



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---



m e s t r a d o  
ciências biológicas  
zoologia e botânica

LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DO CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO:  
AVALIAÇÃO POR MEIO DE BIOMARCADORES EM  
BIVALVES**

---

Londrina

2012

**LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA**

**TOXICIDADE DO CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO:  
AVALIAÇÃO POR MEIO DE BIOMARCADORES EM  
BIVALVES**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina

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

Londrina  
2012

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

O48t Oliveira, Luciana Fernandes de

Toxicidade do chorume de aterro doméstico : avaliação por meio de biomarcadores em bivalves / Luciana Fernandes de Oliveira. – Londrina, 2012.  
108 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, 2012..  
Inclui bibliografia.

1. Bivalve – Teses. 2. Resíduos sólidos - Toxicidade – Teses. 3. Ecossistemas aquáticos – Teses. I. Martinez, Cláudia dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas. III. Título.

CDU 54:577.4



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Divisão de Admissão e Registro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Discente: **Luciana Fernandes de Oliveira**

Título: "Toxicidade de chorume de aterro doméstico: avaliação por meio de biomarcadores em Bivalves".

Data da Defesa: 28 de março de 2012 - 14:00 hs, na sala de aula do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas, desta Universidade.

Banca Examinadora

Parecer

Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Aprovada

Dr. José Maria Monserrat

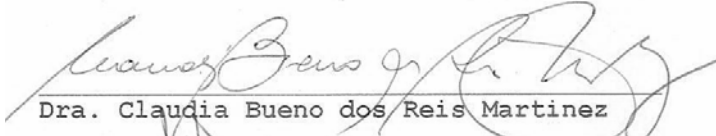
Aprovado

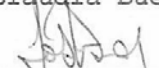
Dr. Oscar Akio Shibatta

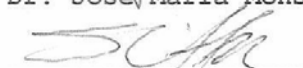
Aprovado

Parecer Final

Aprovada

  
Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

  
Dr. José Maria Monserrat

  
Dr. Oscar Akio Shibatta

*Se tivesse nascido em outro tempo e com mais oportunidades sinto que ela teria sido uma grande bióloga. Dedico este trabalho a minha avó Lilo, que agora olha por nós.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a minha querida orientadora Cláudia, por toda confiança depositada em mim e no meu trabalho. Esse tempo que estou no laboratório me fez crescer muito profissional e pessoalmente, graças a seus exemplos e apoio.

Agradeço a todos os amigos do LEFA, pelo companheirismo, risadas e apoio. Gostaria de citar a Bruna, Claudinha, Dalita e Déia que a cada dia que passa percebo o quanto são especiais pra mim...

À Carol e Angélica pelo apoio sempre presente nos experimentos e parceria no desenvolvimento dos trabalhos no laboratório.

Ao professor Paulo César Meletti pelas dicas e apoio.

À professora Marta, que mesmo distante sempre terá um papel importante na minha formação.

À professora Ilce por disponibilizar integralmente seu laboratório e ao Marcelo pelo total apoio nas análises de expressão gênica.

Ao Wagner pela ajuda nas análises de metal.

À professora Sandra Márcia Cesário Pereira da Silva pela atenção e pelo fornecimento de chorume.

Ao Prof. Dr. José Maria Monserrat e Prof. Dr. Oscar Shibatta pela disponibilidade de participação na minha banca.

À secretaria e professores do curso de Mestrado em Ciência Biológicas da UEL.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Toxicologia aquática (INCT-TA) pelo apoio financeiro e fornecimento de tecido referência para análise de metais.

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPq pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional. Aos meus pais e minha irmã que são as pessoas que mais amo neste mundo. Aos meus avós e padrinhos, que sempre estão interessados e me incentivando.

Às minhas sempre amigas: Bel, Carla, Carol, Kátia e Keli por entrarem em minha vida e não quererem sair dela.

Ao André, que me ajudou muito todo esse tempo.

E a todos os meus amigos e colegas que de alguma forma contribuíram pra minha formação pessoal e profissional...

**MUITO OBRIGADA!**

*"Nunca perca a fé na humanidade, pois ela é como um oceano. Só porque existem algumas gotas de água suja nele, não quer dizer que ele esteja sujo por completo."*

Mahatma Gandhi

*"Ambiente limpo não é o que mais se limpa e sim o que menos se suja."*

Chico Xavier

*"O que faço é apenas uma gota no meio do oceano, mas sem ela o oceano seria menor."*

Madre Teresa de Calcutá

*"Universalize todas as coisas do mundo e então entenderá que sua energia interfere em todo o resto."*

OLIVEIRA, Luciana Fernandes. **Toxicidade do chorume de aterro doméstico: avaliação por meio de biomarcadores em bivalves**. 2012. 108 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

Estudos ecotoxicológicos podem ser empregados na avaliação da qualidade de ecossistemas, por meio do uso de biomarcadores, que são alterações em parâmetros em nível subindividual que indicam que um organismo foi exposto a contaminantes. Os bivalves são organismos frequentemente utilizados em estudos ecotoxicológicos e a espécie *Corbicula fluminea* (Corbiculidae) está entre aquelas que mais aparecem nos estudos realizados em ambientes dulcícolas. O chorume produzido em lixões e aterros de resíduos domésticos é uma mistura complexa e variável que contém diversos tipos de compostos tóxicos, tais como metais e compostos orgânicos xenobióticos, os quais podem causar alterações em biomarcadores de animais aquáticos. No presente trabalho, fez-se o uso de biomarcadores para avaliar a toxicidade do chorume em bivalves *C. fluminea* em dois tipos distintos de testes de toxicidade. Foram realizados testes de toxicidade *in situ* em três pontos (P1, P2 e Periq3) de um córrego contaminado por chorume de aterro doméstico e, também, testes de toxicidade em laboratório com diferentes diluições (10X, 18X, 32X e 50X) do chorume bruto retirado do mesmo aterro controlado. Os biomarcadores avaliados foram de biotransformação de xenobióticos (EROD: 7-etoxiresorufina-O-deetilase; GST: glutathione S transferase; MXR: mecanismo de resistência a multixenobióticos), estresse oxidativo (ERO: geração de espécies reativas de oxigênio; CAO: capacidade antioxidante total; LPO: lipoperoxidação), danos no DNA (ensaio do cometa), conteúdo de metalotioneínas (MT) e expressão relativa dos genes piGST e MT. Além disso, nos testes de toxicidade *in situ* foi avaliado o acúmulo dos metais Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb nas brânquias e glândulas digestivas dos bivalves. Nos testes realizados em laboratório também foram analisadas a expressão gênica dos genes da GST e MT, nos bivalves expostos por 5 dias a diluição de 50X. Os resultados mais relevantes mostram que o chorume, independente do tipo de teste de toxicidade empregado, provoca a redução da atividade da EROD em brânquias e indução na glândula digestiva, o aumento da atividade da GST, a redução do MXR, ocorrência de LPO e aumento do conteúdo de MT. O ensaio do cometa realizado mostrou que danos no DNA de hemócitos de bivalves *C. fluminea* ocorrem a partir de 15 dias de exposição ao chorume. O metal Cr teve maior acúmulo nos tecidos dos bivalves confinados nos três pontos do córrego contaminado por chorume, podendo este ser um potencial contaminante do chorume com ação tóxica sobre os bivalves. Conclui-se que mesmo nos experimentos em campo ou em laboratório o chorume foi tóxico para os bivalves, que apresentaram alterações mesmo no ponto mais distante da fonte de chorume e na maior diluição testada. Isto mostra que o tratamento ou diluições do chorume precisam ser maiores ou mais eficientes para evitar danos mais severos e permanentes a biota aquática.

**Palavras-chave:** Bioacumulação. Biotransformação. *Corbicula Fluminea*. Estresse oxidativo. Metalotioneína

OLIVEIRA, Luciana Fernandes. **Toxicity of domestic landfills leachate: assessment through bivalves biomarkers**. 2012. 108 f. Master Dissertation (Post-Graduate Program in Biological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

Ecotoxicity studies can be used to assess the quality of ecosystems, through biomarkers, which are biological changes at suborganic levels that indicate that an organism was exposed to contaminants. Bivalves are organisms commonly used in ecotoxicological studies and the specie *Corbicula fluminea* (Corbiculidae) is one that most appear in studies of freshwater environments. The domestic landfills leachate is a complex and variable mixture that contains various types of toxic compounds such as metals and organic xenobiotics, which can cause changes in biomarkers in aquatic animals. In this study, biomarkers were used to assess the toxicity of leachate in the bivalve *C. fluminea* in two distinct types of toxicity tests. *In situ* toxicity tests were carried out at three points (P1, P2 and Periq3) from a stream contaminated with landfill leachate and, also, toxicity tests at laboratory, using different dilutions (10X, 18X, 32X and 50X) of the leachate from the same landfill. The biomarkers used were related to biotransformation of xenobiotics (EROD: etoxiresorufina-7-O-deetilase; GST, glutathione S transferase; MXR mechanism of resistance to multixenobioticos), oxidative stress (ROS: generation of reactive oxygen species; CAO: antioxidant capacity total; LPO: lipid peroxidation), DNA damage (comet assay), metallothionein content (MT) and relative expression of piGST and MT genes. Moreover, in animals from *in situ* toxicity tests it was evaluated the accumulation of metals Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni and Pb in the gills and digestive glands. In tests conducted at the laboratory it was also analyzed gene expression of GST and MT in bivalves exposed for 5 days at a dilution of 50X. The most relevant results show that landfill leachate, regardless of the toxicity test used, promoted a decrease of EROD activity in gills and induction in digestive gland, an increase in GST activity, a reduction in MXR and an increase in the occurrence of LPO and MT content. The comet assay performed showed that DNA damage in haemocytes of bivalve *C. fluminea* occur after 15 days of exposure to leachate. The metal Cr was greater accumulated in the tissues of bivalves confined at the three points of the stream contaminated by leachate, which may be a potential contaminant that caused toxicity in the bivalves. Was concluded that both in experiments in field or laboratory leachate was toxic to bivalves, which showed biomarker changes even in the most distant point from the source of leachate and the with the highest dilution tested. Thus, the treatment or dilution of the leachate must be larger or more efficient to avoid more severe and permanent damage to aquatic biota.

