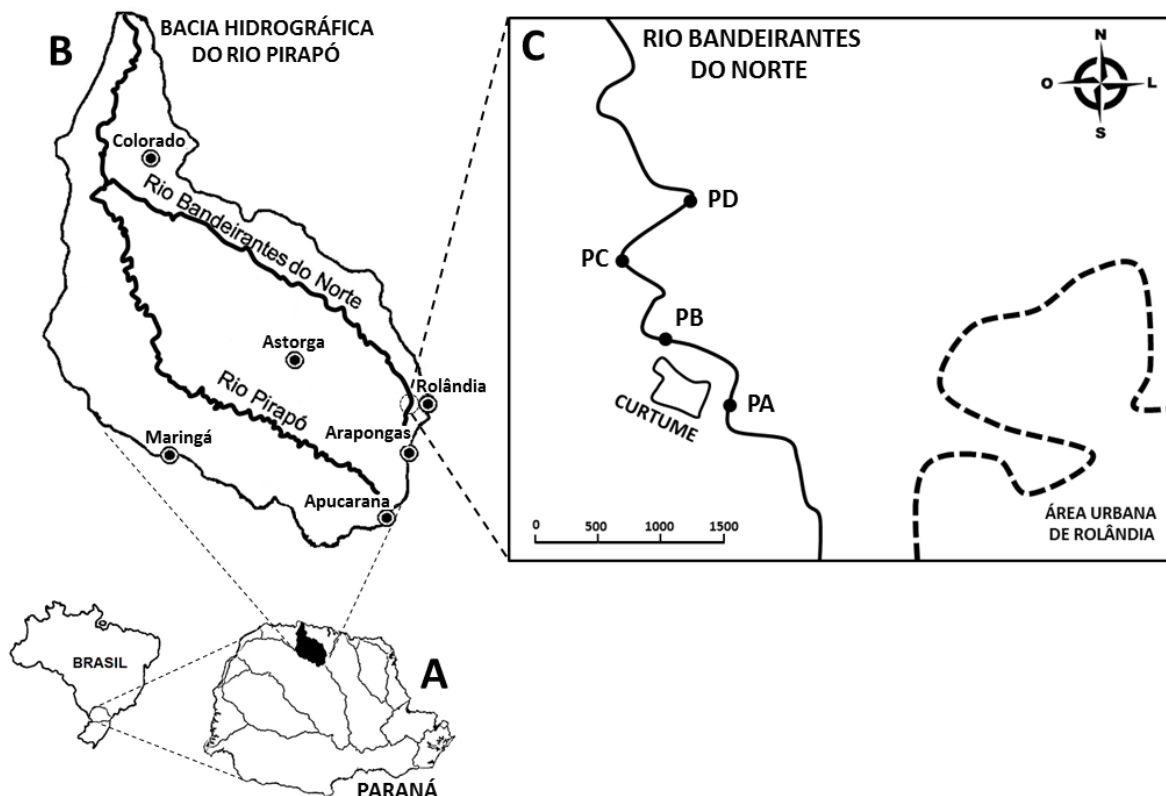
O rio Bandeirantes do Norte apresenta 149 km de extensão e é considerado o maior afluente do rio Pirapó, cuja bacia hidrográfica localiza-se no norte do Estado do Paraná (MARTINEZ, 2005). Este rio está sujeito a receber efluentes domésticos, industriais, pois sua nascente está localizada em área urbana, também recebe efluentes agrícolas por passar por região rural e passa próximo a um curtume, o qual contribui com sua contaminação devido o despejo de efluentes líquidos.

Com isso o objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações em parâmetros bioquímicos, ocorrência de danos no DNA e acúmulo de cromo em tecidos de *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ* por 96 h no rio Bandeirantes do Norte (Rolândia, Brasil), e quantificar o cromo na água e no sedimento desse rio, que recebe efluente de curtume.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Locais dos Testes *in situ*

Os testes *in situ* foram realizados em quatro locais do rio Bandeirantes do Norte no município de Rolândia, norte do Paraná (Figura 8). O Ponto A (PA), 23°18'23.94"S / 51°25'5.38"O, está localizado 1000 m antes do local de lançamento de efluente do curtume, desta forma é o único ponto que não apresenta influência da contaminação gerada por esta indústria. O Ponto B (PB), 23°18'9.34"S / 51°25'27.75"O, está a 50m após o local de descarga de efluentes do curtume. O Ponto C (PC), 23°17'51.31"S / 51°25'35.67"O, e o Ponto D (PD), 23°17'32.11"S / 51°25'20.44"O, localizados a 800 m e 1750 m, respectivamente, após curtume, afim de verificar a ocorrência de um gradiente de contaminação gerados pelos contaminantes desta indústria.



**Figura 8:** A: Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Pirapó no norte do Estado do Paraná. B: Localização do Rio Bandeirantes do Norte na Bacia do rio Pirapó. C: Localização dos pontos (PA, PB, PC e PD) onde foram realizados os testes *in situ* no rio Bandeirante do Norte em Rolândia.

#### 4.2.2 Delineamento experimental

Para os testes *in situ* foram utilizados juvenis de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), medindo  $12,3 \pm 0,89$  cm e pesando  $22,53 \pm 4,55$  g (média  $\pm$  D.P.,  $n = 96$ ) fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os testes *in situ* foram realizados no inverno, entre julho e agosto de 2012, considerada época de seca para região.

Os animais foram transportados para o campo em sacos plásticos, com água e oxigênio, e transferidos para gaiolas de monitoramento, já devidamente posicionadas dentro d'água, onde ficaram confinados por um período de 96 h. Em cada ponto experimental foram expostos 32 peixes, divididos em duas gaiolas. As gaiolas foram confeccionadas em ferro e revestidas com tela de malha de 5 mm, com dimensões de 50x60x30 cm (volume de 90 litros), permitindo a circulação da água e que os animais se alimentassem junto ao sedimento.

Em cada ponto de teste *in situ* foram realizadas, no dia em que as gaiolas foram expostas no rio e no dia de retirada delas, medidas de temperatura, pH, turbidez e condutividade da água, por meio de um medidor multiparâmetros (Horiba

U-52). Foram coletadas, nestes mesmos dias, amostras do sedimento superficial e 15 mL de água, para determinação de cromo. Metade das amostras de água foi filtrada (filtro com malha de 0,45 µm) e posteriormente acidificada (HNO<sub>3</sub> 1%) para a análise da concentração de cromo dissolvido e a outra metade foi acidificada sem filtrar, para determinação da concentração de cromo total.

Decorrido o período de 96 h, os exemplares de *P. lineatus* foram amostrados no campo, imediatamente após serem retirados da gaiola. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L<sup>-1</sup>), medidos, pesados e foram coletadas amostras de sangue da veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular e foram dissecadas amostras de brânquias, fígado, rim, músculo e cérebro. As amostras foram transportadas, em gelo, para o laboratório, onde foram congeladas em ultra-freezer (-70°C) até o momento das análises dos biomarcadores.

O delineamento experimental e procedimento amostral foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL: Processo nº 19623.2012.17.

#### **4.2.3 Acúmulo de cromo na água, no sedimento e nos tecidos**

Para determinação da concentração de cromo, 1 g de sedimento, previamente seco a 60°C, foi submetido à agitação horizontal por 2 horas com ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Após este período, a suspensão foi filtrada (malha de 8 µm) e no filtrado foi determinada a concentração do metal (MOZETO, 2004).

O cromo foi quantificado no fígado, músculo e rim dos peixes. Os tecidos foram mantidos em estufa a 60°C para secagem total. Depois de secos foram submetidos à digestão ácida em ácido nítrico suprapuro 2N, em estufa a 60° C por 48h. Após a digestão, o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de cromo.

A determinação da concentração de cromo nas amostras de água (filtradas e não filtradas), no sedimento e nos tecidos foi realizada por atomização eletrotérmica, em forno de grafite acoplado a um espectrofotômetro de absorção atômica (AA 700 Perkin Elmer).

#### **4.2.4 Biomarcadores bioquímicos**

Para determinação da atividade da etoxiresorufina-O-deetilase e da glutathione-S-transferase, do conteúdo de glutathione e a ocorrência de peroxidação lipídica, as amostras de brânquias e fígado, foram pesadas, homogeneizadas (1:5 -

m/v para as brânquias e 1:10 - m/v para o fígado) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7, centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C) e o sobrenadante foi separado para os ensaios enzimáticos. Para determinação do conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas, o fígado foi pesado, homogeneizado (1:5 - m/v) em tampão (sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM,  $\beta$ -mercaptaetanol 1,3 mM), centrifugado (45 min., 21300 g; 4°C) e o sobrenadante separado para posterior análise. Para determinação da atividade da acetilcolinesterase, amostras de cérebro e músculo foram pesadas, homogeneizadas (1:10 - m/v) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7,5, centrifugadas (20 min, 15000 g, 4°C) e o sobrenadante separado para o ensaio enzimático.

*a) Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)*

A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-etoxiresorufina em resorufina, seguindo o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1 M; pH 7,6: NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos para o fígado e 20 minutos para a brânquia (excitação: 530 nm/ emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ , baseada em uma curva padrão de resorufina.

*b) Glutathione-S-transferase (GST)*

A atividade da GST foi determinada seguindo a complexação da glutathione (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, e foi expressa em nmol CDNB  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ , de acordo com a metodologia descrita por Keen et al. (1976).

*c) Glutathione (GSH)*

A concentração de GSH foi determinada pela quantidade de tiol não proteico, de acordo com o método de Beutler et al. (1963), pela reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor

amarelada, que foi determinado em 412 nm. A GSH foi expressa em  $\mu\text{g}$  de GSH.  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>, a partir de uma curva padrão para a GSH.

*d) Peroxidação lipídica (TBARS)*

A peroxidação lipídica foi estimada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, por meio do ensaio TBARS, seguindo a metodologia de Camejo et al. (1998). A determinação do conteúdo de MDA ocorreu pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), com leitura de fluorescência (excitação: 535 nm/ emissão: 590 nm) e expresso em equivalentes de malondialdeído (MDA) como  $\mu\text{mol}$  MDA.  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>, utilizando uma curva padrão de MDA.

*e) Proteínas Semelhantes às Metalotioneínas (PSMT)*

O conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas foi determinado segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997) com modificações. Os sobrenadantes dos tecidos centrifugados foram submetidos a fracionamento ácido etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutatona (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas expresso em  $\text{nmol}$  de GSH.  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

*f) Acetilcolinesterase (AChE)*

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com a técnica de Ellman et al. (1961), adaptada para microplacas conforme descrito por Alves Costa et al. (2007), a partir da reação do iodeto de acetilcolina com o reagente de cor DTNB. O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, a tiocolina, reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, um ânion de coloração amarela. As leituras de absorvância ocorreram durante 6 minutos, em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE foi expressa em  $\text{nmol min}^{-1}$ .  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

#### *g) Proteínas totais*

Os resultados dos biomarcadores foram expressos por mg de proteína, determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, utilizando uma curva de calibração com albumina de soro bovino (BSA) e leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

#### **4.2.5 Ensaio do Cometa**

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) e com modificações descritas por Ramsdorf et al. (2009). Após a amostragem, o sangue foi adicionado em soro bovino fetal (1:100 - v/v), a fim manter as células viáveis até o momento do teste, no máximo 48 h após a coleta do sangue. Esta solução foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão e esta mistura distribuída em lâminas recobertas com agarose normal (1,5%), as quais foram cobertas por lamínulas, e em seguida mantidas em temperatura de 4-8 °C por cerca de 30 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas passaram por etapa de lise, mantidas por 1 h em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM e Tris 10 mM, DMSO 10 %, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) a 4-8 °C. Em seguida, foram submetidas à etapa de desespiralização do DNA, na qual as lâminas foram transferidas para cubas horizontais de eletroforese contendo solução tampão de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH > 13), durante 30 minutos. Depois, foram submetidas à etapa de eletroforese, a 25 volts e 300 mA, por 20 minutos. Após término da corrida de eletroforese as lâminas passaram por etapa de neutralização com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 minutos, e em seguida, fixação em etanol por 10 minutos. Após a secagem das lâminas, estas foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram examinadas em microscópio de fluorescência na objetiva de 40 vezes. Foram analisados 100 nucleóides por animal, por meio de teste cego e de acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados considerando o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta, menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do

nucleóide. A partir dessa classificação foram feitos os cálculos dos escores de danos para cada indivíduo, somando o produto do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe, gerando um valor entre 0 e 300.

#### 4.2.6 Análises estatísticas

Os valores médios obtidos de cada biomarcador e para o acúmulo de cromo foram comparados entre os locais onde foram realizados os testes *in situ* (Ponto A, B, C e D). Para estas análises foi utilizada análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), seguido por um teste de comparações múltiplas quando indicado. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

### 4.3 RESULTADOS

Os parâmetros físicos e químicos da água estão apresentados na Tabela 1. Os valores de temperatura e pH não apresentaram variações relevantes entre os locais analisados. Os valores de condutividade apresentaram variações entre os pontos do rio Bandeirantes do Norte, com elevação da condutividade entre o ponto A e o ponto B, e maiores valores nos pontos pós-curtume. Os valores de turbidez apresentaram variações entre os locais analisados, sendo maior no Ponto B e os valores dos pontos A, C e D variaram entre 23 e 30 NTU.

**Tabela 1:** Parâmetros físicos e químicos da água ao longo do Rio Bandeirantes do Norte (Pontos A, B, C e D) durante o período experimental.

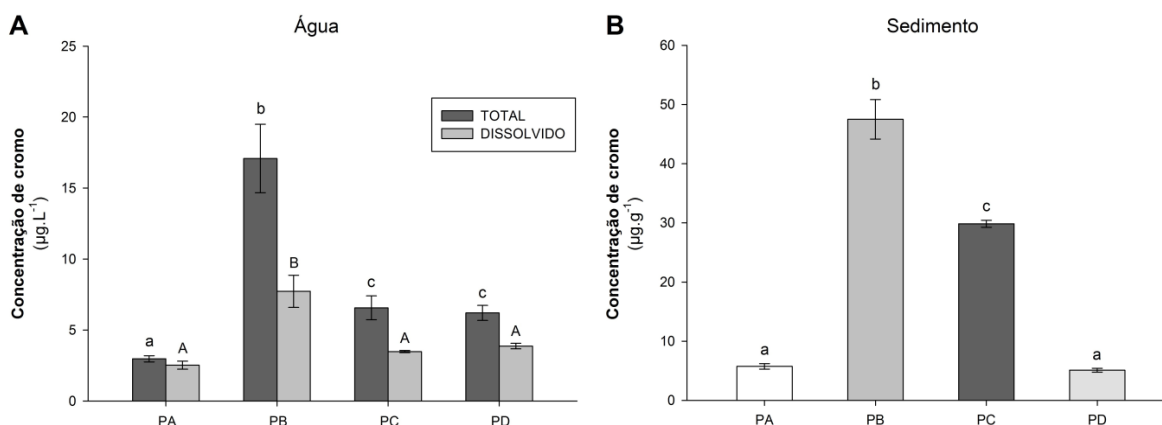
Pontos	Temperatura (°C)	pH	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)
Ponto A	17,76 - 16,73	7,04 - 7,15	167 - 208	23,6 - 30,0
Ponto B	17,07 - 18,37	7,35 - 7,57	414 - 560	42,2 - 47,3
Ponto C	17,89 - 17,46	7,14 - 7,05	398 - 406	30,7 - 25,8
Ponto D	17,81 - 16,35	6,90 - 7,18	263 - 612	24,1 - 28,7

Valores referentes às medidas realizadas no dia em que as gaiolas com os peixes foram colocadas na água e no dia em que foram retiradas da água em cada ponto no rio Bandeirantes do Norte.