**Key-words:** Bioaccumulation. Biotransformation. *Corbicula fluminea*. Metallothionein. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** –Representação esquemática dos níveis de organização biológicos nos quais se observa alterações devido à exposição a poluentes. Baseado em Van der Oost et al. (2003) .....14
- Figura 2** –Biotransformação de xenobióticos (X) dividida em três fases (I, II e III). Baseada no modelo especulativo de resistência a xenobióticos de Bard (2000) .....21
- Figura 3** –Imagem de satélite do aterro controlado do município de Londrina, PR (Google Earth 2006). A – Foto do aterro ainda em funcionamento. B – Chorume bruto parcialmente canalizado do aterro controlado e lançado em lagoa de tratamento aeróbico. C – Lançamento do efluente de chorume após tratamento no córrego dos Periquitos .....27
- Figura 4** –Localização dos pontos estudados na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. A – Bacia do ribeirão Cambé, onde se localizam o ponto de coleta (Coleta) e o córrego dos Periquitos, e Bacia do ribeirão Cafezal, onde se localiza o ponto Caf. B – Detalhe do córrego dos Periquitos, indicando o aterro controlado do município de Londrina, PR, e os pontos nos quais foram realizados os testes (Periq1, Periq2 e Periq3)33
- Figura 5** – Sacos utilizados para manutenção de *C. fluminea* nos testes *in situ* .....35
- Figura 6** - Mortalidade (%  $\pm$  EP), ao longo do tempo, dos bivalves *C. fluminea* submetidos a testes *in situ* no ribeirão Cafezal (Caf) e em três pontos de um córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....42
- Figura 7** –Atividade da 7-Etoxiresorufina O-deetilase (pmol Resorufina min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3) .....48
- Figura 8** –Atividade da Glutathione S transferase (nmol CDNB conjugado min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3) .....49

<b>Figura 9</b> - Mecanismo de resistência a multixenobióticos (Rodamina mg tecido úmido <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	50
<b>Figura 10</b> - Espécies reativas de oxigênio (Área) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	51
<b>Figura 11</b> - Capacidade antioxidante total [(Média ± EP) Área relativa] em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	52
<b>Figura 12</b> - TBARS (nmol TBARS mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	53
<b>Figura 13</b> - Danos no DNA de hemócitos (Escore de danos) de <i>C. fluminea</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	54
<b>Figura 14</b> - Conteúdo de metalotioneínas (nmol de GSH mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias de <i>C. ilumines</i> do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).....	55
<b>Figura 15</b> - Atividade da 7-Etoxiresorufina O-deetilase (pmol Resorufina min <sup>-1</sup> mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes.....	85

<b>Figura 16</b> - Atividade da Glutathione S transferase (nmol CDNB conjugado min <sup>-1</sup> mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes .....	85
<b>Figura 17</b> - Mecanismo de resistência a multioxenobióticos (uM Rodamina mg tecido úmido <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes .....	86
<b>Figura 18</b> - TBARS (nmol TBARS mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes .....	87
<b>Figura 19</b> - Danos no DNA de hemócitos (Escore de danos) de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes.....	87
<b>Figura 20</b> - Conteúdo de metalotioneínas (nmol GSH mg de proteína <sup>-1</sup> ) em brânquias de <i>C. fluminea</i> expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes .....	88
<b>Figura 21</b> - Expressão relativa (Razão) dos genes da glutathione S transferase (GST) e metalotioneína (MT) em brânquias de <i>C. fluminea</i> expostos por período de 5 dias ao controle e a diluição de 50X. A e B são referentes a duas reações (réplicas) realizadas com o mesmo material.....	89
<b>Figura 22</b> - Curvas de fusão dos produtos de amplificação referentes aos genes MT e GST e ao gene de referência da (3-Actina de <i>C. fluminea</i> empregados neste estudo. A ocorrência de um único pico de fusão para cada gene indica amplificação específica e ausência de dímeros de oligonucleotídeos.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros físicos, químicos e biológicos de qualidade de água analisados no chorume bruto, montante e jusante do efluente lançado no córrego dos Periquitos, pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de abril à julho/2010. n.a.: não analisado; n.d.: não detectado. (SILVA, 2007) .....	28
<b>Tabela 2</b> - Concentração de metais analisados no chorume bruto pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de abril à julho/2010. n.d.: não detectado. (SILVA, 2007) .....	28
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros físicos e químicos da água dos locais avaliados (Média $\pm$ EP, n = 3).....	43
<b>Tabela 4</b> - Concentração de metais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) fracamente ligados ao sedimento dos locais avaliados (Média $\pm$ EP, n = 3-4).....	43
<b>Tabela 5</b> - Acúmulo de metais em brânquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido seco) de <i>C. fluminea</i> do ponto Coleta e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias no ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego <b>contaminado por</b> chorume (Periq1, Periq2 e Periq3) (Média $\pm$ EP, n = 3-7) .....	45
<b>Tabela 6</b> - Acúmulo de metais em glândulas digestivas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido seco) de <i>C. fluminea</i> do ponto Coleta e submetidos a testes <i>in situ</i> por 1, 5, 15 e 30 dias no ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3) Média $\pm$ EP, n = 3-7) .....	46
<b>Tabela 7</b> - Comparação entre as concentrações nas brânquias e glândulas digestivas dos metais avaliados no presente trabalho e as concentrações destes metais no tecido de <i>C. fluminea</i> em condições controle de outros trabalhos.....	58
<b>Tabela 8</b> - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (forward e reverse) desenhados para amplificação dos genes de B-actina (ACT), pi-Glutationa S transferase (piGST) e metalotioneína (MT) e o tamanho dos produtos amplificados.....	82

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
1.1 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA .....	14
1.2 BIVALVES NA ECOTOXICOLOGIA .....	17
1.3 BIOACUMULAÇÃO EM BIVALVES .....	18
1.4 BIOMARCADORES .....	18
1.4.1 Biotransformação de Xenobióticos .....	19
1.4.2 Extresse Oxidativo .....	22
1.4.3 Danos Genéticos .....	23
1.4.4 Conteúdo de Metalotioneína .....	24
1.4.5 Expressão Gênica .....	24
1.5 CHORUME .....	25
1.5.1 Aterro Controlado do Município de Londrina .....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 CAPÍTULO 1 - BIOMARCADORES EM BIVALVES SUBMETIDOS A TESTES <i>IN SITU</i> EM UM CÓRREGO CONTAMINADO POR CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO</b> .....	30
3.1 INTRODUÇÃO .....	31
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.2.1 Local de Estudo .....	33
3.2.2 Desenho Experimental .....	34
3.2.3 Monitoramento de Parâmetros Físicos e Químicos .....	35
3.2.4 Determinação de Metais no Sedimento .....	35
3.2.5 Amostragem .....	36
3.2.6 Acúmulo de Metais nos Tecidos .....	36
3.2.7 Biomarcadores .....	37
3.2.7.1 <i>7 Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)</i> .....	37
3.2.7.2 <i>Glutathione S transferase (GST)</i> .....	37
3.2.7.3 <i>Ensaio de acúmulo de rodamina (MXR)</i> .....	38
3.2.7.4 <i>Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Capacidade antioxidante total (CAO)</i> .....	38
3.2.7.5 <i>Lipoperoxidação (LPO)</i> .....	39
3.2.7.6 <i>Ensaio do cometa</i> .....	39
3.2.7.7 <i>Metalotioneína (MT)</i> .....	40
3.2.7.8 <i>Proteínas totais</i> .....	40
3.2.8 Análises Estatísticas .....	41
3.3 RESULTADOS .....	41

3.3.1	Parâmetros Físicos e Químicos da Água.....	42
3.3.2	Concentração de Metais no Sedimento .....	43
3.3.3	Acúmulo de Metais nos Tecidos .....	44
3.3.4	Biomarcadores.....	47
3.3.4.1	<i>7</i> Etoxiresorufina <i>O</i> -deetilase ( <i>EROD</i> ).....	47
3.3.4.2	<i>Glutathione S transferase (GST)</i> .....	48
3.3.4.3	<i>Ensaio de acúmulo de Rodamina (MXR)</i> .....	49
3.3.4.4	<i>Espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (CAO)</i> .....	50
3.3.4.5	<i>Lipoperoxidação (LPO)</i> .....	52
3.3.4.6	<i>Ensaio do cometa</i> .....	53
3.3.4.7	<i>Metalotioneína (MT)</i> .....	54
3.4	DISCUSSÃO .....	55
3.5	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66

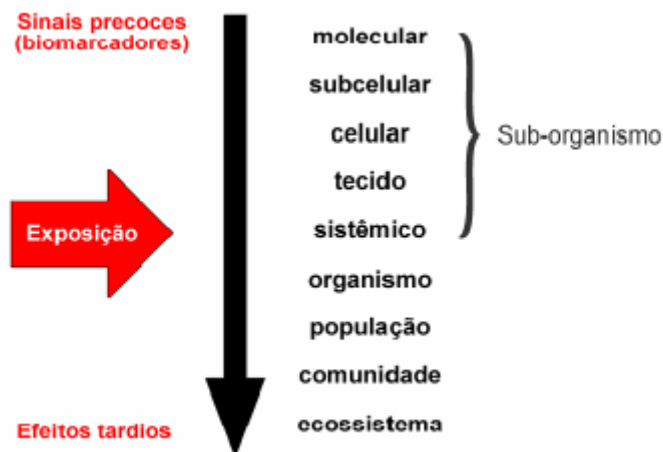
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO EM BIVALVES POR MEIO DO USO DE BIOMARCADORES</b> .....	<b>73</b>
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	75
4.2.1	Desenho Experimental.....	75
4.2.2	Amostragem .....	76
4.2.3	Biomarcadores.....	76
4.2.3.1	<i>7</i> -Etoxiresorufina- <i>O</i> - deetilase ( <i>EROD</i> ) .....	76
4.2.3.2	<i>Glutathione S transferase (GST)</i> .....	77
4.2.3.3	<i>Ensaio de acúmulo de Rodamina</i> .....	77
4.2.3.4	<i>Lipoperoxidação (LPO)</i> .....	77
4.2.3.5	<i>Ensaio do cometa</i> .....	78
4.2.3.6	<i>Metalotioneína (MT)</i> .....	79
4.2.3.7	<i>Proteínas totais</i> .....	79
4.2.3.8	<i>Expressão gênica de Glutathione S transferase (piGST) e metalotioneína (MT)</i> .....	79
4.2.4	Análise Estatística .....	83
4.3	RESULTADOS .....	83
4.4	DISCUSSÃO.....	89
4.5	CONCLUSÃO .....	93
	REFERÊNCIAS.....	94
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos dos contaminantes nos constituintes da biosfera (Newman e Clements 2008). Estes podem ser estudados em níveis diferentes de organização biológica como mostrado na Fig.1. Sendo assim, esta ciência envolve muitas áreas de pesquisa, nas quais o enfoque pode estar na medida de alterações na expressão gênica de determinada proteína até alterações na composição e estrutura da comunidade de um ecossistema. Os efeitos adversos que os contaminantes causam nos organismos podem ser letais ou subletais. Os efeitos letais podem ser estudados através da quantificação da mortalidade e/ou sobrevivência de uma espécie exposta a um ou uma mistura de contaminantes, por curtos ou longos períodos de tempo. Efeitos subletais podem surgir como alterações de comportamento, crescimento, reprodução, estrutura tecidual, atividade de desintoxicação e outros. Em exposições crônicas, os efeitos observados em nível individual podem evoluir para efeitos nas populações ou comunidades, podendo ser observadas alterações na abundância, diversidade e condição fisiológica do grupo de organismos (Rand et al. 1995).

**Figura 1** – Representação esquemática dos níveis de organização biológicos nos quais se observa alterações devido à exposição a poluentes. Baseado em Van der Oost et al. (2003).



A Ecotoxicologia tem contribuído para o levantamento de dados essenciais e de conhecimentos básicos que servem de suporte para a formulação de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais relacionadas a riscos ecotoxicológico da entrada de contaminantes no ambiente aquático (Fericola et al. 2003). Em estudos ecotoxicológicos, o uso de parâmetros biológicos em níveis de menor organização como ferramentas, permite um diagnóstico precoce da qualidade ou presença de contaminantes no meio aquático, já que alterações nestes parâmetros podem ser observadas em curtos espaços de tempo (Martín-Díaz et al. 2004). A observação dessas alterações antes que danos mais graves ocorram em nível de população e ecossistema são importantes, pois permitem a criação de estratégias e ações corretivas.

As atividades humanas, através da indústria, agricultura, mineração, produção de resíduos, dentre outras, promovem a entrada de substâncias químicas, de diversas naturezas, no ambiente. Os ecossistemas aquáticos são o receptor final destes compostos, seja por lançamento direto de efluentes, infiltração no solo e contaminação de águas subterrâneas e/ou superficiais, escoamento superficial e precipitação e carreamento de poluentes atmosféricos. Quando um composto químico entra no ambiente aquático podem ocorrer alguns processos como transporte, transformação (por ação biológica ou fotoquímica), deposição ou sedimentação, adsorção ou interação com outros compostos químicos. Com isso, a porção potencialmente biodisponível depende das características físicas e químicas do ambiente e do contaminante, bem como das características biológicas e ecológicas dos organismos, que determinam a maior ou menor interação destes com os diferentes compartimentos do ambiente. Devido a esta complexidade, um estudo ecotoxicológico deve abranger a quantidade dos contaminantes que entra no ambiente, as características deste ambiente, o quanto os contaminantes estão biodisponíveis e interagem com a biota e quais os efeitos que eles provocam nestes organismos, populações e/ou comunidades (Fericola et al. 2003).

Os estudos ecotoxicológicos permitem avaliar a concentração e tempo necessários para que um composto químico ou mistura causem um efeito no organismo. Estes podem ser realizados com três diferentes abordagens, cada uma com suas vantagens e limitações: experimentos controlados em laboratório, simulações de ecossistemas e estudos no ecossistema natural. Experimentos em laboratório são aqueles que estabelecem melhor as relações de causa e efeito de

um contaminante sobre uma espécie e fornece informações quanto às concentrações e duração de exposição que provocam alterações. São relativamente fáceis de serem conduzidos e reproduzidos. A principal limitação destes estudos é que eles não representam de fato o que acontece no ambiente natural, muitas vezes superestimando os efeitos adversos, pois não consideram a habilidade adaptativa de populações naturais, as interações entre espécies, as mudanças que ocorrem no ambiente e a biodisponibilidade dos contaminantes pode ser maior, devido ao uso de águas que não contém matéria orgânica como no ambiente natural (Rand et al. 1995).

Em laboratório, ainda é possível a realização da simulação de pequenos ecossistemas (microcosmos), onde se identificam efeitos de contaminantes numa amplitude maior do que apenas em uma espécie, promovendo informações sobre consequências ecológicas. Apesar disso, ainda não representam fielmente as condições de um ambiente natural. Os experimentos realizados em campo são os mais realistas. Entretanto, também apresentam limitações. Devido à falta de estabilidade das variáveis ambientais estes experimentos são difíceis de serem repetidos e as relações de causa e efeito são difíceis de serem estabelecidas, pois muitas variáveis não são controladas ou definidas (Rand et al. 1995). Os testes *in situ* têm sido utilizados com frequência desde a década de 1990 em países da Europa e nos Estados Unidos (Stien et al. 1998). Tais testes constituem-se basicamente da manutenção dos organismos em recipientes-teste no ambiente a ser testado, com livre circulação de água e acesso ao alimento. Por determinado período de tempo acompanha-se a sobrevivência dos animais, acúmulo de contaminantes em seus tecidos e/ou realizam-se análises de parâmetros biológicos dos animais expostos ao teste. Testes *in situ* apresentam vantagens em relação aos testes laboratoriais ou técnicas de coleta dos animais no campo, já que permitem uma total cobertura dos contaminantes presentes na água e sedimento de uma área específica que se deseja estudar, abrangendo todas as variações físicas e químicas que possam vir a ocorrer no local durante o experimento. Coletas dos animais no campo não permitem padronização de idade e sexo, por exemplo, dos organismos a serem estudados bem como o tempo de exposição dos animais, e os testes laboratoriais não representam fielmente a realidade a qual os animais estão expostos no campo e amplificam a magnitude dos efeitos (Viarengo et al. 2007).