Os resultados da concentração de cromo, total e dissolvido, analisados na água coleta em cada ponto estão representados na Figura 9 A. O ponto B

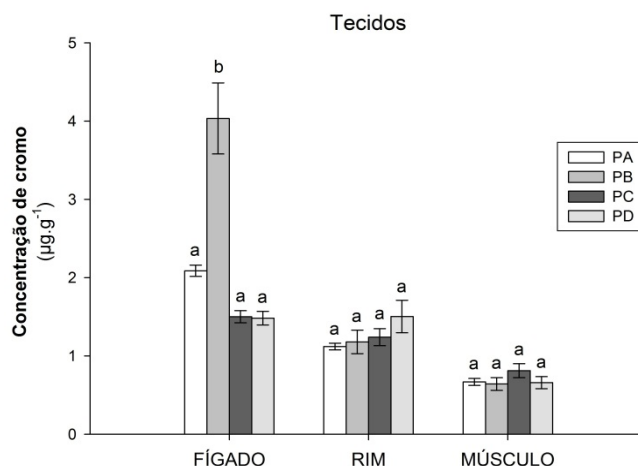
apresentou o maior valor de concentração de cromo total comparado com os demais pontos ( $P < 0,001$ ), seguido dos pontos C e D, os quais apresentaram valores significativamente maiores que os pontos A. Em relação à concentração de cromo dissolvido ( $P < 0,001$ ), o ponto B apresentou maior concentração quando comparado com todos os outros pontos. Os pontos A, C e D apresentaram concentrações de cromo dissolvido estatisticamente semelhantes.

No sedimento (Figura 9 B) o ponto B apresentou maior concentração de cromo que os demais pontos do rio Bandeirantes do Norte ( $P = 0,004$ ), seguido pelo ponto C que apresentou concentrações maiores que os pontos A e D, porém menor que a concentração analisada no ponto B. Os pontos A e D apresentaram concentrações de cromo no sedimento estatisticamente semelhantes entre si.



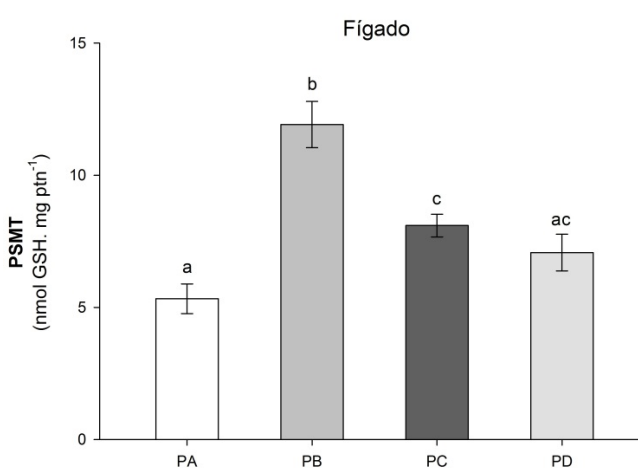
**Figura 9:** Concentração de cromo total e dissolvido em amostras de água (A) e sedimento (B) coletadas nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

As concentrações de cromo analisadas nos diferentes tecidos dos peixes estão representadas na Figura 10. Os animais expostos no ponto B apresentaram as maiores concentrações de cromo no fígado ( $P < 0,001$ ) em relação aos demais grupos. E os peixes expostos nos pontos A, C e D apresentaram concentrações estatisticamente semelhantes entre si. No rim ( $P = 0,604$ ) e no músculo ( $P = 0,44$ ), as concentrações deste metal não apresentaram diferenças significativas entre os peixes de todos os grupos analisados.



**Figura 10** Concentração de cromo em fígado, rim e músculo de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 8-7). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

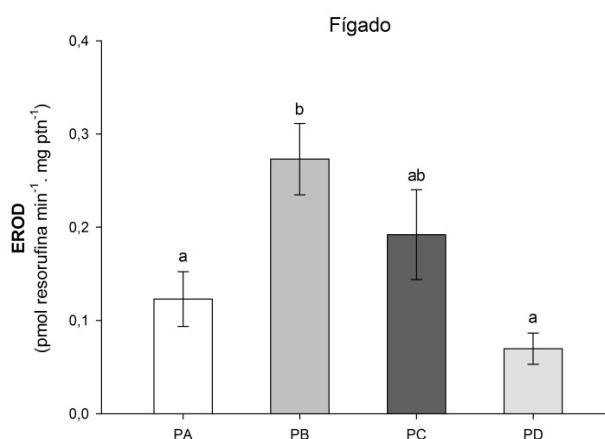
O conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas hepática (Figura 11 A) apresentou-se significativamente maior ( $P < 0,001$ ) nos peixes do ponto B em relação aos outros grupos. Também houve um aumento significativo na concentração de PSMT no fígado dos peixes do ponto C em relação aos peixes expostos no ponto A. Os peixes expostos no ponto D apresentaram valores de concentração dessas proteínas estatisticamente semelhantes aos do ponto A e C.



**Figura 11:** Conteúdo Proteínas Semelhantes às Metalotioneínas (PSMT) no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 5-7). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

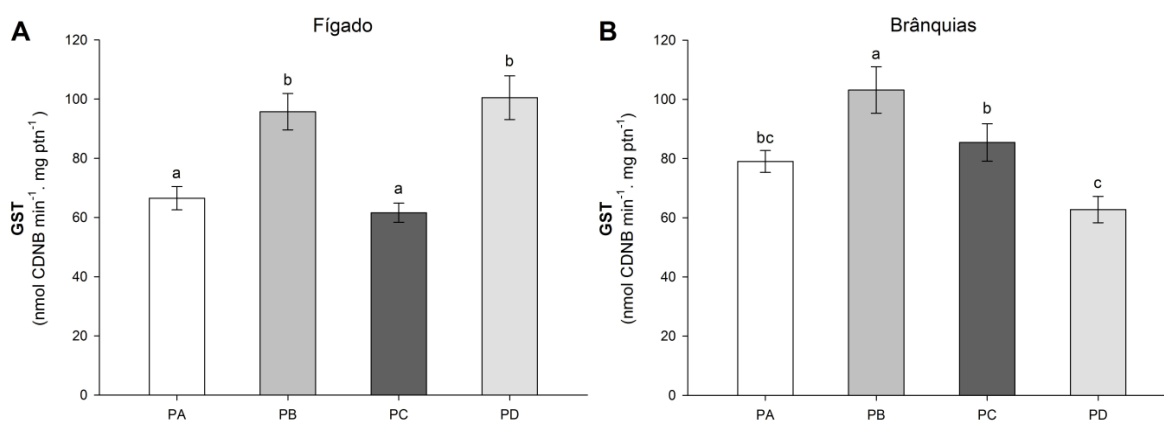
Os resultados obtidos das análises da atividade das enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação estão representados nas Figuras 12 e 13. Os

peixes expostos no ponto B apresentaram maior atividade da EROD (Figura 12), quando comparado com os grupos A e D ( $P = 0,005$ ), sendo que os pontos A, C e D foram estatisticamente semelhantes entre si. Não foi possível realizar o ensaio da atividade da EROD na brânquia, devido a sua baixa atividade nesse tecido.



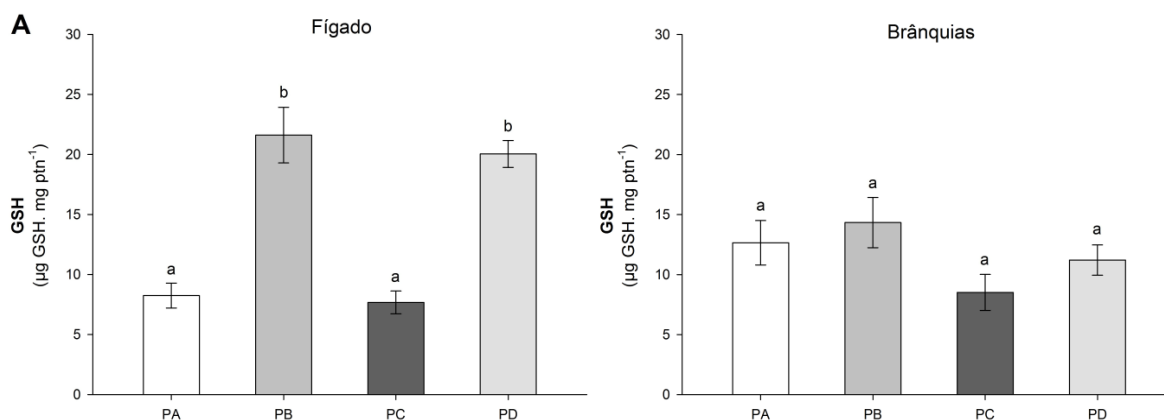
**Figura 12:** Atividade da EROD hepática de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8-6$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A atividade da enzima glutatona S-transferase, mostrou-se aumentada ( $P < 0,001$ ) no fígado dos peixes expostos nos pontos B e D, em relação aos demais pontos (Figura 13 A). Nas brânquias, a atividade da GST foi maior ( $P < 0,001$ ) nos peixes expostos no ponto B em relação aos outros grupos analisados (Figura 13 B). Os peixes expostos no ponto C apresentaram atividade da GST maior que o ponto D e semelhante ao ponto A. E os pontos A e D foram semelhantes entre si.



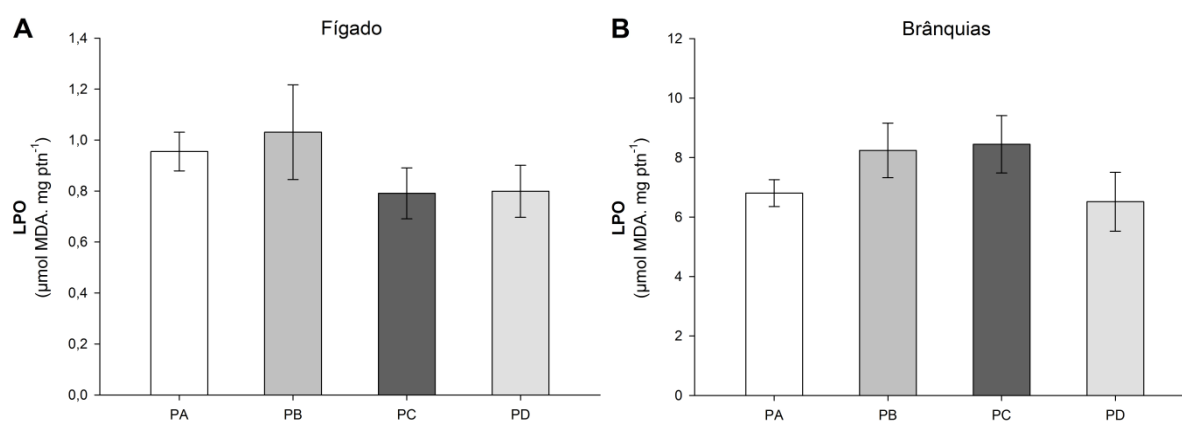
**Figura 13:** Atividade da GST hepática (A) e branquial (B) de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8-6$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A concentração de glutatona apresentou aumento ( $P < 0,001$ ) no fígado dos peixes expostos no ponto B e D, quando comparados com os outros grupos (Figura 14 A). As brânquias não apresentaram variações significativas ( $P = 0,131$ ) entre os grupos analisados (Figura 14 B).



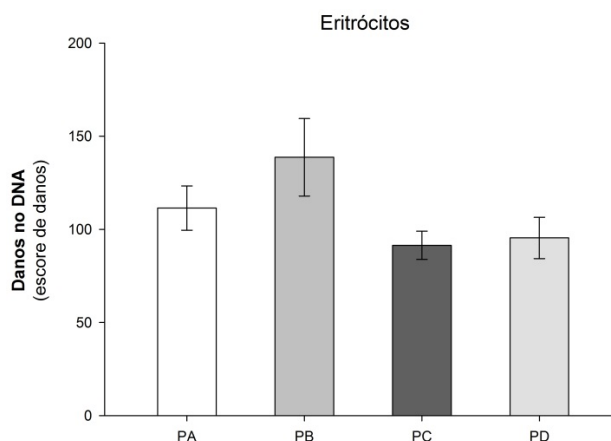
**Figura 14:** Conteúdo de GSH no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 8-7). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

O conteúdo de MDA em fígado está representado na Figura 15 A e em brânquias na Figura 15 B. Tanto em fígado ( $P = 0,434$ ) quanto em brânquias ( $P = 0,282$ ) o conteúdo de MDA não apresentou variações significativas entre os grupos analisados.



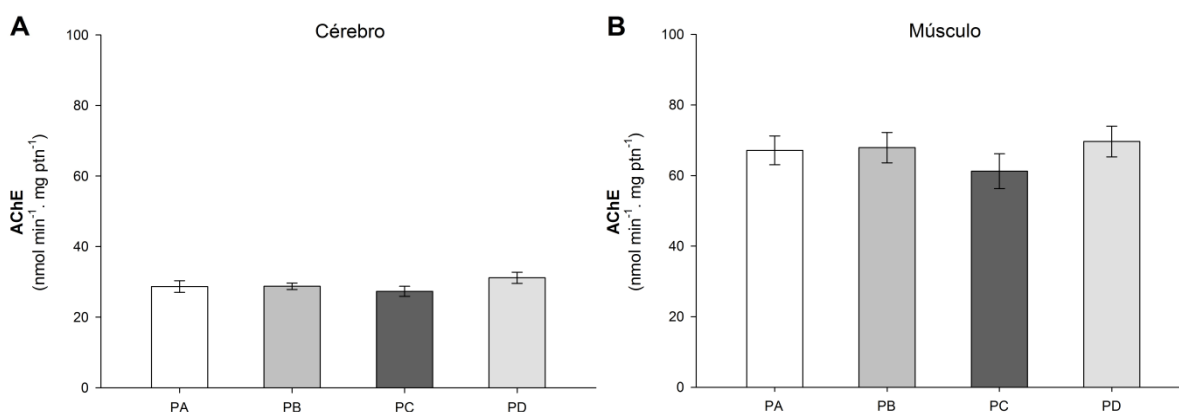
**Figura 15:** Conteúdo de MDA no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 8-6).