## 1.2 BIVALVES NA ECOTOXICOLOGIA

Organismos que sobrevivem em ambientes contaminados são chamados biomonitores, pois podem ser utilizados como sensores ou monitores da qualidade do ambiente em que vivem. Nestes é possível observar alterações em nível individual, como em aspectos comportamentais, bioacumulação, danos em tecidos, aumento ou diminuição da atividade de determinadas enzimas, que podem ser utilizados como ferramentas de monitoramento ambiental (Rand et al. 1995).

Os bivalves geralmente apresentam uma série de características que favorecem seu uso como biomonitores, tais como: a ampla distribuição geográfica; ocorrência em altas densidades; são fáceis de coletar e identificar, e se mantem saudáveis durante amostragens e experimentos em campo e laboratório; apresentam tamanho suficiente para realização de análises em tecidos separadamente; tem tempo de vida relativamente longo; são bentônicos ou sésseis; são animais filtradores; tem elevada capacidade de acumular contaminantes sem chegar à morte; e apresentam respostas a contaminantes presentes no meio (Boening 1999).

O uso de bivalves no monitoramento de ecossistemas aquáticos adquiriu importância a partir da década de 1970, quando teve início o programa "The Mussel Watch", cuja proposta era avaliar a concentração de poluentes acumulados no tecido destes animais (Goldberg 1975). A bioacumulação ainda hoje é o parâmetro mais relacionado a estudos ecotoxicológicos com bivalves, seguido por parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e análise do conteúdo de metalotioneínas.

Gêneros de bivalves que são frequentemente utilizados em estudos ecotoxicológicos são *Mytilus*, *Crassostrea* e *Perna*, que são animais marinhos, e *Dreissena* e *Corbicula*, que são bivalves de água doce. *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é uma espécie originada da Ásia, que atualmente também é encontrada nos continentes americano, europeu e africano. Na América do sul foi introduzido primeiramente na Bacia do Prata no início da década de 1970, e posteriormente se alastrou por todo o continente. Esta é considerada uma espécie invasora, devido, principalmente, a sua alta taxa reprodutiva e adaptação a diversos tipos de ambiente (Rodrigues et al. 2007).

### 1.3 BIOACUMULAÇÃO EM BIVALVES

A bioacumulação é um termo genérico que define o processo de assimilação e retenção de compostos exógenos nos organismos independentemente da sua rota de entrada ou fontes no ambiente aquático. Ela é o resultado da captação, transformação, translocação e eliminação destes compostos e a quantidade de compostos bioacumulados depende de características físicas e químicas do ambiente e do composto e da capacidade do organismo de biotransformá-lo e eliminá-lo (Newman e Clements 2008). Devido à capacidade de bioacumular grandes quantidades de xenobióticos os bivalves são utilizados como organismos sentinela em programas de monitoramento ao redor do mundo (Goldberg 1975).

A exposição a misturas pode interferir na bioacumulação de xenobióticos nos tecidos de bivalves. Por exemplo, bivalves da espécie *Ruditapes philippinarum* expostos a Cd e benzo(a)pireno, separados e em mistura, apresentaram maior acúmulo de ambos os contaminantes em brânquias e glândulas digestivas quando expostos a mistura (Wang et al. 2011). No caso do mexilhão *Perna viridis* a exposição à mistura de Ag e Cu promoveu o mesmo efeito que em *R. philippinarum*, porém quando estes animais foram expostos à mistura de Ag e Cd não foi observado o efeito sinérgico no acúmulo total. Entretanto, quando consideradas as frações sub-celulares, a distribuição da Ag é influenciada pela presença de Cd (Ng e Wang 2007).

### 1.4 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são alterações biológicas que os organismos expressam diante de um poluente (Sarkar et al. 2006). São definidos como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (Depledge et al. 1995). Eles constituem importantes ferramentas para monitorar o equilíbrio do ecossistema aquático e têm sido empregados em diversos programas de monitoramento em vários países (Cravo et al. 2012, Faria et al. 2010, Sáenz et al. 2010, Wang et al. 2012).

Uma das características mais importantes dos biomarcadores moleculares e celulares é que eles têm o potencial de antecipar mudanças em níveis de organização biológica superiores, como populações, comunidades ou ecossistemas. Este aviso antecipado oferecido pelos biomarcadores pode ser usado de uma maneira preventiva, permitindo que estratégias de remediação possam ser desenvolvidas antes que ocorram danos ambientais e ecológicos irreversíveis (Cajaraville et al. 2000). Desta forma, devem ser selecionados biomarcadores capazes de indicar se o organismo foi exposto a poluentes (biomarcadores de exposição) e/ou se a magnitude da resposta ao poluente afeta o bem estar do organismo (biomarcadores de efeito) (Cajaraville et al. 2000; Monserrat et al. 2007).

Os biomarcadores frequentemente utilizados em estudos ecotoxicológicos são aqueles relacionados aos processos de biotransformação de xenobióticos, relacionados ao estresse oxidativo, danos genéticos e conteúdo de metalotioneína, os quais serão tratados, com mais detalhes, a seguir.

#### 1.4.1 Biotransformação de Xenobióticos

O processo de biotransformação consiste na alteração da estrutura de um composto químico como resultado da atividade de uma enzima e tem papel importante na transformação de compostos endógenos como esteroides, ácidos biliares e ácidos graxos e na transformação de xenobióticos (Di Giulio et al. 1995). Muitos xenobióticos importantes são lipofílicos e entram nas células com facilidade através da membrana celular. A biotransformação converte estes compostos em metabólitos mais solúveis, que serão excretados com mais facilidade pelo organismo, porém nem sempre ocorre a diminuição da toxicidade, podendo o produto ser mais tóxico que o composto original (Van der Oost et al. 2003).

A biotransformação é comumente dividida em duas fases. A Fase I, na qual um grupo polar é adicionado à molécula, geralmente por reações de oxidação, redução ou hidrólise e a Fase II, na qual os compostos são alterados por meio da conjugação de substratos endógenos (Hodgson et al. 2008). Dependendo das características do composto químico a ser biotransformado, este pode passar pelas duas ou apenas em uma das fases.

As enzimas oxidativas primárias envolvidas na Fase I de biotransformação pertencem às famílias do citocromo P450, que são proteínas que

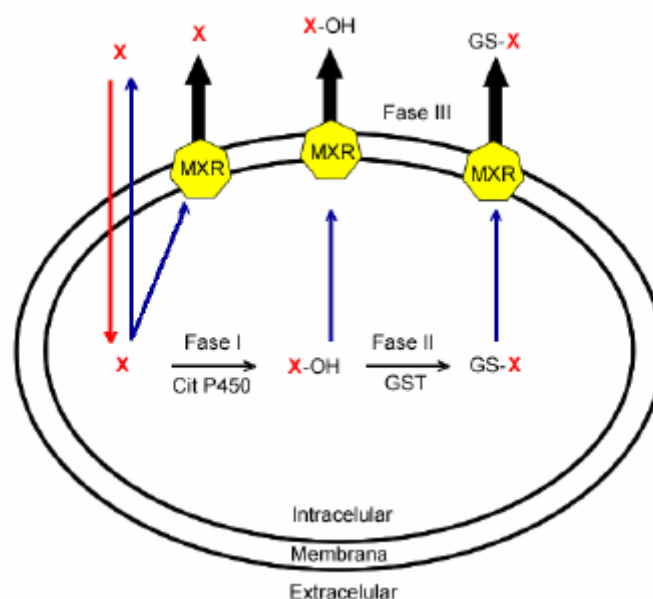
contém um grupo heme envolvidas no transporte de elétrons. Localizam-se no retículo endoplasmático e ocorrem em todas as espécies de animais e plantas já estudados. Essas enzimas catalisam reações principalmente de hidroxilação, mas também de epoxidação, dealquilação, deaminação, sulfoxidação e desulfuração. Algumas formas de P450 catalisam várias reações, enquanto outras são mais específicas. Exemplos de xenobióticos que são biotransformados nesta fase são os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e muitos pesticidas (Di Giulio et al 1995). Em estudos ecotoxicológicos, a família de citocromo P450 mais estudada é a CYP1A, e existem evidências da existência de CYP1A-*like* em bivalves (Wootton et al. 1996). Um biomarcador que indica a atividade da CYP1A é a enzima 7-Etoxiresorufina O-deetilase (EROD), que vem sendo bastante utilizada em estudos com bivalves (Binelli et al. 2005, Martín-Díaz et al. 2009, Monari et al. 2009).

A biotransformação de Fase II consiste na conjugação de compostos tóxicos, diretamente ou subsequentes a Fase I, com pequenas moléculas endógenas presentes nas células (Hodgson et al. 2008). Diferente da Fase I, as enzimas envolvidas encontram-se geralmente no citosol. As Glutathione S transferases (GSTs) são uma família de isoenzimas envolvidas na conjugação de glutathione reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, como epóxidos, haloalcanos, nitroalcanos, alcanos, derivados de metil sulfóxido, organofosfatos, halo e nitrocompostos aromáticos. A atividade da enzima GST é extensamente utilizada como biomarcador em estudos com moluscos bivalves (Franco et al. 2006, Rocher et al. 2006, Richardson et al. 2008). Além de exercer o papel de conjugação, as GSTs apresentam outras funções importantes na desintoxicação. Estas enzimas parecem estar envolvidas no carreamento de compostos lipofílicos endógenos ou xenobióticos até os locais de ocorrência da biotransformação de Fase I, são capazes de se ligar covalentemente a metabólitos ativos, como os epóxidos gerados na Fase I, prevenindo que estes se liguem a outras moléculas e tem papel na conjugação de produtos gerados na lipoperoxidação (Di Giulio et al 1995). Existem diferentes isoformas identificadas de GST, e entre aquelas citosólicas estão as classes Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta e Omega. A pi-GST tem papel na inativação de produtos da lipoperoxidação e inativação de espécies reativas de oxigênio (Doyen et al. 2005).

Geralmente, a biotransformação é descrita por duas fases, porém alguns autores tratam de uma terceira (Newman e Clements 2008). Como as Fases I

e II transformam compostos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos, a difusão destes para fora das células através da bicamada lipídica se reduz. Com isso, proteínas de transporte ativo facilitam o efluxo destes compostos, o que caracteriza a Fase III de biotransformação (Fig.2). O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) é considerado a primeira linha de defesa de organismos aquáticos contra xenobióticos, pois contribui com a redução do acúmulo destes nas células. Este mecanismo depende da atividade de glicoproteínas-P (Pg-p), que são dependentes de ATP, e transportam para fora da célula uma variedade de substratos, de estrutura e funções diversas. Os compostos que interagem com este mecanismo são, geralmente, moderadamente hidrofóbicos, planares ou produtos naturais (Bard 2000). O MXR já foi descrito em diversos organismos, como esponjas, bivalves e peixes e em bivalves já foram observadas alterações neste mecanismo devido à exposição à xenobióticos. A inibição do MXR é frequentemente observada em organismos expostos a uma classe de contaminantes denominada de *chemosensitizers*, dentre os quais estão incluídos pesticidas, produtos de higiene pessoal, produtos da degradação microbiana (Smital et al. 2004), Pb (Rocha e Souza 2012) e algumas fragrâncias (Luckenback et al. 2004; Smital et al. 2004). O aumento do MXR também já foi evidenciado em bivalves expostos a metais (Achard et al 2004) e óleo Diesel (Smital e Kurelec 1998, Smital et al. 2003).

**Figura 2** –Biotransformação de xenobióticos (X) dividida em três fases (I, II e III). Baseada no modelo especulativo de resistência a xenobióticos de Bard (2000).



### 1.4.2 Extresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são substâncias químicas que contém oxigênio e que são extremamente reativas, podendo se ligar a DNA, lipídios e proteínas causando danos deletérios (MacKenzie 2008). O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é essencial para a vida de organismos aeróbios, principalmente por ser o receptor final na cadeia respiratória da mitocôndria. A redução de oxigênio à água, consequência deste processo de respiração celular, requer quatro elétrons, e as reações ocorrem sequencialmente. Os produtos intermediários destas reações são as ERO, ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $\cdot OH$ ).

Uma vez que ocorre a entrada de um xenobióticos na célula pode ocorrer o aumento da geração de ERO. Compostos orgânicos e metais podem estimular a produção de ERO através de diferentes mecanismos, tais como o ciclo redox, reações redox de metais de transição (Co, Cr, Ni, Va) com  $O_2$  e outras ERO, indução de enzimas de biotransformação, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons por contaminantes lipofílicos ou íons metálicos e pelo comprometimento das defesas antioxidante (Livingstone 2003). As defesas antioxidantes quando ativadas podem reduzir o acúmulo e toxicidade das ERO. Estas se dão por ação conjunta de enzimas, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, e moléculas de menor peso molecular como a glutathione reduzida (Hermes-Lima 2004). Estes parâmetros vêm sendo bastante utilizados como biomarcadores em bivalves (Faria et al. 2010; Vidal-Linán et al. 2010; Wang et al. 2012), porém podem apresentar alterações variáveis a agentes estressores, sendo que frequentemente ocorre o aumento de algum parâmetro e diminuição de outro. A avaliação da capacidade antioxidante total permite uma visão mais geral sobre a condição do organismo ou do tecido e sua susceptibilidade ao estresse oxidativo (Regoli 2000). Através da reação de ERO com o 2'7'-diclorofluorescina diacetato ( $H_2DCF$ ) em presença ou ausência de 2-2'-azobis-(2 metilpropionamidina)-dihidroclorido (ABAP) é possível estabelecer a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (Amado et al. 2009).

O estresse oxidativo se estabelece quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade de defesa antioxidante da célula (Livingstone 2003). Em consequência do acúmulo de ERO, danos oxidativos

começam a ocorrer. O  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  gerados podem reagir com metais de transição, como o  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$ , e formar o radical peroxil ( $\cdot OH$ ), através das reações de Fenton e Haber-Weiss. Por sua vez o  $\cdot OH$  é a principal ERO que reage com ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ácidos nucleicos e proteínas, causando danos. Quando uma espécie oxidante retira um átomo de hidrogênio de um grupo metileno de um PUFA inicia-se uma cadeia de reações chamada de lipoperoxidação. Forma-se um radical lipídico que em sequência reage com oxigênio molecular, formando um radical peroxil. Estes, por sua vez, alimentam a cadeia de reações da lipoperoxidação agindo como oxidantes de PUFAs ainda não oxidados (Hermes-Limas 2004). Os danos causados pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de lipoperoxidação tecidual (Wilhelm Filho 1996). Como consequências deste dano podem-se observar a redução na fluidez de membranas biológicas, inativação de receptores e enzimas de membrana e o aumento da permeabilidade da mesma (Manduzio et al. 2005). Um dos produtos finais da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA), que pode ser mensurado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido (Hermes-Lima 2004). Diversos estudos já evidenciaram o aumento do nível de lipoperoxidação em vários tecidos de bivalves expostos a uma variedade de contaminantes (Almeida et al. 2005, Franco et al. 2006).

#### 1.4.3 Danos Genéticos

Um dos efeitos observados em organismos aquáticos expostos a contaminação é o dano genético. Os xenobióticos presentes no meio aquático podem ser classificados como genotóxicos, quando produzem alterações na molécula de DNA de animais expostos a concentrações subletais (Shugart 1995). Estas alterações podem ser causadas diretamente pelo xenobiótico, por seu produto ativado na biotransformação ou ainda pelas ERO geradas em decorrência de sua presença. Danos oxidativos no DNA são reconhecidos como a principal causa de morte celular e mutações em organismos aeróbicos e são induzidos principalmente pelos radicais hidroxil que resultam da Reação de Fenton (Bjelland e Seeberg 2003).

Os danos no DNA podem afetar as ligações das fitas da molécula, fazendo com que aconteçam quebras na mesma. A detecção de quebras no material genético pode ser uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de

poluentes em animais aquáticos, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis a esse tipo de dano (Ohe et al. 2004, Cavalcante et al. 2008). O ensaio do cometa é um método que vem sendo bastante utilizado para avaliação de quebras na fita da molécula de DNA, que são passíveis de reparo. Este se baseia na detecção de fragmentos de DNA que migram mais rapidamente durante a eletroforese do que o DNA intacto, formando uma cauda (Tice et al. 2000). Na versão do método chamada de alcalina, é possível a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítios alcalilábeis e *crosslinks* (Silva et al. 2003).

#### 1.4.4 Conteúdo de Metalotioneína

A metalotioneína é uma proteína de baixo peso molecular, rica em cisteínas, que devido à presença de grupos tiol (-SH) tem a propriedade de se ligar a vários metais e, por isso, é utilizada como biomarcador, estando o seu aumento no meio celular geralmente relacionado ao aumento ou a presença de metais. As metalotioneínas exercem função importante no controle homeostático de metais essenciais, como o cobre e o zinco, mantendo o estoque destes metais na célula. Além disso, metais não essenciais, como o cádmio, chumbo e mercúrio, apresentam afinidades com os grupos tíois destas proteínas e, portanto, quando estão presentes nas células, podem se ligar a estes sítios. Com isso, as metalotioneínas também exercem funções de proteção contra a toxicidade destes metais (Amiard et al. 2006).

Além disso, as metalotioneínas também agem como antioxidantes. Bivalves da espécie *Mytilus galloprovincialis* quando pré-expostos ao Cd não apresentaram aumento de ERO e lipoperoxidação quando expostos a Fe, devido ao aumento de metalotioneínas provocada pela presença do Cd (Viarengo et al. 1999). Segundo esses autores a indução da metalotioneína ocorre pela presença de metais, mas também por outros compostos químicos e estressores, principalmente agentes oxidantes.

#### 1.4.5 Expressão Gênica

A entrada de um xenobiótico ou aumento de compostos endógenos no meio intracelular, pode desencadear a ativação da transcrição de determinados genes, e aumentar a expressão gênica dos mesmos. A método mais dinâmico para

avaliação do aumento da expressão por meio da quantificação de mRNA é o RT-qPCR, sendo este considerado o melhor custo-benefício para este tipo de análise e é adaptável ao uso de pequena amostragem não-letal (Veldhoen et al. 2012).