Na Figura 16 estão os escores médios de danos encontrados no DNA dos peixes de cada ponto experimental. Não foram evidenciadas alterações significativas na ocorrência de danos do DNA em eritrócitos dos *P. lineatus* expostos em todos os pontos do rio Bandeirantes do Norte ( $P = 0,087$ ).



**Figura 16:** Escores de danos no DNA em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 10-9$ ).

Não foram evidenciadas alterações significativas na atividade da acetilcolinesterase, tanto cerebral (Figura 17 A) ( $P = 0,296$ ) quanto muscular (Figura 17 B) ( $P = 0,561$ ), em nenhum dos grupos analisados.



**Figura 17:** Atividade da acetilcolinesterase no cérebro (A) e músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos nos diferentes pontos ao longo do rio Bandeirantes do Norte (PA, PB, PC e PD). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 10-8$ ).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os testes toxicológicos *in situ* são ferramentas úteis em Ecotoxicologia principalmente porque integram relevância ecológica em testes de toxicidade, representando mais fielmente a realidade à qual os animais estão expostos (CASTRO, 2004). No caso do presente trabalho, estes testes foram utilizados para avaliar a qualidade da água e os efeitos à biota de um rio que recebe efluente de um curtume, que é composto por uma mistura contaminantes, dentre eles o metal cromo. E mesmo com o surgimento de uma preocupação ambiental sobre o destino dos resíduos provenientes do tratamento dos couros e com a implementação de estações de tratamento de efluentes por alguns curtumes, ainda ocorre a eliminação da água residuária dessas estações no meio ambiente.

Essa eliminação de efluentes líquidos pode ser demonstrada pelos resultados dos parâmetros físico e químicos, nos quais se destaca o aumento da condutividade entre os pontos A e B, localizado antes e logo após o curtume, respectivamente, sugerindo uma adição de compostos iônicos nesse local, e nos pontos subsequentes. Em geral, níveis superiores a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  indicam ambientes impactados (CETESB, 2009), sendo assim a alta condutividade foi evidenciada desde o ponto A, indicando grande concentração iônica nesse rio, causada por contaminação ao longo de seu trajeto desde a nascente, o qual passa por área urbana e rural até chegar ao curtume. Outro parâmetro da água que pode indicar a presença do efluente do curtume é a turbidez, a qual foi maior no ponto B do que nos demais pontos do rio Bandeirantes do Norte. Isso se deve às características da água apresentadas nesse local, com uma coloração opaca e com a presença de substâncias orgânicas com aparência gordurosa. Os valores de pH estão relacionados com a biodisponibilidade de muitos metais e com sua toxicidade (CAMARGO et al., 2009; VELMA et al., 2009), entretanto, não foram encontradas variações importantes nos valores que merecessem destaque. Todos os valores de pH no rio Bandeirantes do Norte ficaram entre 6 e 8. E segundo Velma et al. (2009), muitos estudos, indicaram que os valores de pH ideais para maior toxicidade do cromo para peixes teleósteos variam de 6,4 - 7,8. Desta forma, os valores de pH encontrados no rio Bandeirantes do Norte favorece a maior toxicidade deste metal aos peixes.

Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água corroboram os valores de concentração de cromo encontrada na água e no sedimento dos locais pós-curtume, nos quais a concentração de cromo total na água apresentou-se maior que o local sem influência do dessa indústria. A concentração de cromo dissolvido foi maior no ponto B, e a concentração de cromo no sedimento foi 8 vezes maior no ponto B e 5 vezes maior no ponto C em relação ao ponto A. Esses valores de concentração de cromo podem indicar contaminação recente da água pelas águas residuárias do curtume, mesmo com o tratamento do efluente, ou também uma contaminação duradoura, com a permanência do cromo no sedimento e sua possível disponibilização para água. Essas concentrações de cromo na água estão abaixo do permitido pela legislação brasileira (CONAMA 357/2005), a qual determina que o limite máximo de cromo na água seja de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em alguns cursos d'água na região sudeste de Minas Gerais, próximos às indústrias de curtimento de couro, Jordão et al. (1999) determinaram em 32% das amostras valores de cromo na água acima da legislação brasileira. Matsumoto et al. (2003) determinaram concentrações maiores de cromo, que variaram até  $380 \mu\text{g.L}^{-1}$ , dependendo da estação do ano, no "Córrego dos Bagres" em Franca (SP), que recebe efluente de um curtume. As concentrações de cromo encontradas no sedimento também estiveram abaixo das encontradas por Jordão et al. (1997), em rios de Minas Gerais, e por Tagliari et al. (2004), no rio Feitoria no Rio Grande do Sul, os quais apresentam influência de indústrias de tratamento de couros. Os menores valores encontrados no presente trabalho podem ser explicados pelo tratamento do efluente com cromo realizado pelo curtume localizado próximo ao rio Bandeirantes do Norte. Porém, mesmo com o tratamento, esses resultados indicam que não é possível a eliminação total do cromo presente no efluente gerado no tratamento do couro.

Os metais podem ser tóxicos e prejudiciais quando em excesso ou bioacumulados nos organismos, pois não apresentam propriedades biodegradáveis, assim interferindo nos processos fisiológicos normais e em altas concentrações sua presença pode ser fatal (GOEL, 2006). O acúmulo de metais em peixe ocorre através da absorção pela superfície do tegumento (pele e escamas), via respiração (pelas brânquias) e através da alimentação (BURATINI e BRANDELLI, 2006). O acúmulo desses elementos depende de fatores como a concentração do metal disponível no meio, tempo de exposição em que o animal ficou em contato com o

contaminante e da capacidade de absorção de cada organismo, que varia de espécie para espécie, de acordo com a biologia de cada animal (ZHOU et al., 2008).

Mesmo as concentrações de cromo nos pontos pós-curtume serem consideradas baixas, quando comparadas com a legislação brasileira e outros trabalhos, ocorreu maior acúmulo de cromo no fígado dos peixes expostos no ponto localizado logo após o curtume (ponto B). Essa alta concentração do metal no tecido está diretamente relacionada com a presença deste na água e sedimento desse local, decorrente da eliminação do efluente do curtume que contém cromo. Isso porque após exposição a metais, os órgãos com maior atividade metabólica, responsáveis por desintoxicação e eliminação de substâncias, como o fígado, tendem a acumular mais metais, em virtude da presença das metalotioneínas, que são proteínas envolvidas na eliminação desses íons (THOPHON et al., 2003; KLAVINS et al., 2009). Alguns autores também indicaram maior acúmulo de cromo em fígado de alguns peixes (OBASOHAN, 2007; VINODHINI e NARAYANAN, 2008; PALANIAPPAN e KARTHIKEYAN, 2009). Não foram constatadas diferenças significativas na concentração de cromo no rim e no músculo de *P. lineatus*, sugerindo que estes tecidos necessitam de maior tempo de exposição ao metal para poder acumulá-lo via metabolismo.

Existem importantes biomarcadores diretamente associados à exposição a determinadas substâncias, como as metalotioneínas (MTs), relacionadas aos metais (VIARENGO et al., 2007). Os peixes expostos nos pontos pós-curtume B e C apresentaram aumento na concentração hepática de proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT), devido à presença do cromo, tanto na água quanto no sedimento desses locais. Isso ocorreu porque, geralmente, o aumento da expressão de MTs é induzido pelo aumento da concentração de metais que entram no tecido (MONSERRAT et al., 2007; VIARENGO et al., 2007). Estas proteínas apresentam uma alta afinidade por íons metálicos livres, se ligando tanto ao excesso de metais essenciais quanto aos não essenciais, protegendo o organismo dos efeitos tóxicos desses compostos (MONSERRAT et al., 2007). Fleet et al. (1990) afirmam que o Cr (III) é capaz de induzir a síntese de MTs em maior escala do que o Cr (VI), isso explica a indução na síntese dessas proteínas nos peixes expostos nos pontos pós-curtume, pois no efluente líquido eliminado pelo curtume o cromo está presente na sua forma trivalente. As MTs também podem atuar como antioxidantes,

sequestrando espécies reativas de oxigênio e evitando possíveis lesões oxidativas (SUZUKI et al., 2002; FALFUSHYNSKA e STOLYAR, 2009).

Estudos já relataram a indução de síntese de metalotioneínas na presença do metal cromo, como relatado por Roberts e Oris (2004) que expuseram a espécie *Oncorhynchus mykiss* ao cromo e verificaram aumento da expressão do gene da MTs nas brânquias, com apenas 12 h de exposição e no fígado após 48 h de exposição. Alguns trabalhos realizados com o *P. lineatus* já indicaram aumento na síntese de metalotioneínas quando expostos a metais em testes realizados *in vivo*, com aumento na produção de PSMT no fígado frente à exposição ao cromo (SANTOS, 2013) e ao chumbo (MONTEIRO et al., 2011), no fígado e nas brânquias dos peixes expostos ao níquel (PALERMO, 2012) e no fígado e músculo dos peixes expostos ao cádmio (SILVA, 2013). Com isso, pode-se dizer que nesta espécie o fígado é considerado um órgão-alvo nos processos de desintoxicação e armazenamento de metais e as metalotioneínas são um sistema de defesa importante em *P. lineatus* contra os efeitos deletérios dos metais.

Em virtude da diversidade de contaminantes existentes nos efluentes de curtumes, enzimas que não apresentam suas atividades diretamente ligadas à eliminação de metais também foram analisadas, como é o caso das enzimas de biotransformação EROD e GST. Desta forma, o aumento da atividade da EROD no fígado dos peixes mantidos próximo ao curtume (ponto B), pode estar relacionado com a eliminação de compostos orgânicos atuando na conversão de estruturas lipofílicas em estruturas hidrofílicas, com a adição de grupamentos polares, tornando os compostos menos tóxicos, para que assim sejam mais facilmente excretados (VAN DER OOST et al., 2003). Porém, mesmo a atividade da EROD não estar diretamente relacionada com a contaminação por metais, Bozcaarmutlu e Arinç (2007), que estudaram o efeito *in vitro* de alguns metais, incluindo o cromo, sobre as propriedades cinéticas de P450 NADPH-citocromo (CYP450) redutase, uma enzima que catalisa a transferência de elétrons a partir do NADPH para o citocromo P450, no peixe *Liza saliens*, e obtiveram como resposta que o cromo, independente do seu estado de oxidação, é inibidor da atividade de redutase de CYP450 no peixe. Com isso, pode-se dizer que o aumento na atividade da EROD não está relacionado com a presença do cromo no efluente do curtume, mas sim aos outros contaminantes presentes nesses resíduos.

A atividade da GST no fígado e nas brânquias apresentou aumento nos peixes expostos no ponto próximo ao curtume (B), indicando desta forma ativação do processo de biotransformação de fase II de xenobióticos orgânicos presentes nos resíduos líquidos do curtume. O aumento da atividade da GST hepática nos peixes expostos no ponto D, pode ter ocorrido devido à presença de produtos da transformação/degradação das substâncias presentes no efluente do curtume ao longo do trajeto do rio, que podem ser mais tóxicos que aquelas liberadas inicialmente, isso vai depender, principalmente, das propriedades do ambiente (químicas e físicas) e das características dos contaminantes (LYMAN, 1995; MOZETO e ZAGATTO, 2006). Esse aumento da GST nos peixes do ponto D também pode ter ocorrido devido à entrada de contaminantes nessa localidade, pois durante o período em que os peixes ficaram expostos, ocorreu aumento da condutividade, evidenciado nas medidas realizadas no dia da retirada das gaiolas da água nesse ponto e não ocorreram alterações significativas na atividade dessa enzima nos peixes expostos no ponto anterior (C). Alteração na atividade da GST no fígado do peixe *Carassius auratus* (LUSHCHAK et al., 2009; KUBRAK et al., 2010) e nas brânquias de *Danio rerio* (DOMINGUES et al., 2010) foram encontradas na presença do cromo, os quais apresentaram redução da atividade enzimática em todos os trabalhos. Desta forma, sugere-se que o aumento da atividade enzimática no presente trabalho está relacionado com compostos orgânicos e não diretamente à presença do cromo.

Esses resultados da atividade das enzimas de biotransformação, EROD e GST, mostraram que o efluente eliminado pelo curtume causa ativação do processo de biotransformação tanto em fígado quanto em brânquia de *P. lineatus*. Porém não é possível discriminar se as alterações encontradas estão relacionadas diretamente ao cromo ou a outros contaminantes presentes no efluente do curtume.

A entrada de um xenobiótico no organismo pode causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Contaminantes orgânicos e metais podem estimular a produção de ERO de diferentes maneiras, por ciclo redox, reações redox de metais de transição, ou também durante os processos de biotransformação (principalmente de fase I), e se não forem adequadamente combatidas podem dar início ao processo de estresse oxidativo, causando danos oxidativos nos componentes celulares (LIVINGSTONE, 2001). A glutathiona (GSH) é considerada um dos principais antioxidantes não enzimáticos, participando da

primeira linha de defesa contra as ERO, neutralizando diretamente os pró-oxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

A concentração de glutathiona apresentou-se aumentada no fígado dos peixes expostos no ponto B, e também no fígado dos peixes mantidos no ponto D. Esse aumento na concentração de GSH pode estar relacionado com aumento da síntese de GSH pelo organismo para suprir a demanda exigida pela atividade aumentada da GST nesses mesmos grupos, sendo a GSH conjugada com o xenobiótico pela GST, para que assim o contaminante seja mais facilmente excretado. Ou também pode estar atuando diretamente como antioxidante, protegendo as células contra os efeitos deletérios dos contaminantes presentes no efluente do curtume. Esse aumento na síntese de GSH também pode ter ocorrido para suprir o uso desta na presença do cromo, pois quando o Cr (VI) entra nas células é rapidamente reduzido aos seus intermediários Cr (V), Cr (IV) até Cr (III) de maior estabilidade. E esta redução pode ser realizada por redutores intracelulares como a própria GSH, ácido ascórbico, cisteína, ácido lipóico, frutose, ribose e outros, porém durante esse processo de redução do Cr (VI) ocorre a formação de radicais livres, os quais podem reagir com proteínas, lipídios, DNA, causando vários danos celulares (VALKO et al., 2006). Lushchak et al. (2008) e Kubrak et al. (2010) relataram aumento da concentração de GSH no fígado dos peixes *Carassius auratus* frente a exposição ao cromo.