A maioria dos genes que tem sido estudados para uso como biomarcador estão relacionados aqueles genes cujo mRNA codifica proteínas ou enzimas bem estabelecidas como biomarcadores bioquímicos, pois assume-se que alterações nos parâmetros bioquímicos são devido a mudanças paralelas na expressão de seus genes correspondentes (Pina et al. 2007). Porém, nem sempre isso ocorre, o que justifica a necessidade de validação de biomarcadores relacionados à expressão. O aumento da expressão do gene da metalotioneína (MT) no peixe de água doce *Barbus graellsii* é um exemplo no qual não ocorre correlação com o conteúdo da proteína na célula (Quirós et al. 2007).

## 1.5 CHORUME

Na maioria dos municípios brasileiros ainda ocorre o depósito do lixo em lixões ou aterros que são potencialmente causadores de contaminação ambiental. O chorume é o líquido produzido na decomposição do lixo e pode ter uma composição muito variável (Sisinno e Moreira 1996). Os resíduos sólidos de um município consistem principalmente numa mistura de plásticos, metais e alguns materiais orgânicos e, por isso, várias substâncias orgânicas e inorgânicas são encontradas na composição do chorume (Oygard et al. 2004). Christensen et al. (2001) indicaram cinco grupos de poluentes que podem ocorrer na pluma de chorume: matéria orgânica dissolvida, macrocomponentes orgânicos (cálcio, magnésio, potássio, amônia e ferro), metais traço (cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco), compostos orgânicos xenobióticos (hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, compostos alifáticos clorados) e outros componentes em baixas concentrações como boro, arsênio, bário, selênio, mercúrio e cobalto.

Devido à variedade de compostos presentes no chorume este consiste em uma mistura complexa. Avaliar a toxicidade e os riscos associados à contaminação por misturas em ecossistemas ou aos seres humanos ainda é um dos maiores desafios de cientistas, avaliadores de risco e tomadores de decisão (Spurgeon et al. 2010). Os compostos presentes em uma mistura podem sofrer interações associadas a diferentes processos. As interações podem ocorrer no meio

externo, de forma que a presença de um composto pode aumentar ou diminuir a disponibilidade de outro no meio, no processo de toxicocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ou ainda no processo de toxicodinâmica (interações relacionadas aos sítios receptores). As diferentes interações dos compostos presentes em uma mistura promovem nos organismos expostos a efeitos diferenciados, que podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Spurgeon et al. 2010).

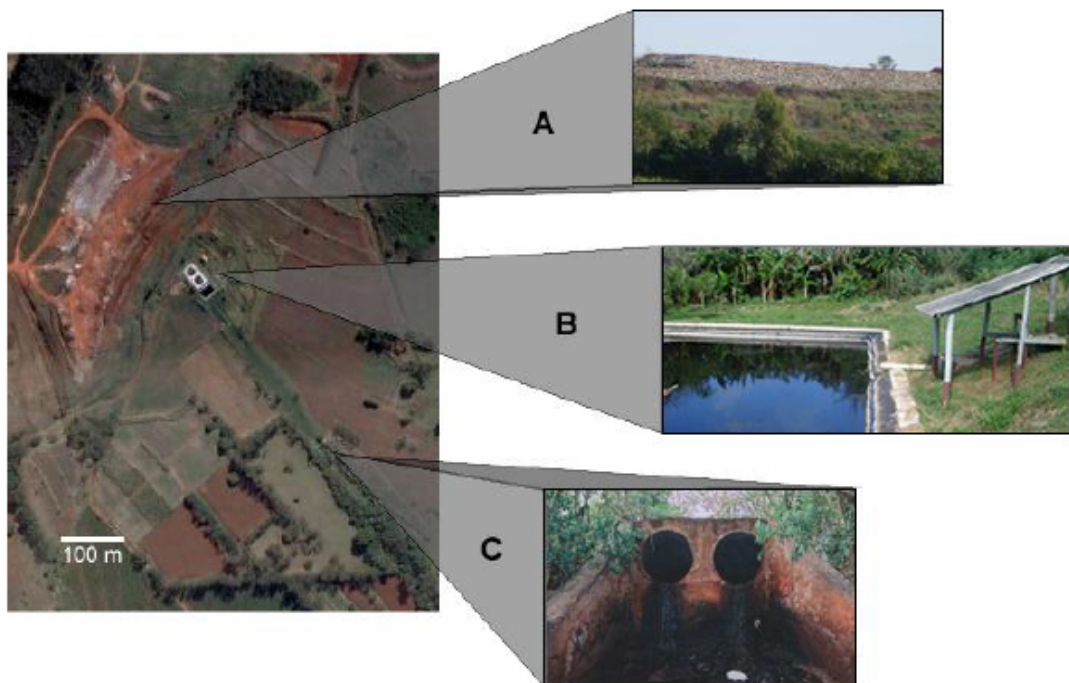
O estudo da ecotoxicidade do chorume foi empregado poucas vezes e o uso de biomarcadores para avaliação da toxicidade desta mistura em organismos aquáticos é raro. O estudo de Bernanrd et al. (1996) exemplifica o uso da ecotoxicologia clássica para avaliação da toxicidade do chorume por meio de parâmetros como a mortalidade, inibição de crescimento e inibição da luminescência empregados em microalgas, microcrustáceos, bactérias e outros por meio de testes agudos de toxicidade. Como dito anteriormente, o uso de biomarcadores para avaliação da toxidade do chorume é raro e em bivalves não foram encontrados trabalhos com este contexto na literatura consultada. Em peixes, na espécie *Carassius auratus*, a toxicidade do chorume foi verificada por meio do ensaio do cometa e teste do micronúcleo e o chorume bruto causou maior genotoxicidade e mutagenicidade nos tecidos avaliados em relação ao chorume tratado (Deguthi et al. 2007). Parâmetros de estresse oxidativo também já foram avaliados no gastrópode *Bellamyia purificata* após exposição ao chorume, e foi observado aumento da atividade da enzima Glutathione S transferase e redução da concentração de glutathione total de forma dose-dependente (Li et al. 2008).

### 1.5.1 Aterro Controlado do Município de Londrina

O aterro controlado do município de Londrina (Fig.3), desativado desde 2010 devido ao esgotamento da capacidade, ocupa uma área de 19 ha e recebia aproximadamente 350 toneladas/dia de resíduos domésticos de diferentes naturezas (Souza 2008). O local começou a receber resíduos desde a década de 1970 ainda com estrutura de lixão, ou seja, sem nenhum preparo do terreno para recebimento de resíduos, tais como impermeabilização, compactação, cobertura dos resíduos com terra ou captação e tratamento do chorume. Na década de 90, este mesmo local foi readaptado e recebeu o nome de aterro controlado. Com a

readequação parte do chorume bruto passou a ser canalizada para um tanque de tratamento aeróbico (Fig.3B), cujo efluente é direcionado para o córrego dos Periquitos (Fig.3C). Não há impermeabilização total do terreno e por isso a canalização não garante a retirada de todo chorume produzido, sendo que uma porção deste infiltra no solo e contamina as águas subterrâneas (Mendes et al. 2006).

**Figura 3** – Imagem de satélite do aterro controlado do município de Londrina, PR (Google Earth 2006). A – Foto do aterro ainda em funcionamento. B – Chorume bruto parcialmente canalizado do aterro controlado e lançado em lagoa de tratamento aeróbico. C – Lançamento do efluente de chorume após tratamento no córrego dos Periquitos.



O Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL) realizou análise do chorume produzido por este aterro nos meses de abril a julho/2010, mesmo período no qual o presente estudo foi realizado. Além da análise do chorume bruto, foram realizadas também análises da água da montante e jusante do lançamento do efluente do aterro no córrego dos Periquitos, que estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão apresentados os dados de metais quantificados no chorume bruto para os mesmos locais (SILVA, 2007).

**Tabela 1** - Parâmetros físicos, químicos e biológicos de qualidade de água analisados no chorume bruto, montante e jusante do efluente lançado no córrego dos Periquitos, pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de abril à julho/2010. n.a.: não analisado; n.d.: não detectado. (SILVA, 2007)

Parâmetros	Chorume bruto	Montante	Jusante
pH	8,3	6,8	7,9
Temperatura (°C)	n.d.	23,4	23,2
Condutividade (uS.cm <sup>-1</sup> )	8865	713	1405
DBO (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	593	<2	33
DQO (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	3025	35	56
N-NH <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	956,5	1	28
NKT (mg.L <sup>-1</sup> )	1052	3,2	36,5
P-PO <sub>4</sub> total (mg.L <sup>-1</sup> )	2	n.a.	0,6
Cloretos (mg.L <sup>-1</sup> )	1751,5	114	162
Coliformes termotolerantes (NMP 100 mL)	21876	7676	7792
E. coli (NMP 100 mL)	2331	850	1257
Sólidos em Suspensão (mg.L <sup>-1</sup> )	21,5	2	6
Sólidos Sedimentáveis (mL.1000mL <sup>-1</sup> )	<0,1	n.a.	n.a.