No presente trabalho não foram evidenciados danos celulares, como peroxidação lipídica e quebras no DNA, entre os grupos analisados, possivelmente porque as concentrações dos antioxidantes, GSH e PSMT, apresentaram-se elevadas nos pontos pós-curtume (B), evitando os danos direta ou indiretamente causados pelos contaminantes presentes no efluente do curtume. Isso porque quando o sistema de defesa antioxidante não é suficiente ou adequado para combater as ERO, pode ocorrer uma alteração do balanço redox e assim se estabelecer um desequilíbrio pró-oxidante celular, denominado de estresse oxidativo, que pode gerar danos celulares e teciduais, como peroxidação lipídica, danos em proteínas, inativação de enzimas e quebras no DNA (MASELLA et al., 2005; AMADO et al., 2009). Mesmo não apresentando danos celulares nos peixes expostos pós-curtume no presente trabalho, outros estudos realizados com efluentes líquidos de curtume evidenciaram que estes podem causar danos à biota residente nesses locais contaminados. Como por exemplo, Tagliari et al. (2004) encontraram

aumento na peroxidação lipídica em fígado de peixes *Gymnogeophagus gymnogenys* coletados em um rio no Rio Grande do Sul, que recebe efluente de indústrias de couros e calçados, quando comparado com peixes coletados de uma lagoa referência. Matsumoto et al. (2003) indicaram efeito genotóxico de água contaminada por curtume, com concentrações baixas de cromo ( $10 \mu\text{gL}^{-1}$ ), em testes realizados *in vitro* com células CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês). E Matsumoto et al. (2006) expuseram peixes da espécie *Oreochromis niloticus* à água coletada de um rio em Franca (SP), que recebe efluente de um curtume, diluída 1:1 (v/v), durante 72 h e também obtiveram, através do teste do cometa, aumento de danos no DNA nos peixes expostos à água coletada pós-curtume. Desta forma, o efluente líquido gerado por curtumes pode causar danos às membranas biológicas e também no DNA, podendo ser considerados genotóxicos.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) é um biomarcador bioquímico bastante utilizado em monitoramento de ambientes contaminados, sua principal função é quebrar a acetilcolina (ACh), durante a transmissão do impulso nervoso, mantendo assim o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (VAN DER OOST et al., 2003). A atividade da AChE é extremamente importante em muitas funções fisiológicas, como na localização de presas, fuga do predador e orientação para o encontro de alimentos (DUTTA e ARENDS, 2003). A atividade desta enzima foi avaliada tanto no cérebro quanto no músculo dos peixes, porém não foram observadas alterações de sua atividade entre os pontos em nenhum dos tecidos analisados. Desta forma, pode-se dizer que nas devidas condições do presente estudo, o efluente eliminado pelo curtume não apresentou neurotoxicidade. Domingues et al. (2010), analisaram a atividade da AChE em adultos de Zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao cromo, em diferentes concentrações, durante 96 h e também não evidenciaram alteração na atividade desta enzima no cérebro dos peixes.

#### **4.5 CONCLUSÕES**

Diante dos resultados deste trabalho, pode-se inferir que o efluente eliminado pelo curtume, apesar de apresentar tratamento prévio, causa comprometimento da qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte, podendo causar alterações nos biomarcadores bioquímicos e acúmulo de cromo nos animais

que habitam esse ecossistema. Isto foi constatado pelas concentrações de cromo na água e no sedimento coletados nos pontos após a descarga de efluentes do curtume e os peixes expostos no ponto B apresentaram maiores alterações nos biomarcadores analisados que os peixes expostos nos demais locais. Pois, apresentaram acúmulo de cromo no fígado, aumento da atividade da EROD e GST, aumento na concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas e no conteúdo de GSH, quando comparados com os peixes do anterior ao curtume (ponto A). Desta forma, a aplicação de um conjunto de biomarcadores em *Prochilodus lineatus* pode ser considerada uma boa ferramenta para monitoramento da qualidade da água de ambientes impactados por curtumes e pode ser aplicada em futuros trabalhos de monitoramento ambiental, para que assim ações preventivas e medidas mitigadoras possam ser efetivadas.

#### 4.6 AGRADECIMENTOS

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), pelo fornecimento dos peixes utilizados no trabalho. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq e CAPES), pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida à B. Lunardelli. E ao CNPq pela bolsa produtividade concedida à C.B.R. Martinez. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de B. Lunardelli pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2115–2123, 2009.

BEUTLER, E., DUROM, O., KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.61, p.882-890, 1963.

BOZCAARMUTLU, A.; ARINÇ, E. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet *Liza saliens*. **Toxicology in vitro**, v.21, p.408-416, 2007.

BRADFORD, M.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, p.248-254, 1976.

BURATINI, V.B.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Ed. Rima, São Carlos, 478p. 2006.

BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno da Saúde Pública**, v. 19, p. 465-473, 2003.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTED, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CAMARGO, M.M.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.94, p.40-46, 2009.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: AMSTRONG, D. (Ed.). **Free radical and antioxidants protocols**. New Jersey: Humana Press, pp.377-387, 1998.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, A. An In Situ Bioassay Integrating Individual and Biochemical Responses Using Small Fish Species. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 667-681, 2004

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CETESB - COMPANHIA, DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas de amostragem. **São Paulo**, 2009.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>. Acesso em: 07 dez. 2013.

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.K.; MENDO, S.; SOARES, A.M.V.M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.152, p.338-345, 2010.

DUTTA, H.M.; ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p. 157-162, 2003.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES J.R.V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

FALFUSHYNSKA, H.I.; STOLYAR, O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.729-736, 2009.

FLEET, J.C.; GOLEMBOSKI, K.A.; DIETERT, R.R.; ANDREWS, G.K.; MCCORMICK, C.C. Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.258, G926-G933, 1990.

GOEL, P.K. **Water pollution: causes, effects and control**. 2 ed. New Delhi: New Age International, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon Press, Oxford, p. 146-148, 2005.

JORDÃO, C.P.; ALESSANDRO, C.S.; JOSÉ, L.P.; BRUNE, W. Contaminação por Crômio de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, v.22, p.47-52, 1999.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KLAVINS, M.; POTAPOVICS, O.; RODINOV, V. Heavy metals in fish from lakes in Latvia: concentrations and trends of changes. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.82, p.96-100, 2009.

KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T.A., Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KUBRAK, O.I.; LUSHCHAK, O.V.; LUSHCHAK, J.V.; TOROUS, I.M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.152, p.360-370, 2010.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348–354, 2009.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; NYKORAK, M.Z.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. **Aquatic Toxicology**, v.87, p.108-114, 2008.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; LOZINSKY, O.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. **Aquatic Toxicology**, v.93, p.45-52, 2009.

LYMAN, W.J. Transport and transformation processes. In: RAND, G. M. (ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; 2 nd, Taylor & Francis: Washington, p. 449-492, 1995.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MARTINEZ, M. **Aplicação de parâmetros morfométricos de drenagem na bacia do rio Pirapó: o perfil longitudinal**. Dissertação (mestrado em Geografia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica. p. 551-577, 2002.

MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.577-586, 2005.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALLAGUTI, M.I.; MARIN-MORALES, M.A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. **Cytologia**, v.68, p.395-401, 2003.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

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

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.S.M.; VILELA, M.B.F.A.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.104, p-291-298, 2011.

MOZETO, A.A. Sedimentos e particulados lacustres: amostragem e análises biogeoquímicas. In: BICUDO, C.E.M. & BICUDO, D.C. (Orgs.) **Amostragem em Limnologia**. São Carlos: RIMA Editora. p.295-341, 2004.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Ed. Rima, São Carlos, p.295-320, 2006.

NASCIMENTO, C.R.; SOUZA, M.M.; MARTINEZ, C.B. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.155, p.456-461, 2012.

OBASOHAN, E. E. Heavy metals concentrations in the offal, gill, muscle and liver of a freshwater mudfish (*Parachanna obscura*) from Ogba River, Benin city, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, 2007.

PALANIAPPAN, P. L.; KARTHIKEYAN, S. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 229-236, 2009.

PALERMO, F.F. **Bioacumulação e os efeitos do níquel em um peixe neotropical**. Dissertação (em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RAMSDORF, W.A.; GUIMARÃES, F.S.F.; FERRARO, M.V.M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; CESTARI, M.M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v.673, p.78-81, 2009.

ROBERTS, A.P.; ORIS, J.T. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.138, p.221-228, 2004.

RODRIGUES, M.L.K. **Origem, distribuição e mobilidade potencial de metais pesados em ambiente fluvial impactado por curtumes**. Tese (doutorado em Geociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SANTOS, F.E.R.A. **Acúmulo de cromo e seus efeitos genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. Dissertação (em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SANTOS, T.G.; MARTINEZ, C.B. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v.89, p.1118-1125, 2012.

SILVA, A.O.F. **Exposição aguda do teleósteo *Prochilodus lineatus* ao cádmio: bioacumulação, efeitos genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais**. Tese (em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.112-120, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SUGIYAMA, M. Role of physiological antioxidants in chromium (VI)-induced cellular injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.12, p.397-407, 1992.

SUZUKI, K.T.; SOMEYA A.; KOMADA Y.; OGRA Y. Roles of metallothionein in copper hemeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.88, p.173-182, 2002.

- TAGLIARI, K.C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.561, p.101-117, 2004.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v.121, p.307-320, 2003.
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidativestress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p.36-43, 2007.
- VELMA, V.; VUTUKURU, S.S.; TCHOUNWOU, P.B. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. **Reviews on environmental health**, v.24, p.129-146, 2009.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v.146, p.281-300, 2007.
- VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., FABBRI, F. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. **Marine Environmental Research**. v.44, p.69-84, 1997.
- VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.5, p.179-182, 2008.
- ZHOU, Q.; ZHANG, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v.606, p.135-150, 2008.
- ZORITA, I., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., APRAIZ, I., CANCIO, I., ORBEA, A., SOTO, M., MARIGÓMEZ, I., CAJARAVILLE, M.P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**, v.153, p.157-168, 2008.

## 5 MANUSCRITO II

### **Índice integrado de resposta de biomarcadores em duas espécies de peixes neotropicais para avaliação da contaminação aquática de um rio que recebe efluente de curtume**

Bruna Lunardelli, Millena Terezinha Cabral e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Laboratório de Ecofisiologia Animal - Departamento de Ciências Fisiológicas  
Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

---

#### **RESUMO**

O monitoramento de ambientes contaminados pode ser realizado através de análises de biomarcadores bioquímicos e genéticos em animais expostos nesses locais, e para melhores resultados é recomendada a avaliação de vários biomarcadores simultaneamente. Desta forma, para avaliação da qualidade do rio Bandeirantes do Norte (Rolândia-PR, Brasil), que recebe efluente de um curtume, testes *in situ* foram realizados com as espécies de peixes nativas *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas*. Para isto, foram selecionados quatro pontos neste rio: ponto A - a montante do curtume, ponto B - próximo ao curtume, pontos C e D - localizados a jusante do curtume. Os peixes das duas espécies confinados durante 96 h no rio Bandeirantes do Norte apresentaram várias alterações nos biomarcadores analisados, como aumento na biotransformação, no conteúdo de antioxidantes, na acetilcolinesterase e danos celulares. Com esses resultados foi aplicado o IBR (Índice Integrado de Resposta dos Biomarcadores). Os valores de IBR, para as duas espécies, apresentaram padrões diferentes, mas apresentaram os pontos com maior contaminação, localizados mais próximos ao curtume (B e C). Com isso, conclui-se que efluentes eliminados por curtumes em ecossistemas aquáticos potencializa a contaminação existente nesse rio e podem causar alterações bioquímicas na biota desses locais, podendo ser diferentes para as espécies, sendo umas mais sensíveis que outras.

**Palavras-chaves:** Biotransformação, estresse oxidativo, danos oxidativos, genotoxicidade, *Prochilodus lineatus*, *Serrapinnus notomelas*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos estão sendo cada vez mais prejudicados pela poluição decorrente do crescimento exacerbado da industrialização e da urbanização e suas atividades: produção, consumo e eliminação de produtos e resíduos. Mais de um terço da água doce acessível é utilizada em atividades industriais, agrícolas e domésticas (FREIRE et al., 2008). As indústrias de curtimento de couros (curtumes) são consideradas grandes poluidoras dos ecossistemas aquáticos fluviais devido à eliminação de grande quantidade e diversidade de poluentes utilizados no tratamento do couro, visando a melhoria e qualidade do produto (JORDÃO et al., 1999). Essa problemática contribui para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000).

A avaliação dos efeitos dos poluentes aquáticos pode ser realizada por meio de testes de toxicidade, que estão sendo cada vez mais utilizados para a determinação dos efeitos de contaminantes em organismos aquáticos e também para a avaliação da qualidade da água (FERREIRA, 2003). Os testes *in situ* são considerados ferramentas úteis em Ecotoxicologia principalmente porque integram relevância ecológica em testes de toxicidade, representando mais fielmente a realidade a qual os animais estão expostos (CASTRO, 2004). Estes testes consideram todas as variações que podem ocorrer no ambiente que se deseja estudar, como mudanças de temperatura, pluviosidade e variações nas concentrações de contaminantes ou na biodisponibilidade dos mesmos.

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois estão presentes em vários ambientes, apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos, sendo considerados excelentes modelos biológicos (JESUS e CARVALHO, 2008). Entretanto, poucas espécies nativas são utilizadas em testes de toxicidade no Brasil e assim, pouco se sabe sobre a sensibilidade das espécies de peixes neotropicais a diversas classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004).

Duas espécies de peixes nativas da região Neotropical que podem ser utilizadas em testes de toxicidade são: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915). A espécie *P. lineatus*, pertencente à

ordem Characiformes e família Prochilodontidae, é amplamente distribuída em toda a bacia do Rio Paraná-Rio Paraguai, em rios do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia, e rio Paraíba do Sul (CASTRO e VARI, 2004). É considerada uma espécie de peixe adequada para estudos de monitoramento ambiental devido ao seu hábito alimentar detritívoro, o que o deixa em contato com xenobióticos na água e nos sedimentos e também se tem mostrado ser sensível à diversidade de contaminantes na água (CAMARGO e MARTINEZ, 2006; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; SIMONATO et al., 2008). Já a espécie *S. notomelas*, da ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Cheirodontinae, é encontrada na Bacia do Alto rio Paraná (MALABARBA, 2003) e é indicada para uso em testes de toxicidade aquática, pois é um peixe pequeno, não necessitando de gaiolas complexas para os testes (CASTRO et al., 2004) e é de fácil criação em tanques de piscicultura (MELETTI, 2003). Esta espécie é recomendada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993), pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1990) e pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1990), que a utiliza em seus testes, porém ainda são poucos os trabalhos científicos que utilizam esta espécie em teste de toxicidade.

As alterações bioquímicas, fisiológicas, histológicas ou genéticas encontradas em peixes utilizados no monitoramento de ambientes contaminados podem servir como biomarcadores de poluição ambiental (CAZENAVE et al., 2009). Os biomarcadores refletem a interação entre o sistema biológico e os contaminantes e são normalmente sinais iniciais de alterações biológicas a serem detectados nos organismos (VAN DER OOST et al., 2003). Desta forma, o uso de biomarcadores possibilita antecipar alterações em níveis superiores de organização biológica, como populações, comunidades ou ecossistemas, auxiliando na priorização de sistemas de controle e estratégias de intervenção, preventivas ou de remediação (CAJARAVILLE et al., 2000; MARTINEZ, 2006; JESUS e CARVALHO, 2008). Sendo assim, é recomendado em testes de toxicidade o uso de diversos tipos de biomarcadores simultaneamente, refletindo de forma mais completa os danos à saúde dos organismos ou as adaptações destes frente aos ambientes impactados (CAJARAVILLE et al., 2000; ZORITA et al., 2008).

O uso de uma abordagem de monitoramento baseado em biomarcadores, como uma ferramenta para a avaliação ambiental, é muitas vezes limitado pela falta de análises estatísticas integradas. Desta forma, Beliaeff e Burgeot (2002)

desenvolveram uma metodologia, chamada de "Resposta Integrada de Biomarcadores" (IBR), capaz de avaliar e integrar as variações nas respostas de uma bateria de biomarcadores em um único valor ou gráfico, facilitando a interpretação e compreensão das alterações encontradas nos vários biomarcadores utilizados para o diagnóstico ambiental. O IBR tem sido utilizado em estudos de campo e de laboratório (DAMIENS et al., 2007; ARZATE-CARDENAS; MARTINEZ-JERONIMO, 2011; SERAFIM et al., 2011). Uma segunda versão para o índice (IBRv2) foi desenvolvida por Sanchez et al. (2013), com o objetivo de modificar o cálculo IBR para evitar erros devido a alguns pontos fracos existentes na primeira versão. Para isto, basearam o cálculo do IBRv2 nos desvios encontrados dos resultados dos biomarcadores do local estudado (contaminado) comparados com os resultados dos biomarcadores de um local referência, sendo assim comparando um estado de perturbação com um estado sem perturbações.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi aplicar os biomarcadores: etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glutathiona-S-transferase (GST), glutathiona (GSH), acetilcolinesterase (AChE), peroxidação lipídica (LPO), proteínas carboniladas (PCO), proteínas semelhantes às metalotioneína (PSMT) e danos no DNA em tecidos das espécies de peixes *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas*, submetidos a testes *in situ* no rio Bandeirantes do Norte (Rolândia, PR - Brasil), e aplicação do IBR nos pontos selecionados para avaliação da qualidade da água desse rio.

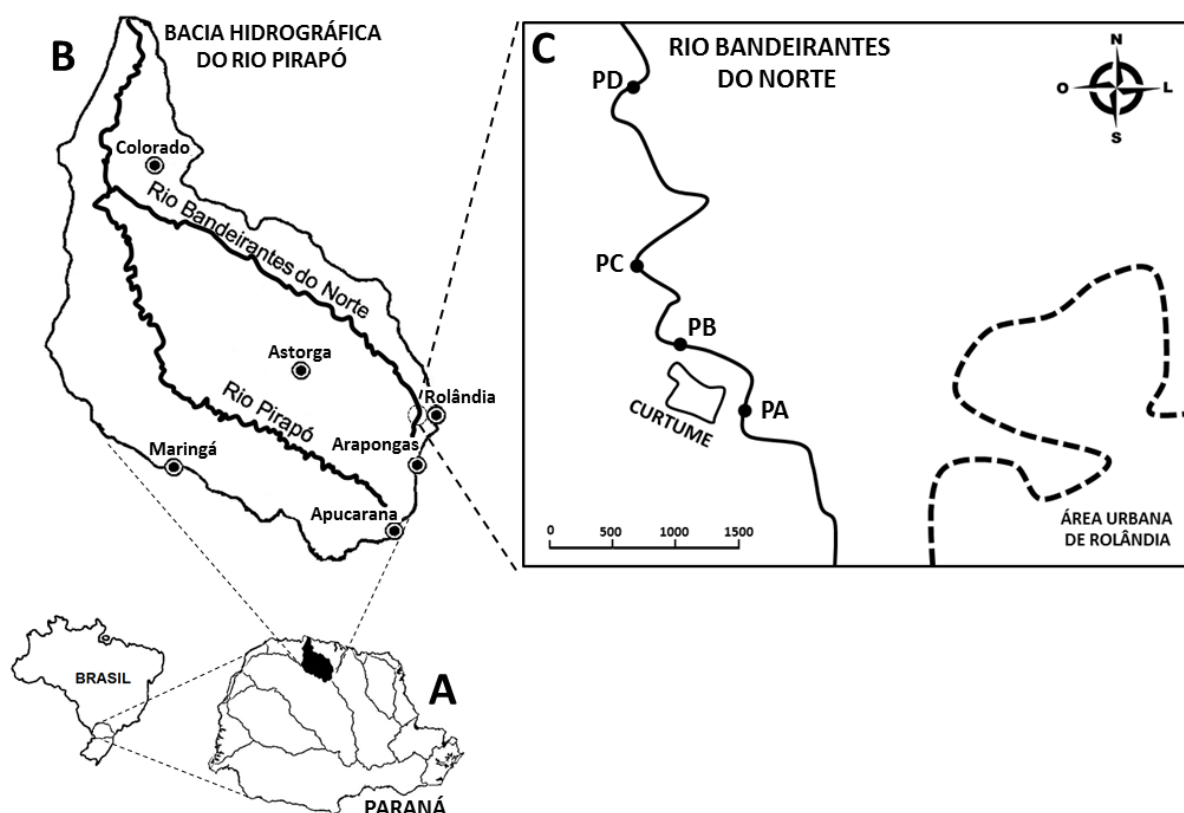
## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Locais dos Testes *in situ*

O rio Bandeirantes do Norte apresenta 149 km de extensão e é considerado o maior afluente do rio Pirapó, cuja bacia hidrográfica localiza-se no norte do Estado do Paraná (Figura 18 A e B) (MARTINEZ, 2005). Este rio está sujeito a receber efluentes domésticos, industriais e agrícolas desde sua nascente e em Rolândia (PR) na região rural do município, passa próximo a um curtume, o qual contribui com sua contaminação devido o despejo de efluentes líquidos.

Os testes *in situ* foram realizados em quatro locais do rio Bandeirantes do Norte no município de Rolândia, norte do Paraná (Figura 18 C). O Ponto A (PA), 23°18'23.94"S / 51°25'5.38"O, está localizado 1000 m antes do local de lançamento

de efluente do curtume, desta forma é o único ponto que não apresenta influência da contaminação gerada por esta indústria. O Ponto B (PB),  $23^{\circ}18'9.34''\text{S}$  /  $51^{\circ}25'27.75''\text{O}$ , está a 50 m após o local de descarga de efluentes do curtume. O Ponto C (PC),  $23^{\circ}17'51.31''\text{S}$  /  $51^{\circ}25'35.67''\text{O}$ , e o Ponto D (PD),  $23^{\circ}17'32.11''\text{S}$  /  $51^{\circ}25'20.44''\text{O}$ , localizados a 800 m e 1750 m, respectivamente, após curtume, afim de verificar a ocorrência de um gradiente de contaminação gerados pelos contaminantes desta indústria.



**Figura 18** - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Pirapó no norte do Estado do Paraná (A). B: Localização do Rio Bandeirantes do Norte na Bacia do rio Pirapó. C: Localização dos pontos (PA, PB, PC e PD) onde foram realizados os testes *in situ* no rio Bandeirante do Norte em Rolândia.

### 5.2.2 Delineamento experimental

Para os testes *in situ* foram utilizados juvenis de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), medindo  $12,01 \pm 0,96$  cm e pesando  $19,77 \pm 4,75$  g (média  $\pm$  D.P.,  $n = 120$ ) e *Serrapinnus notomelas* (Eingenmann, 1915) medindo  $4,17 \pm 0,33$  cm e pesando  $0,96 \pm 0,23$  g (média  $\pm$  D.P.,  $n = 480$ ). Ambos fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), PR. Os testes *in situ* foram realizados entre fevereiro e março de 2013, na estação de verão, considerada chuvosa para região.

Uma amostragem de um grupo de peixes foi realizada logo após a coleta nos tanques de cultivo na Estação de Piscicultura da UEL, antes destes serem submetidos aos testes *in situ*, sendo que os parâmetros analisados neste grupo indicaram os níveis basais dos biomarcadores dos peixes utilizados no trabalho. Os resultados desses parâmetros foram utilizados para aplicação do índice IBR.

Para os testes *in situ*, os animais foram transportados para o campo em sacos plásticos, com água e oxigênio, e transferidos para gaiolas de monitoramento, já devidamente posicionadas dentro d'água, onde ficaram confinados por um período de 96 h. Em cada ponto experimental foram expostos 24 *P. lineatus*, divididos em duas gaiolas e 96 *S. notomelas* divididos em seis gaiolas menores.

As gaiolas onde foram mantidos os *P. lineatus* foram confeccionadas em ferro e revestidas com tela de malha de 5 mm, com dimensões de 50x60x30 cm (volume de 90 litros). As gaiolas para os *S. notomelas*, foram confeccionadas seguindo metodologia de Meletti e Rocha (2002), com tubos de PVC, com 4 aberturas laterais e uma no fundo, revestidas com tela de nylon de 2 mm, com capacidade de 3,3 L. Ambos os tipos de gaiola ficaram apoiadas no substrato e permitiram a circulação da água e a alimentação das duas espécies de peixes.

No dia em que as gaiolas foram colocadas no rio e no dia de retirada das mesmas, em cada ponto de teste *in situ* foram realizadas medidas de temperatura, pH, turbidez e condutividade da água, por meio de um medidor multiparâmetros (Horiba U-52).

Decorrido o período de 96 h, os exemplares de *P. lineatus* foram amostrados, no campo, imediatamente após retirados das gaiolas. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L<sup>-1</sup>), medidos, pesados e foi coletada amostra de sangue da veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular e foram dissecadas amostras de brânquias, fígado, músculo e cérebro e transportadas, em gelo, para o laboratório, onde foram congeladas em ultra-freezer (-70°C) até o momento das análises dos biomarcadores.

Os exemplares de *S. notomelas*, após o período de confinamento (96 h), foram retirados das gaiolas e transferidos para sacos plásticos com água do rio, e em seguida levados para o laboratório, onde foram amostrados. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,05 g.L<sup>-1</sup>), foram medidos e pesados, e em seguida foram mortos por secção medular. Uma alíquota de sangue foi retirada, com auxílio de uma pipeta, do local da secção e o sangue foi armazenado para o teste do

cometa. Em seguida, foi realizado nos *S. notomelas* o mesmo procedimento utilizado com os *P. lineatus*, de retirada dos tecidos e armazenamento das amostras. Foi realizado um “pool” de 4 animais, para conseguir quantidade suficiente de tecido e sangue para as análises dos biomarcadores.

O delineamento experimental e procedimento amostral foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL: Processo nº 19623.2012.17.

### 5.2.3 Biomarcadores bioquímicos

Para determinação da atividade da etoxiresorufina-O-deetilase e da glutathione-S-transferase, do conteúdo de glutathione e a ocorrência de peroxidação lipídica, as amostras de brânquias e fígado, foram pesadas, homogeneizadas (1:5 - m/v para as brânquias e 1:10 - m/v para o fígado) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7, centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C) e o sobrenadante foi separado para os ensaios enzimáticos. Para determinação do conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas, as brânquias e fígado foram pesados, homogeneizados (1:5 - m/v) em tampão (sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM,  $\beta$ -mercaptaetanol 1,3 mM), centrifugados (45 min., 21300 g; 4°C) e o sobrenadante separado para posterior análise. Para determinação da atividade da acetilcolinesterase, amostras de cérebro e músculo foram pesadas, homogeneizadas (1:10 - m/v) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7,5, centrifugadas (20 min, 15000 g, 4°C) e o sobrenadante separado para o ensaio enzimático.

#### a) *Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)*

A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-etoxiresorufina em resorufina, seguindo o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1 M; pH 7,6: NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos para o fígado e 20 minutos para a brânquia (excitação: 530 nm / emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>, baseada em uma curva padrão de resorufina.

*b) Glutathione-S-transferase (GST)*

A atividade da GST foi determinada seguindo a complexação da glutathione (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, e foi expressa em nmol CDNB min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>, de acordo com a metodologia descrita por Keen et al. (1976).

*c) Glutathione (GSH)*

A concentração de GSH foi determinada pela quantidade de tiol não proteico, de acordo com o método de Beutler et al. (1963), pela reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, que foi determinado em 412 nm. A GSH foi expressa em ug de GSH. mg de proteína<sup>-1</sup>, a partir de uma curva padrão para a GSH.

*d) Peroxidação lipídica (TBARS)*

A peroxidação lipídica foi estimada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, por meio do ensaio TBARS, seguindo a metodologia de Camejo et al. (1998). A determinação do conteúdo de MDA ocorreu pela reação com o ácido tiobarbiturico (TBA), com leitura de fluorescência (excitação: 535 nm / emissão: 590 nm) e expresso em equivalentes de malondialdeído (MDA) como µmol MDA. mg de proteína<sup>-1</sup>, utilizando uma curva padrão de MDA.

*e) Proteínas Semelhantes às Metalotioneínas (PSMT)*

O conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas foi determinado segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997) com modificações. Os sobrenadantes dos tecidos centrifugados foram submetidos a fracionamento ácido etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutathione (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas expresso em nmol de GSH. mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### *f) Acetilcolinesterase (AChE)*

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com a técnica de Ellman et al. (1961), adaptada para microplacas conforme descrito por Alves Costa et al. (2007), a partir da reação do iodeto de acetilcolina com o reagente de cor DTNB. O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, a tiocolina, reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, um ânion de coloração amarela. As leituras de absorvância ocorreram durante 6 minutos, em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE foi expressa em  $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### *g) Proteínas totais*

Os resultados dos biomarcadores foram expressos por mg de proteína, determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, utilizando uma curva de calibração com albumina de soro bovino (BSA) e leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

### **5.2.4 Ensaio do Cometa**

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) e com modificações descritas por Ramsdorf et al. (2009). Após a amostragem, o sangue foi adicionado à soro bovino fetal (1:100 - v/v), a fim de manter as células viáveis até o momento do teste, no máximo 48 h após a coleta do sangue. Esta solução foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão e esta mistura distribuída em lâminas recobertas com agarose normal (1,5%), as quais foram cobertas por lamínulas, e em seguida mantidas em temperatura de 4-8 °C por cerca de 30 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas passaram por etapa de lise, mantidas por 1 h em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, DMSO 10 %, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) a 4-8 °C. Em seguida, foram submetidas à etapa de desespiralização do DNA, na qual as lâminas foram transferidas para cubas horizontais de eletroforese contendo solução tampão de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH > 13), durante 30 minutos. Depois, foram submetidas à etapa de eletroforese, a 25 volts e 300 mA, por 20 minutos. Após término da corrida de eletroforese as lâminas passaram por etapa de neutralização com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 minutos, e em seguida, fixação em etanol por 10

minutos. Após a secagem das lâminas, estas foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram examinadas em microscópio de fluorescência na objetiva de 40 vezes. Foram analisados 100 nucleóides por animal, por meio de teste cego e de acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados considerando o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta, menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. A partir dessa classificação foram feitos os cálculos dos escores de danos para cada indivíduo, somando o produto do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe, gerando um valor entre 0 e 300.