**Tabela 2** - Concentração de metais analisados no chorume bruto pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de abril à julho/2010. n.d.: não detectado. (SILVA, 2007)

Metais (mg.L <sup>-1</sup> )	Chorume bruto
Alumínio	0,435
Cádmio	n.d.
Chumbo	n.d.
Cobre	0,081
Cromo	0,060
Ferro	8,74
Manganês	1,68
Mercúrio	n.d.
Níquel	0,017
Prata	0,401

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade de chorume de aterro doméstico em bivalves *Corbicula fluminea* submetidos a testes de toxicidade *in situ* e em laboratório, por meio da análise de biomarcadores.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de toxicidade *in situ* com exemplares de *C. fluminea* expostos a três pontos de um ribeirão contaminado por chorume e testes de toxicidade em laboratório com bivalves expostos a diferentes diluições de chorume;
- Caracterizar parâmetros físicos e químicos da água dos três pontos do córrego contaminado por chorume, bem como a presença de alguns metais no sedimento e acumulados nos tecidos dos bivalves confirmados nestes.
- Verificar a ocorrência de alterações nos parâmetros de biotransformação de xenobióticos em brânquias e glândula digestiva de *C. fluminea* expostos aos testes de toxicidade *in situ* e em laboratório.
- Quantificar espécies reativas de oxigênio gerados em brânquias e glândula digestiva em decorrência a exposição ao chorume *in situ*, bem como a capacidade antioxidante total contra radicais peróxil destes tecidos.
- Verificar a ocorrência de lipoperoxidação em brânquias e glândula digestiva e quebras no DNA de hemócitos como biomarcadores de efeito a exposição ao chorume.
- Determinar o conteúdo de metalotioneínas em brânquias de *C. fluminea* expostos ao chorume e examinar este parâmetro com um biomarcador para metais.
- Definir quais os melhores biomarcadores para o biomonitoramento de áreas contaminadas por chorume.

### 3 CAPITULO 1 - BIOMARCADORES EM BIVALVES SUBMETIDOS A TESTES *IN SITU* EM UM CÓRREGO CONTAMINADO POR CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO<sup>1</sup>

Luciana F. Oliveira; Caroline Santos; Cláudia B. R. Martinez<sup>2\*</sup>

#### Resumo

O chorume de aterro doméstico é uma mistura complexa que contém compostos potencialmente tóxicos para os organismos aquáticos. Empregando-se de testes *in situ* em um córrego contaminado por chorume foram verificados efeitos desta mistura em bivalves *Corbicula fluminea*. Os animais foram expostos em três pontos deste córrego: P1 o mais próximo da fonte de chorume, P2 o intermediário e Periq3 o mais distante. Os testes ocorreram por períodos de 1, 5, 15 e 30 dias para análise dos seguintes biomarcadores: atividade da 7-Etoxiresorufina O-deetilase (EROD) e Glutathione S transferase (GST), mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), capacidade antioxidante total (CAO), geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e lipoperoxidação (LPO) em brânquias e glândulas digestivas, conteúdo de metalotioneínas (MT) em brânquias e danos no DNA nos hemócitos. Nas brânquias e glândulas digestivas foi avaliado também o acúmulo de Cu, Cr, Cd, Pb, Al, Mn e Ni. Os resultados foram comparados com aqueles de animais recém-coletados de um lago urbano, local denominado como ponto Coleta e com um ponto no ribeirão Cafezal (Caf), no qual foram submetidos a testes *in situ* em local presumivelmente limpo. A mortalidade dos bivalves expostos ao córrego contaminado foi maior no P1, seguido pelo P2 e Periq3. O chorume causou o comprometimento de defesas destes organismos, fato evidenciado pela redução da EROD em brânquias e em ambos os tecidos a redução do MXR e da CAO. Em consequência disso foi observado aumento de danos no DNA, aumento de ERO e ocorrência de LPO, que indicam o possível estabelecimento de estresse oxidativo. Foram observadas também algumas respostas de *C. fluminea* expostos a este córrego, como o aumento da EROD em glândula digestiva, aumento da GST em ambos os tecidos e conteúdo de MT nas brânquias. A condição na qual os bivalves foram submetidos promoveu efeitos letais e subletais, indicando a presença de contaminantes no córrego em concentrações capazes de provocar tais efeitos e em longo prazo comprometerem populações residentes no mesmo.

**Palavras-chave:** Bioacumulação. Biotransformação. *Corbicula fluminea*. Ensaio do cometa. Estresse oxidativo. Metalotioneína.

<sup>1</sup> Manuscrito a ser submetido para o periódico Ecotoxicology

<sup>2</sup> Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina - Londrina/PR  
Autor para correspondência: Tel.: +55-43-33714650 Fax: +55-43-33714207 E-mail: [cbueno@uel.br](mailto:cbueno@uel.br)

### 3.1 INTRODUÇÃO

As atividades humanas produzem diversos tipos de resíduos que de forma direta ou indireta têm os corpos d'água como receptor final. Os aterros ou lixões ainda são um grave problema ambiental, principalmente relacionado à produção de chorume (Kulikowska e Klimiuk 2008), que é o líquido produzido na decomposição do lixo e pode ter uma composição muito variável (Sisinno e Moreira 1996). Os resíduos sólidos de um município consistem principalmente numa mistura de plásticos, metais e alguns materiais orgânicos e, por isso, várias substâncias orgânicas e inorgânicas são encontradas na composição do chorume (Oygaard et al. 2004). Segundo Christensen et al. (2001) cinco grupos de compostos podem ocorrer na pluma de chorume: matéria orgânica dissolvida, macrocomponentes orgânicos (cálcio, magnésio, potássio, amônia e ferro), metais traço (cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco) compostos orgânicos xenobióticos (hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, compostos alifáticos clorados) e outros componentes em baixas concentrações como boro, arsênio, bário, selênio, mercúrio e cobalto.

Assim, o chorume consiste em uma mistura de compostos que uma vez liberados no ambiente são potencialmente tóxicos aos organismos aquáticos e podem diminuir a qualidade de vida dessa biota (Arias et al. 2007). Para avaliar a toxicidade do chorume organismos aquáticos já foram utilizados parâmetros como a mortalidade, inibição de crescimento e inibição da luminescência empregados em microalgas, microcrustáceos, bactérias e outros por meio de testes agudos de toxicidade (Bernard et al. 1996), porém o uso de biomarcadores para avaliação da toxicidade desta mistura foi empregado poucas vezes. Biomarcadores genéticos no peixe *Carassius auratus*, como o ensaio do cometa e teste do micronúcleo, foram utilizados por Deguthi et al. (2007) e a exposição ao chorume bruto causou maior genotoxicidade e mutagenicidade nos tecidos avaliados em relação ao chorume tratado. Parâmetros de estresse oxidativo também já foram avaliados no gastrópode *Bellamya purificata* após exposição ao chorume, e foi observado aumento da atividade da enzima Glutathione S transferase e redução da concentração de glutathione total de forma dose-dependente (Li et al. 2008).

Na literatura consultada, não foram encontrados estudos sobre a toxicidade do chorume em bivalves, que são organismos considerados bons bioindicadores de contaminação por metais e compostos orgânicos (O'Connor

2002). Os bivalves apresentam alterações decorrentes da exposição à contaminação de compostos presentes no chorume como os metais (Freitas et al. 2012; Marie et al. 2006; Zhang et al. 2010) e hidrocarbonetos (Large et al. 2002). Uma espécie de bivalve que tem sido foco de diversos estudos ecotoxicológicos é a espécie *Corbicula fluminea* (Muller, 1774), considerada indicadora de contaminação aquática, dada à sua alta sensibilidade aos mais diversos contaminantes e à grande quantidade de água que filtra do meio (Goldberg et al. 1975). Biomarcadores já bem estabelecidos podem ser utilizados nestes organismos para avaliação dos efeitos do chorume, como aqueles relacionados à biotransformação, estresse oxidativo, danos em lipídios ou no DNA e as metalotioneínas.

Entre os parâmetros de biotransformação de xenobióticos que podem ser avaliados estão a enzima 7-Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) utilizada como medida indireta da atividade catalítica da família CYP1A do citocromo P450, envolvidos na Fase I (Whyte et al. 2000), a atividade da enzima de fase II, Glutathione S transferase (GST) (Hodgson et al. 2008) e o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), responsável pela eliminação de xenobióticos na fase III de biotransformação (Bard 2000). Quanto aos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, pode-se avaliar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) presentes ou ainda a capacidade antioxidantes dos tecidos contra radicais de oxigênio. Os danos causados pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de lipoperoxidação tecidual (Wilhelm Filho 1996). Outro efeito que pode ser observado é o dano genético que podem ser quantificados por meio do ensaio do cometa (Tice et al. 2000). Por último, a metalotioneína (MT) é um biomarcador frequentemente utilizado e geralmente relacionado ao aumento ou presença de metais (Amiard et al. 2006), porém também apresenta papel de antioxidante (Viarengo et al. 1999).