#### **5.2.5 Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)**

O índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) foi aplicado nos biomarcadores analisados no presente trabalho de acordo com Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez et al. (2013). Para o cálculo do índice, a razão dos dados de cada biomarcador entre os pontos experimentais (A, B, C e D) individualmente e os níveis basais dos biomarcadores (do grupo de peixes amostrados na piscicultura) foi logaritimizada ( $Y_i$ ), e calculada a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) gerais para cada parâmetro. Os valores de  $Y_i$  foram padronizados através da fórmula:  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$  e a diferença entre  $Z_i$  e  $Z_0$  (níveis basais) determinaram os valores de A. Por meio da somatória dos valores de A de cada biomarcador, o IBR foi calculado para cada local de exposição. Em cada local, os parâmetros foram representados em um valor único, indicando o desvio do biomarcador investigado em cada ponto com relação aos biomarcadores dos peixes amostrados na piscicultura.

#### **5.2.6 Análises estatísticas**

Os valores médios obtidos de cada biomarcador de cada espécie de peixe foram comparados entre os locais onde foram realizados os testes *in situ* (Ponto A, B, C e D). Para estas análises foi utilizada análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos

dados (normalidade e homogeneidade de variância), seguido por um teste de comparações múltiplas quando indicado. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

### 5.3 RESULTADOS

Na tabela 2 estão expressos os resultados dos biomarcadores analisados nos grupos de peixes amostrados na piscicultura (UEL) antes de serem submetidos aos testes *in situ*. Esses resultados indicaram os níveis basais dos biomarcadores para cada espécie e foram utilizados posteriormente para o cálculo do IBR.

**Tabela 2:** Resultados dos biomarcadores bioquímicos e genotóxico em diferentes tecidos dos peixes *P. lineatus* e *S. notomelas* antes de serem submetidos aos testes no rio Bandeirantes do Norte.

Biomarcador	Tecidos	<i>P. lineatus</i>	<i>S. notomelas</i>
<b>EROD</b> (pmol resorufina min <sup>-1</sup> . mg ptn <sup>-1</sup> )	Fígado	0,05 ± 0,01 (6)	0,08 ± 0,02 (7)
<b>GST</b> (nmol CDNB min <sup>-1</sup> . mg ptn <sup>-1</sup> )	Fígado	75,03 ± 2,81 (6)	158,73 ± 7,74 (7)
	Brânquias	103,71 ± 61,42 (6)	73,66 ± 5,73 (6)
<b>GSH</b> (ug GSH. mg ptn <sup>-1</sup> )	Fígado	8,71 ± 0,80 (7)	6,81 ± 1,13 (7)
	Brânquias	17,10 ± 1,49 (6)	3,70 ± 0,51 (8)
<b>PSMT</b> (nmol GSH. mg ptn <sup>-1</sup> )	Fígado	4,99 ± 0,35 (7)	11,15 ± 0,73 (7)
	Brânquias	4,02 ± 1,34 (7)	8,58 ± 1,19 (7)
<b>AChE</b> (nmol min <sup>-1</sup> . mg ptn <sup>-1</sup> )	Cérebro	33,65 ± 2,57 (9)	91,50 ± 5,94 (9)
	Músculo	93,62 ± 5,38 (8)	108,89 ± 10,69 (7)
<b>LPO</b> (μmol MDA. mg ptn <sup>-1</sup> )	Fígado	0,34 ± 0,06 (6)	0,25 ± 0,01 (7)
	Brânquias	0,41 ± 0,08 (8)	0,19 ± 0,02 (8)
<b>Danos DNA</b> (escore de danos)	Eritrócitos	114,86 ± 8,84 (7)	110,67 ± 4,76 (6)

Valores referentes às médias ± erro padrão (n)

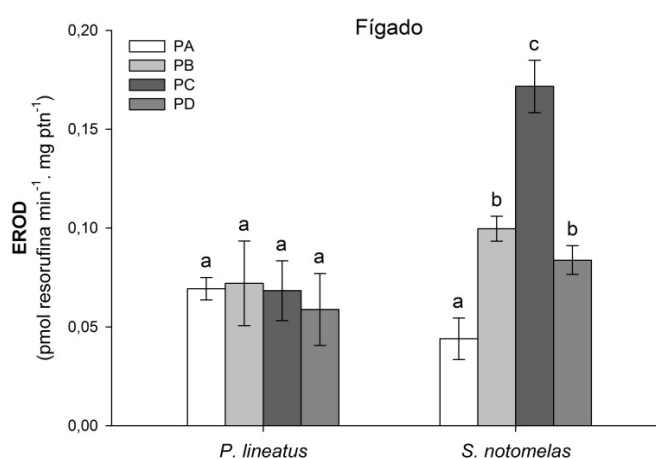
Os parâmetros físicos e químicos da água estão apresentados na Tabela 3. Destacam-se os altos valores de condutividade obtidos nos pontos C e D, medidos nos dias em que as gaiolas foram retiradas da água, isso se deve porque durante o período de exposição da gaiola no rio nesses pontos houve precipitação pluviométrica, elevando a condutividade da água.

**Tabela 3:** Parâmetros físicos e químicos da água ao longo do Rio Bandeirantes do Norte (Pontos A, B, C e D) durante o período experimental.

Pontos	Temperatura (°C)	pH	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)
Ponto A	21,74 - 21,19	7,53 - 7,43	181 - 222	14,8 - 14,8
Ponto B	21,20 - 21,26	7,50 - 7,44	192 - 259	17,5 - 16,5
Ponto C	20,61 - 21,22	7,85 - 7,21	293 - 518	13,1 - 38,8
Ponto D	21,90 - 20,11	7,66 - 7,48	197 - 483	-----

Valores referentes às medidas realizadas no dia em que as gaiolas com os peixes foram colocadas na água e no dia em que foram retiradas da água em cada ponto no rio Bandeirantes do Norte.

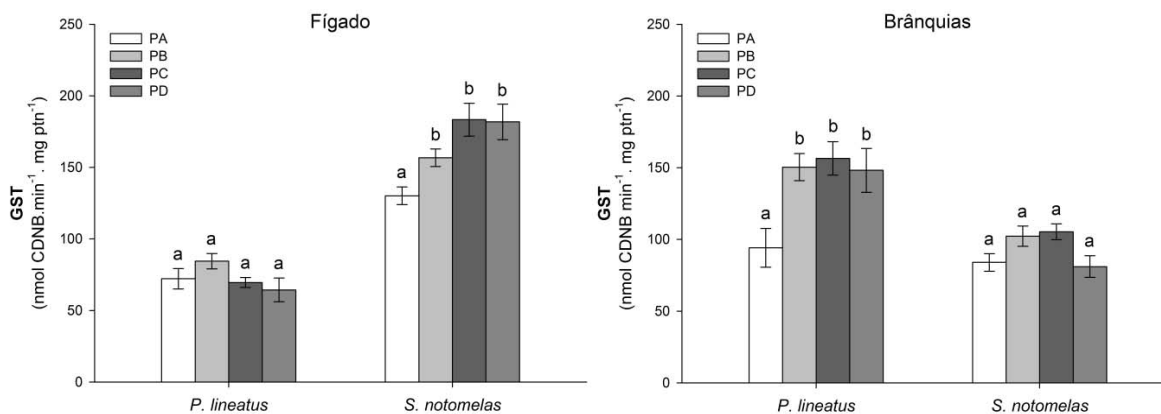
A atividade da enzima de biotransformação de fase I em peixes, a CYP1A, foi determinada pela atividade da enzima EROD e em *P. lineatus* essa enzima não apresentou alterações significativas ( $P = 0,615$ ) entre os grupos testados (Figura 19). No fígado dos *S. notomelas* a atividade da EROD apresentou aumento nos peixes expostos no ponto C, comparados com os demais pontos ( $P < 0,001$ ), e os peixes do ponto B e D também apresentaram aumento na atividade da EROD comparados com o ponto A.



**Figura 19:** Atividade da EROD hepática de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8-6$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

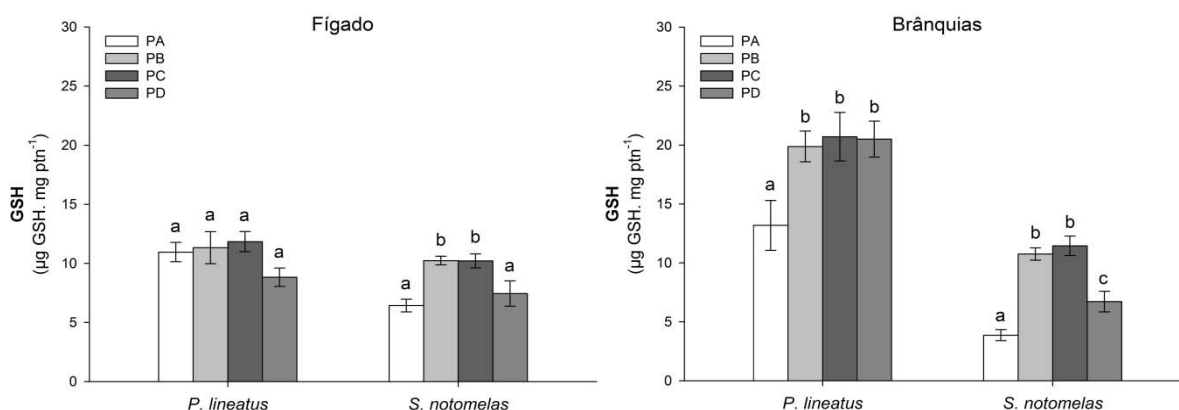
A atividade da enzima de biotransformação de fase II, a glutathione S-transferase no fígado de *P. lineatus* não variou entre os grupos analisados ( $P = 0,170$ ). Em *S. notomelas*, os peixes expostos no ponto B, C e D apresentaram aumentos significativos quando comparados com o ponto A ( $P < 0,001$ ) (Figura 20

A). Nas brânquias, a atividade da GST em *P. lineatus* foi significativamente maior nos peixes expostos nos pontos pós-curtume (B, C e D) quando comparados com os peixes do ponto A ( $P = 0,005$ ). Em *S. notomelas*, a atividade da enzima GST não variou entre os grupos analisados ( $P = 0,035$ ) (Figura 20 B).



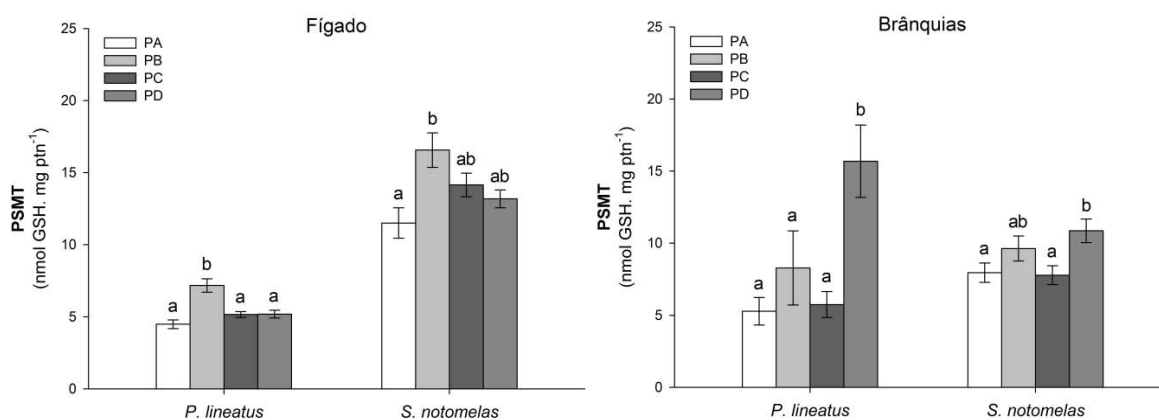
**Figura 20:** Atividade da GST no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8-7$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

No fígado de *P. lineatus* não houve alterações significativas na concentração de GSH ( $P = 0,208$ ), em nenhum dos grupos analisados (Figura 21 A). Em *S. notomelas*, os peixes expostos nos pontos B e C apresentaram concentrações maiores de GSH em relação aos peixes do ponto A ( $P < 0,001$ ). Nas brânquias de *P. lineatus* ocorreu aumento significativo ( $P = 0,023$ ) no conteúdo de GSH nos peixes expostos nos pontos pós-curtume (B, C e D) comparado com o ponto sem interferência dessa indústria. Nas brânquias de *S. notomelas* também foi verificado aumento significativo da concentração de GSH nos animais expostos nos pontos B, C e D em comparação com os peixes do ponto A ( $P < 0,001$ ) e os pontos B e C apresentaram valores maiores que o ponto D (Figura 21 B).



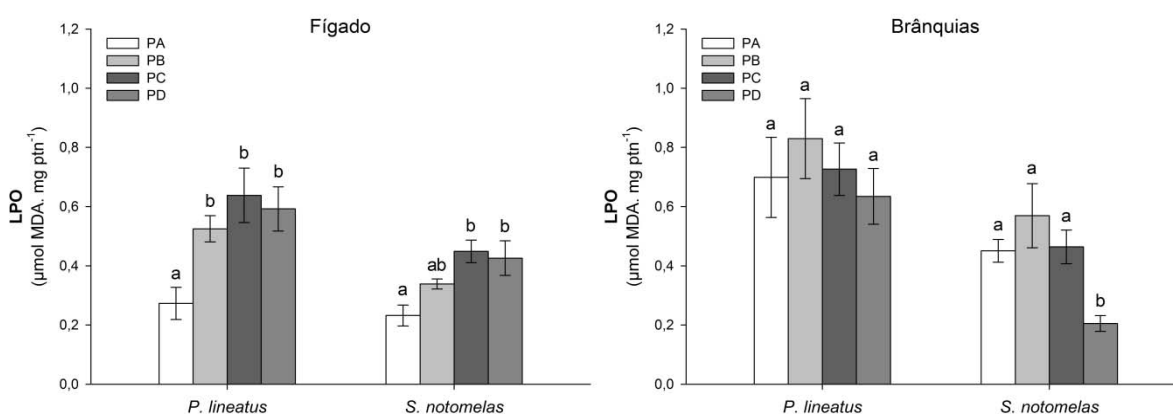
**Figura 21:** Conteúdo de GSH no fígado (A) e brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A concentração de PSMT em *P. lineatus* apresentou aumento no fígado dos peixes expostos no ponto B ( $P < 0,001$ ) comparando com os demais pontos. Em *S. notomelas*, os peixes expostos no ponto B apresentaram a maior concentração de PSMT ( $P = 0,008$ ) comparando com os peixes do ponto A, os animais dos pontos C e D apresentaram concentrações médias de PSMT semelhantes estatisticamente aos pontos A e B (Figura 22 A). Nas brânquias, o conteúdo de PSMT aumentou nos *P. lineatus* mantidos no ponto D comparado com os outros grupos ( $P = 0,002$ ). Em *S. notomelas*, os peixes expostos no ponto D apresentaram aumento do conteúdo de PSMT quando comparados com os animais mantidos no ponto A e C ( $P = 0,019$ ), e os peixes do ponto B apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos demais grupos (Figura 22 B).



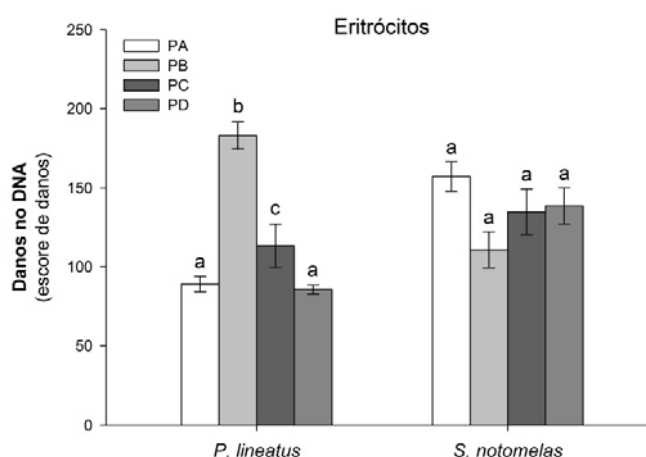
**Figura 22:** Concentração de PMST no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n = 8-6$ ). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

Os resultados de peroxidação lipídica hepática e branquial estão apresentados na Figura 23. Em *P. lineatus* ( $P = 0,006$ ) as concentrações de MDA, a qual indica peroxidação lipídica, no fígado dos animais expostos nos pontos pós-curtume (B, C e D) apresentaram aumento significativo comparados com os animais do ponto A. Em *S. notomelas*, houve aumento significativo ( $P = 0,006$ ) no conteúdo de MDA nos peixes expostos nos pontos C e D, quando comparados com o ponto A (Figura 23 A). As brânquias de *P. lineatus* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo de MDA ( $P = 0,478$ ). Porém em *S. notomelas* ocorreu redução ( $P = 0,002$ ) na concentração de MDA nos peixes mantidos no ponto D em relação aos demais grupos (Figura 23 B).



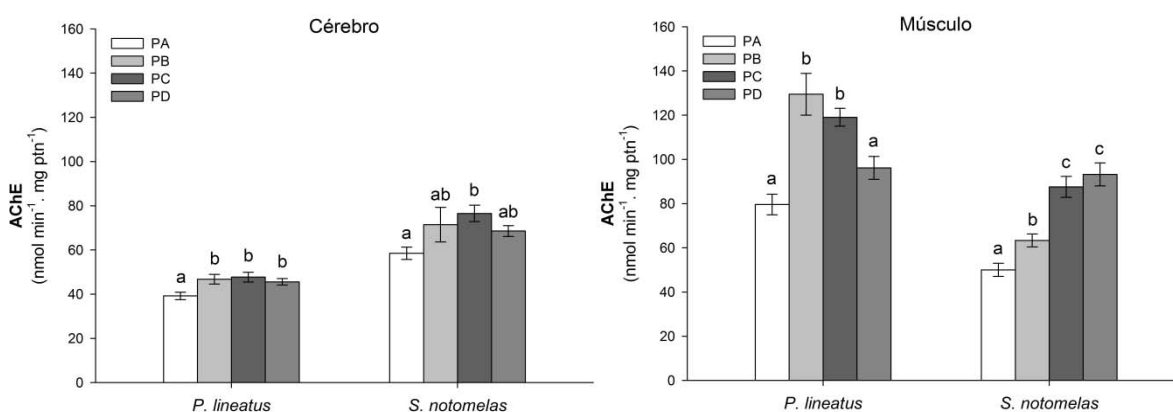
**Figura 23:** Conteúdo de MDA no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 8-6). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A análise de danos no DNA em células sanguíneas mostrou que houve um aumento nos *P. lineatus* expostos no ponto B em relação aos outros grupos ( $P < 0,001$ ) e nos peixes expostos no ponto C quando comparados com os pontos A e D. Em *S. notomelas* não houve diferenças significativas ( $P = 0,079$ ) no escore de danos no DNA entre os grupos analisados (Figura 24).



**Figura 24:** Escores médios de Danos no DNA em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 10-8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A atividade da acetilcolinesterase cerebral, em *P. lineatus* apresentou aumento significativo ( $P = 0,011$ ) nos peixes expostos nos pontos pós-curtume (B, C e D) comparados com o ponto A. Já em *S. notomelas* apenas o ponto C apresentou aumento ( $P = 0,026$ ) na atividade enzimática em relação ao ponto A, os pontos B e D apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre todos os pontos (Figura 25 A). Em *P. lineatus*, a atividade da AChE no músculo apresentou aumento ( $P < 0,001$ ) significativo nos pontos B e C comparados com os demais grupos. Em *S. notomelas*, ocorreu aumento significativo ( $P < 0,001$ ) na atividade dessa enzima nos pontos B, C e D comparados com o ponto A, e os pontos C e D apresentaram valores maiores que o ponto B (Figura 25 B).



**Figura 25:** Atividade da acetilcolinesterase no cérebro (A) e músculo (B) de *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas* submetidos a testes *in situ* ao longo do rio Bandeirantes do Norte (pontos A, B, C e D). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n = 10-8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $P < 0,05$ ).

A partir dos resultados obtidos para cada biomarcador analisado, em cada ponto e em cada espécie, o valor de IBR foi calculado dos pontos comparados com os valores dos biomarcadores do grupo de peixes amostrados antes de serem submetidos aos testes *in situ*, sendo esse valor distinto para cada espécie de peixe, dependendo das respostas de cada uma à exposição.

Os valores de IBR de cada ponto do rio Bandeirantes do Norte para *P. lineatus* estão representados na Tabela 4. O ponto A apresentou o menor valor de IBR (12,35), seguido pelo ponto D (14,54), depois pelo ponto C (16,08) e pelo ponto B, o qual apresentou maior valor de IBR (20,42). Na Tabela 5 estão os valores de IBR calculados a partir dos biomarcadores de *S. notomelas* em cada ponto experimental. O ponto D foi o ponto que apresentou menor índice de IBR (11,46), seguido pelo ponto A com valor de 14,18; o ponto B e C apresentaram os maiores valores de IBR, sendo estes bem de 16,04 e 17,68, respectivamente.

**Tabela 4:** Índices integrado das respostas de biomarcadores (IBRs) dos quatro pontos (A, B, C e D) do rio Bandeirantes do Norte para a espécie *Prochilodus lineatus*.

IBR TODOS OS PONTOS PARA <i>Prochilodus lineatus</i>													
	EROD fígado	GST fígado	GST brânquias	GSH fígado	GSH brânquias	PSMT fígado	PSMT brânquias	AChE cérebro	AChE músculo	LPO fígado	LPO brânquias	Danos DNA	IBR
<b>Ponto A</b>	2,23	0,38	0,40	1,58	1,36	0,61	0,52	1,03	0,83	0,59	1,98	0,84	<b>12,35</b>
<b>Ponto B</b>	2,43	1,17	1,57	1,82	0,79	2,05	1,37	2,22	1,66	1,18	2,62	1,54	<b>20,42</b>
<b>Ponto C</b>	2,16	0,76	1,73	2,12	1,00	0,18	0,68	2,35	1,23	1,70	2,12	0,04	<b>16,08</b>
<b>Ponto D</b>	1,39	1,53	1,51	0,10	0,95	0,21	2,59	2,04	0,14	1,50	1,62	0,97	<b>14,54</b>

**Tabela 5:** Índices integrado das respostas de biomarcadores (IBRs) dos quatro pontos (A, B, C e D) do rio Bandeirantes do Norte para a espécie *Serrapinnus notomelas*.

IBR TODOS OS PONTOS PARA <i>Serrapinnus notomelas</i>													
	EROD fígado	GST fígado	GST brânquias	GSH fígado	GSH brânquias	PSMT fígado	PSMT brânquias	AChE cérebro	AChE músculo	LPO fígado	LPO brânquias	Danos DNA	IBR
<b>Ponto A</b>	1,32	1,42	0,85	0,26	0,08	0,19	0,55	2,74	2,47	0,29	1,69	2,31	<b>14,18</b>
<b>Ponto B</b>	0,36	0,09	2,12	1,83	1,98	2,46	0,82	1,51	1,72	0,98	2,15	0,01	<b>16,04</b>
<b>Ponto C</b>	1,47	1,03	2,32	1,82	2,10	1,48	0,70	1,09	0,69	1,92	1,75	1,30	<b>17,68</b>
<b>Ponto D</b>	0,00	0,97	0,62	0,40	1,11	1,04	1,68	1,77	0,49	1,75	0,14	1,48	<b>11,46</b>

Assim, verificam-se maiores valores de IBR para o *P. lineatus* e o padrão de IBR dos pontos para cada espécie também não foi o mesmo. Para *P. lineatus* a ordem dos valores de IBR foi: ponto B > ponto C > ponto D > ponto A. Para *S. notomelas* a ordem de valores de IBR foi diferente: ponto C > ponto B > ponto A > ponto D.

## 5.4 DISCUSSÃO

O rio Bandeirantes do Norte é um dos principais rios do município de Rolândia, sendo que desde 1970 até 1984 sua água era utilizada para abastecimento público da região, essa atividade se encerrou devido ao aumento da poluição, tornando a água imprópria para o consumo. Esse rio está sujeito a receber efluentes domésticos e industriais, desde sua nascente, localizada em área urbana e industrial no município de Arapongas (PR). No seu trajeto, esse rio também recebe contaminantes agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes, pois está cercado por área rural. E passa próximo a um curtume, o qual contribui com sua contaminação devido o despejo de efluentes líquidos. Logo após o curtume o rio continua seu trajeto por área agrícola. A mata ciliar deste rio é pouco preservada, o que facilita ainda mais a entrada de poluentes para suas águas e conseqüentemente a exposição de sua biota à contaminação. Como este rio recebe diversos tipos de contaminantes ao longo de seu curso, as alterações encontradas nos biomarcadores dos peixes expostos nos diferentes pontos, podem ser diretamente relacionadas a um tipo específico de contaminante ou à mistura de contaminantes pré-existente no rio e/ou no efluente do curtume.

Os parâmetros físicos e químicos da água nos pontos experimentais não apresentaram grandes variações em seus valores. Ocorreu um aumento apenas na condutividade, no dia de retirada das gaiolas, nos pontos C e D. Isto pode ser devido ao fato de que durante a exposição dos animais choveu, aumentando a concentração iônica da água durante o período do experimento, pois ocorre ressuspensão do substrato e lixiviação superficial nas margens do rio.

Os biomarcadores são ferramentas de grande relevância ecológica e estão sendo utilizados em diversos trabalhos e estudos de monitoramento de ambientes impactados (VAN DER OOST et al., 2003). Na detoxificação de xenobióticos estão envolvidas enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação dos contaminantes. Essas enzimas apresentam como principal função alterar a estrutura química dos compostos orgânicos, formando derivados mais polares, convertendo estruturas lipofílicas em estruturas hidrofílicas, para que assim essas substâncias possam ser mais facilmente excretadas (AZEVEDO e DE LIMA, 2003). Há dois tipos principais de enzimas envolvidas no processo de biotransformação em peixes: as enzimas de fase I, dentre as quais se destacam as enzimas da subfamília CYP1A, e

as enzimas de fase II, como as enzimas da família da glutathione S-transferase (VAN DER OOST et al., 2003). Nos peixes expostos no rio Bandeirantes do Norte, o processo de biotransformação aumentou principalmente no fígado de *S. notomelas* nos peixes expostos nos pontos pós-curtume com alteração na atividade das enzimas EROD e GST. Em *P. lineatus* também ocorreu aumento de GST apenas em brânquias. A EROD é uma enzima catalisada pela subfamília CYP1A, quando ocorre indução da CYP1A na presença do xenobiótico, esta indução pode ser detectada indiretamente através da medida da atividade da enzima EROD. A CYP1A atua em reações de oxidação, hidrólise e redução, conferindo maior polaridade aos xenobióticos por inserir ou disponibilizar grupamentos hidroxila, tornando os compostos mais hidrofílicos. (VAN DER OOST et al., 2003). Já a GST atua na conjugação do xenobiótico com moléculas endógenas, a glutathione, resultando desta forma em produtos mais solúveis em água, menos tóxicos e ionizáveis, facilitando assim a sua excreção (NEWMAN e CLEMENTS, 2008). Desta forma, pode-se inferir que após o curtume ocorreu um aumento na concentração de contaminantes orgânicos na água e a necessidade dos organismos de eliminarem esses compostos via biotransformação. Foi verificado no fígado de *S. notomelas* expostos no ponto C, aumento na atividade da EROD em relação aos peixes nos demais pontos. Esse alto valor de atividade enzimática pode estar relacionado com a chuva presente durante a exposição desses animais, pois ocorreu aumento na entrada de contaminantes no rio e ressuspensão do sedimento, deixando os animais expostos aos xenobióticos.

A entrada de um xenobiótico, como contaminantes orgânicos e metais no organismo pode causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas ERO são oxidantes extremamente potentes, podendo reagir com macromoléculas celulares, causando diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular. Para prevenir danos celulares causados pelas ERO, os organismos aeróbicos apresentam mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, de defesa antioxidante (MARTINEZ, 2006). Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a GSH é a que mais se destaca, atuando no sequestro de radicais livres, neutralizando as ERO e assim impedindo danos celulares causados por elas (HERMES-LIMA, 2004). As duas espécies apresentaram aumento do conteúdo de GSH nas brânquias dos peixes expostos nos pontos pós-curtume (B, C e D) e apenas *S. notomelas* apresentou aumento desse tripeptídeo no fígado dos peixes expostos nos pontos pós-curtume. Estes resultados indicam tentativa dos

organismos de se defenderem contra a ação das ERO, e possível estado de estresse oxidativo. Outro fator que pode ter levado ao aumento na concentração de GSH, é da utilização deste nas reações de conjugação com o xenobiótico mediadas pela enzima GST (VAN DER OOST et al., 2003), desta forma pode ter ocorrido aumento na síntese ou na reciclagem de GSH, visto que ocorreu aumento da atividade enzimática da GST, conseqüentemente o uso e necessidade de GSH.

Como um dos principais poluentes existente nos efluentes de curtume é o metal cromo, foi realizada a análise da concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas, que são biomarcadores diretamente relacionados à exposição a metais, pois apresentam uma alta afinidade por íons metálicos livres, se ligando ao excesso de metais no organismo (MONSERRAT et al., 2007). No presente trabalho, *P. lineatus* e *S. notomelas* apresentaram aumento na concentração dessas proteínas no fígado dos peixes expostos no ponto logo após o curtume (ponto B), indicando possível contaminação por cromo nesse local, que poderia ter estimulado a síntese dessas proteínas. Um estudo realizado nesse rio no ano anterior mostrou contaminação da água e do sedimento por cromo após o curtume e também maior acúmulo de cromo e aumento na concentração de PSMT no fígado de peixes *P. lineatus* expostos nesse local (LUNARDELLI et al., 2014). Nas brânquias, ocorreu aumento da concentração de PSMT nos peixes das duas espécies mantidos no ponto D, que podem estar atuando como agente quelante de metais ou como antioxidantes, evitando as possíveis lesões oxidativas causadas pelas espécies reativas de oxigênio (SUZUKI et al., 2002; FALFUSHYNSKA e STOLYAR, 2009). Essa resposta das PSMT nas brânquias dos peixes expostos apenas no ponto D pode ter ocorrido devido à presença de produtos da transformação/degradação das substâncias presentes no efluente do curtume ao longo do trajeto do rio, que podem ser mais tóxicos que aquelas liberadas inicialmente, isso vai depender, principalmente, das propriedades do ambiente (químicas e físicas) e das características dos contaminantes (LYMAN, 1995; MOZETO e ZAGATTO, 2006). Ou também devido à entrada de contaminantes nessa localidade, pois durante o período em que os peixes ficaram expostos.

Um aumento na produção de ERO, formadas direta ou indiretamente pela entrada de um contaminante, pode ter como resultado o estresse oxidativo e eventuais danos biológicos, como peroxidação lipídica, danos em proteínas, inativação de enzimas e quebras no DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

Foram verificados vários danos oxidativos nos peixes expostos no rio Bandeirantes do Norte. A peroxidação lipídica no fígado apresentou-se maior nas duas espécies mantidas nos pontos após o curtume, em *P. lineatus* nos pontos B, C e D e em *S. notomelas* nos pontos C e D, comparados com os animais mantidos no ponto A. Também foi encontrado aumento de danos no DNA nas células sanguíneas, que podem ser causados pelas ERO ou por contaminantes genotóxicos, apenas em *P. lineatus* expostos no ponto B e C, sendo que os peixes mantidos no ponto B apresentaram a maior média de escore de danos em relação à todos os grupos analisados. Esses resultados indicam que após o local de descarga de efluentes pelo curtume, a água do rio Bandeirantes do Norte aumenta a ocorrência de danos celulares nos peixes, dessa forma também podem causar danos nos organismos que residem nesse ecossistema impactado.

Outro biomarcador bioquímico que apresentou alterações em sua atividade foi a enzima acetilcolinesterase, cuja principal função é quebrar a acetilcolina (ACh), durante a transmissão do impulso nervoso, em colina e ácido acético, evitando assim a ação contínua da acetilcolina durante o impulso nervoso, mantendo o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (VAN DER OOST et al., 2003). A maioria dos trabalhos está relacionada com a inibição da atividade da AChE, e existem muitos anti-colinesterásicos já testado, dentre os quais se destaca os inseticidas com enfoque principalmente para os carbamatos e organofosforados (FERRARI et al., 2007). Porém, outros estudos comprovam que peixes submetidos a concentrações sub-letais de outros agrotóxicos podem apresentar alterações na atividade da acetilcolinesterase (FERRARI et al., 2007; MODESTO e MARTINEZ, 2010a). Em *P. lineatus* alterações na atividade da acetilcolinesterase causada por agrotóxicos já foram evidenciadas por Pereira Maduenho e Martinez (2008) e Modesto e Martinez (2010a e 2010b), expondo os peixes a Diflubenzuron®, Roundup® e Roundup Transorb®, respectivamente. E estudos já indicam a alteração da atividade desta enzima com outros contaminantes, como por exemplo os metais (FRASCO et al., 2005; ALVES COSTA et al., 2007). Entretanto, quando se trata de mistura de poluentes torna-se complicada a afirmação e discussão dos resultados encontrados para as alterações na atividade enzimática da AChE.

Em *P. lineatus* ocorreu aumento da atividade enzimática no cérebro dos peixes expostos nos pontos pós-curtume e no músculo nos peixes mantidos nos pontos B e C. Em *S. notomelas* aumento na atividade da AChE no cérebro dos

peixes expostos no ponto C e no músculo dos animais dos pontos B, C e D. Essa estimulação pode ter ocorrido devido à contaminantes existentes no efluente do curtume, como por exemplo o metal cromo, já que o aumento na atividade dessa enzima ocorreu nos animais mantidos pós-curtume. Porém, estudos publicados sobre os efeitos de metais sobre a atividade da AChE apresentaram alguns resultados contraditórios, alguns estudos apresentam inibição enzimática e outros estimulação para um mesmo metal (FRASCO et al., 2005). Desta forma, para afirmação de que a estimulação da AChE ocorreu devido efeito do cromo, estudos *in vivo* com esse metal isolado e essas espécies deveriam ser realizados.

Através da aplicação do índice integrado de respostas de biomarcadores, baseado nas respostas dos biomarcadores das duas espécies, foi possível classificar os pontos de acordo com o nível de contaminação de cada local. Para *P. lineatus* os valores de IBR seguiram a seguinte ordem: ponto B > ponto C > ponto D > ponto A. Com isso, fica evidente que para essa espécie as maiores alterações nos seus biomarcadores ocorreram nos pontos pós-curtume, sendo o ponto próximo ao curtume o mais comprometido, seguindo um gradiente de contaminação gerado pelo efluente liberado pelo curtume. O baixo valor de IBR no ponto A para *P. lineatus*, pois não apresenta influência da indústria de curtimento de couros, apesar de já possuir contaminação prévia ao longo de seu trajeto. Esses valores de IBR indicam que *P. lineatus* apresentou sensibilidade aos contaminantes presentes no efluente eliminado pelo curtume. Os valores de IBR para a espécie *S. notomelas* foram diferentes dos encontrados em *P. lineatus*, não apresentando o gradiente de contaminação gerado pelo curtume que ocorreu com a outra espécie, sendo o ponto C o que apresentou maior contaminação, seguido do ponto B > ponto A > ponto D. Porém, mesmo não apresentando o gradiente de contaminação, os pontos que apresentaram maior contaminação para *S. notomelas* também foram os localizados após o curtume. Esses valores indicam que essa espécie não mostrou-se sensível apenas à contaminação gerada pelo curtume, mas desde a exposição ao ponto A, pois apresentou uma diferença de IBR pequena entre o ponto A e B. Com os resultados de IBR para as duas espécies, fica evidente que os locais com maior contaminação estão localizados próximo ao curtume (ponto B e C), devido ao acréscimo de contaminantes gerados e eliminados no efluente dessa indústria.

Em resumo, os resultados deste trabalho indicam que a qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte está comprometida desde sua nascente até a região de

Rolândia, onde foram realizados os estudos, e que o efluente líquido do curtume contribui para o aumento da contaminação do rio, podendo comprometer a biota aquática desse ecossistema. A utilização de duas espécies para o monitoramento ambiental mostrou-se interessante, pois alterações diferentes nos biomarcadores foram encontradas, *P. lineatus* apresentou principalmente alterações nos biomarcadores nas brânquias, em proteínas semelhantes às metalotioneínas no fígado, alteração na acetilcolinesterase e danos celulares. Já a espécie *S. notomelas* apresentou biotransformação no fígado, alteração nos antioxidantes, na acetilcolinesterase e apenas dano de peroxidação lipídica. A aplicação do índice IBR independente da espécie estudada e da ordem dos pontos em relação à contaminação, apresentou-se eficiente apontando os pontos com maior contaminação, próximos ao curtume. Desta forma, a utilização de biomarcadores de *P. lineatus* e *S. notomelas* em testes *in situ* mostrou-se eficaz para a avaliação da qualidade da água, podendo ser empregada em futuros estudos de contaminação de ecossistemas aquáticos.

## 5.5 AGRADECIMENTOS

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), pelo fornecimento dos peixes utilizados no trabalho. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq e CAPES), pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida à B. Lunardelli. E ao CNPq pela bolsa produtividade concedida à C.B.R. Martinez. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de B. Lunardelli pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

## 5.6 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12714: Água – ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema Estático**. Rio de Janeiro, p.15, 1993.

ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.

ARZATE-CARDENAS, M.A.; MARTINEZ-JERONIMO, F. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. **Aquatic Toxicology**, v.105, p.528-534, 2011.

AZEVEDO, F.A.; DE LIMA, I.V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.21, p.1316-1322, 2002.

BEUTLER, E., DUROM, O., KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.61, p.882-890, 1963.

BRADFORD, M.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, p.248-254, 1976.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTED, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: AMSTRONG, D. (Ed.). **Free radical and antioxidants protocols**. New Jersey: Humana Press, pp.377-387, 1998.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, A. An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 667-681, 2004.

CASTRO R.M.C.; VARI, R.P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n.622, 2004.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v.157, p.3025-3033, 2009.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1989. **Relatórios Ambientais**, ISSN 0103-4103, p.164, 1990.

DAMIENS, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; LOQUES, F.; ROMEO, M.; SALBERT, V. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. **Chemosphere**, v.66, p.574-583, 2007.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES J.R.V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

FALFUSHYNSKA, H.I.; STOLYAR, O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.729-736, 2009.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 308–313, 2007.

FERREIRA, C.M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental. **Biológico**, v.65, p.17-18, 2003.

FRASCO, M.F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, v.10, p.360-375, 2005.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.347-354, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Claredon Press, Oxford, p. 146-148, 2005.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K. B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York: John Wiley& Sons, Inc., p.319-368, 2004.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de bioensaios para a avaliação da toxicidade de agentes químicos**. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1990.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.680-693, 2008.

JORDÃO, C.P.; ALESSANDRO, C.S.; JOSÉ, L.P.; BRUNE, W. Contaminação por Crômio de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, v.22, p.47-52, 1999.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T.A., Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, v. 3, p. 103-115, 1995.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LUNARDELLI, B; CABRAL. M.T.; MARTINEZ, C. B. R. Manuscrito I - Testes *in situ* integrando diferentes biomarcadores do teleósteo *Prochilodus lineatus* para avaliação a qualidade de um rio contaminado por efluente de curtume. In: **Análise de biomarcadores em duas espécies de peixes neotropicais submetidos a testes *in situ* em um rio que recebe efluente de curtume**. Dissertação (em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

LYMAN, W.J. Transport and transformation processes. In: RAND, G. M. (ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; 2 nd, Taylor & Francis: Washington, p. 449-492, 1995.

MALABARBA, L. R. Subfamily Cheirodontinae. In: REIS, R. E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 215-221, 2003.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MARTINEZ, M. **Aplicação de parâmetros morfométricos de drenagem na bacia do rio Pirapó: o perfil longitudinal**. Dissertação (mestrado em Geografia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

MARTINEZ, C.B.R; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal Biology**, v. 64, p. 797-807, 2004.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal Biology**, v.62, p.187-190, 2002.

MELETTI, P.C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. Tese (Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MODESTO, K.A., MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, p. 781-787, 2010.

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

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Ed. Rima, São Carlos, p.295-320, 2006.

NEWMAN, M.C.; CLEMENTS, W.H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**. New York: CRC Press, 2008.

PEREIRA MADUENHO, L.; MARTINEZ, C. B. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.148, p.265-272, 2008.

RAMSDORF, W.A.; GUIMARÃES, F.S.F.; FERRARO, M.V.M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; CESTARI, M.M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v.673, p.78-81, 2009.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science Pollution Research**, v.20, p.2721-2725, 2013.

SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; FONSECA, V.F.; FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R.P.; BEBIANNO, M.J.; CABRAL, H.N. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. **Ecological Indicators**, v.19, p.215-225, 2011.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.112-120, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SUZUKI, K.T.; SOMEYA A.; KOMADA Y.; OGRA Y. Roles of metallothionein in copper hemostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.88, p.173-182, 2002.

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

VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., FABBRI, F. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. **Marine Environmental Research**. v.44, p.69-84, 1997.

ZORITA, I., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., APRAIZ, I., CANCIO, I., ORBEA, A., SOTO, M., MARIGÓMEZ, I., CAJARAVILLE, M.P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**, v.153, p.157-168, 2008.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho possibilitaram a avaliação da qualidade da água do rio Bandeirantes do Norte na região de Rolândia (PR) através do biomonitoramento realizado com duas espécies de peixes nativas *Prochilodus lineatus* e *Serrapinnus notomelas*. Alterações encontradas nos biomarcadores desses peixes indicam contaminação frente a poluentes presentes na água e no sedimento desse rio. Apesar do rio Bandeirantes do Norte apresentar contaminação de sua água proveniente de diversos meios poluentes (doméstico, industrial e agrícola), a presença de uma indústria de curtimento de couros próximo ao corpo d'água mostrou-se potencializadora da contaminação desse ecossistema. Mesmo com a implementação de medidas redutoras de poluição, como a estação de tratamento de efluentes, o efluente líquido eliminado no rio mostrou-se capaz de alterar diversos parâmetros bioquímicos e genéticos nos peixes.

As alterações nos biomarcadores dos peixes indicam que o acréscimo do efluente gerado pelo curtume no rio causa ativação do processo de biotransformação, aumento na concentração do antioxidante não enzimático glutathione, aumento na concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas, danos celulares, como peroxidação lipídica e quebras no DNA, e alteração na atividade da acetilcolinesterase. Também induziu ao acúmulo de cromo no fígado de *P. lineatus* e maiores concentrações deste metal na água e no sedimento.

Como este trabalho foi realizado em dois períodos distintos, pode-se encontrar algumas diferenças nas respostas dos biomarcadores para uma mesma espécie, devido à dinâmica de poluição presente nesse rio. Fatores como aumentos na precipitação pluvial, época de aplicação de agrotóxicos, períodos com maior eliminação dos efluentes do curtume, composição e concentração dos poluentes deste efluente, variações metabólicas em função da temperatura, entre outros fatores, devem ser levados em consideração para essas diferenças encontradas.

A utilização de duas espécies no monitoramento da qualidade da água mostrou-se vantajosa, da mesma forma que a aplicação de mais de um biomarcador faz-se necessária nesses programas de monitoramento. Isso porque respostas diferentes foram encontradas nas duas espécies, indicando sensibilidade e alterações nos biomarcadores característica de cada uma.

Como as respostas dos biomarcadores das duas espécies foram diferentes, os valores de IBR para as duas espécies também foram distintos, porém apresentaram os locais com maior contaminação, sendo estes os pontos mais próximos ao curtume. A diferença no IBR das duas espécies ocorreu na classificação da contaminação no ponto anterior ao curtume e no último ponto analisado, onde *S. notomelas* teve valor de IBR próximo aos dos pontos pós-curtume, enquanto *P. lineatus* apresentou maiores valores de IBR apenas nos pontos pós-curtume. Mesmo com essa diferença existente nos IBRs para as duas espécies, a aplicação deste índice mostrou-se satisfatória, pois apresentam de forma clara os locais mais afetados com maior contaminação, no caso gerado pelo efluente liberado pelo curtume.

Poucos são os trabalhos que fazem uso de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em peixes expostos em rios que recebem efluentes de curtume. Desta forma, esse trabalho vem contribuir para futuros estudos de monitoramento de ambientes impactados com contaminação semelhantes à estudada, e que a partir disso possam ser empregadas metodologias de mitigação ou redução de impacto, evitando maiores danos à saúde da biota residente nesses locais.