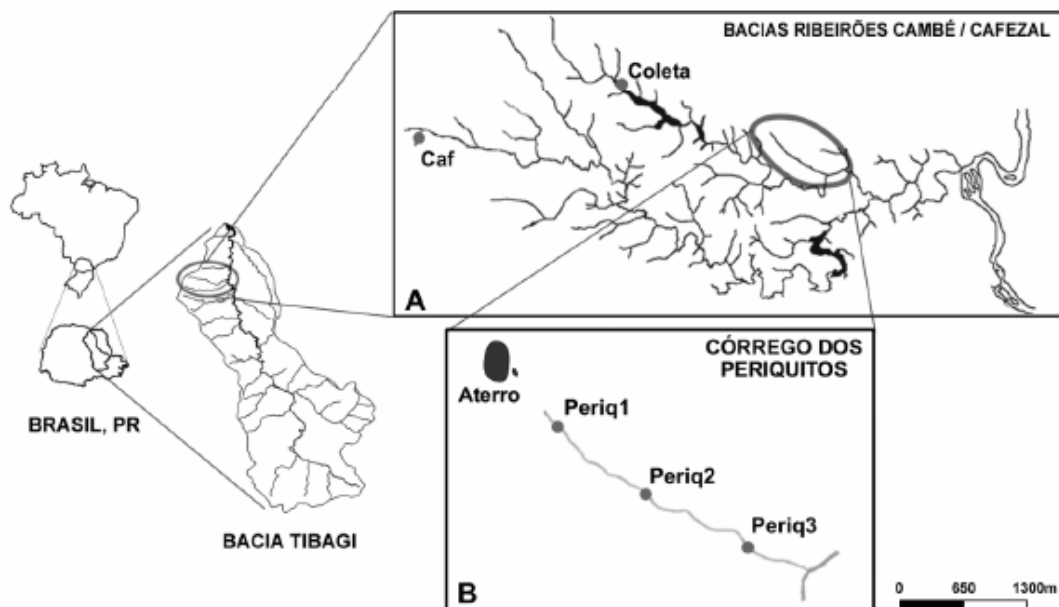
Com isso, o presente trabalho teve por objetivo diagnosticar a qualidade de um córrego contaminado por chorume de um aterro doméstico, por meio da avaliação de bioacumulação de metais e de biomarcadores em bivalves *C. fluminea* submetidos a testes *in situ*.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Local de Estudo

O córrego dos Periquitos, que se localiza a jusante do antigo aterro do município de Londrina, PR, Brasil, é contaminado pelo chorume produzido neste aterro. A contaminação se dá de forma difusa e pontual, pois no aterro não há impermeabilização, apenas canalização de parte do chorume produzido. Este chorume é canalizado para uma lagoa de tratamento aeróbico e posteriormente o efluente é lançado no córrego dos Periquitos. Este córrego está inserido na bacia do Baixo Tibagi, mais especificamente na bacia do ribeirão Cambé e apresenta em torno de 3 km de extensão (Fig.4).

**Figura 4** –Localização dos pontos estudados na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. A – Bacia do ribeirão Cambé, onde se localizam o ponto de coleta (Coleta) e o córrego dos Periquitos, e Bacia do ribeirão Cafezal, onde se localiza o ponto Caf. B – Detalhe do córrego dos Periquitos, indicando o aterro controlado do município de Londrina, PR, e os pontos nos quais foram realizados os testes (Periq1, Periq2 e Periq3).

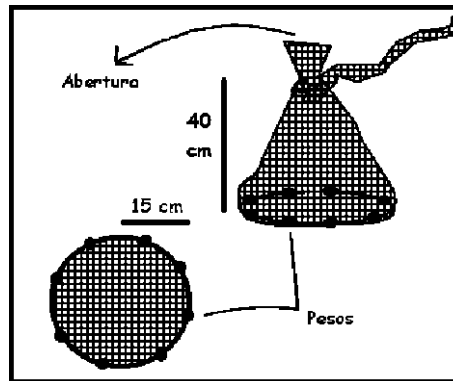


### 3.2.2 Desenho Experimental

Bivalves dulcícolas da espécie *Corbicula fluminea* ( $n = 510$ ), medindo  $2,71 \pm 0,02$  cm de comprimento e  $2,63 \pm 0,02$  cm de altura (média  $\pm$  EP), foram coletados em um lago urbano na cidade de Londrina, PR. Os organismos recém-coletados constituíram um grupo de análise no presente trabalho, chamado de "Coleta", e os resultados obtidos para este grupo foi comparado com aqueles dos pontos nos quais foram realizados testes *in situ*. Outros indivíduos foram submetidos a testes *in situ*, por períodos de 1, 5, 15 e 30 dias, em três pontos do córrego dos Periquitos (Periq1, Periq2 e Periq3) e um ponto no ribeirão Cafezal (Caf). Periq1, localizado aproximadamente a 20 m do lançamento do efluente, Periq2, a aproximadamente 1500 m, e Periq3 a 3000 m estão indicados na Fig.4B. O ponto Caf, localiza-se no município de Rolândia e está indicado na Fig.4A. Este local foi escolhido, pois fica próximo à nascente do ribeirão, em área pouco urbanizada e mata ciliar preservada e não há evidências ou relatos da presença de chorume no local. O ponto escolhido fica dentro de uma propriedade rural utilizada para turismo e não há utilização de agrotóxicos. Devido a estas características, os resultados obtidos nos animais confinados neste ponto (Caf) foram comparados àqueles dos animais confinados no córrego dos Periquitos, para verificar alterações nos indivíduos expostos ao chorume em testes *in situ*. Os testes *in situ* no córrego dos Periquitos foram todos realizados no mês de abril/2010 e no Caf no mês de julho/2010.

A manutenção dos bivalves nos testes de toxicidade *in situ* foi feita com uso de sacos confeccionados com redes de malha 1 cm, que permite o fluxo de água. Para cada tempo testado foi utilizado um saco contendo aproximadamente 30 indivíduos. Os sacos foram posicionados próximos à margem e em contato com o sedimento, e pesos foram acrescentados na base para impedir a flutuação. Estes sacos se fecham na parte superior e apresentam base circular de aproximadamente 30 cm, mantida através de arame entrelaçado na rede (Fig.5).

**Figura 5** – Sacos utilizados para manutenção de *C. fluminea* nos testes *in situ*.



Após os períodos de teste os bivalves foram transportados em recipientes plásticos contendo água do próprio local até o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina, onde foi realizada a amostragem.

### 3.2.3 Monitoramento de Parâmetros Físicos e Químicos

Os parâmetros físicos e químicos da água como a condutividade, pH, turbidez, oxigênio dissolvido e temperatura, foram tomados no ponto Coleta e no início e término de todos os testes *in situ* realizados com auxílio de um medidor multiparâmetros Horiba 5000.

### 3.2.4 Determinação de Metais no Sedimento

O sedimento dos pontos estudados no córrego dos Periquitos, bem como dos pontos Coleta e Caf foram coletados em campo e armazenados em tubos plásticos com tampa. Para coleta, os tubos abertos foram mergulhados na água e foi retirada a camada mais superficial de sedimento presente no fundo. Os metais chumbo, níquel, alumínio, cobre, cromo e cádmio foram analisados no sedimento na forma de metais fracamente ligados (potencialmente biodisponíveis). Para isso, 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 um) e no filtrado foi determinada a concentração dos metais (Mozeto 1999) por ionização eletrotérmica em forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica.

### 3.2.5 Amostragem

No laboratório, a hemolinfa dos bivalves foi retirada do músculo adutor anterior, com auxílio de seringas de 1 mL, para realização imediata do ensaio do cometa. Na sequência, os animais foram mortos através do rompimento deste músculo. As brânquias e glândulas digestivas foram removidas com auxílio de pinça e tesoura, e estes tecidos foram utilizados para análise de diferentes parâmetros. É importante esclarecer que a glândula digestiva não é facilmente diferenciada dos tecidos adjacentes, e por isso a denominação de glândula digestiva utilizada no presente trabalho refere-se ao tecido glandular adicionado de tecidos adjacentes.

Durante a amostragem, os animais foram mantidos em recipiente plástico contendo água do local de origem e os indivíduos utilizados para o ensaio de acúmulo de rodamina ficaram nesta condição por período de 1 a 2 horas até serem submetidos ao ensaio. Para as análises do acúmulo de rodamina, quantificação de espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante total os tecidos foram utilizados logo após a amostragem. Para as demais análises os tecidos foram congelados em  $-72^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6 Acúmulo de Metais nos Tecidos

Foram determinados os metais chumbo, níquel, alumínio, cobre, cromo, cádmio e manganês acumulados nas brânquias e glândulas digestivas dos bivalves. Os tecidos foram retirados, lavados em solução salina (26 mM NaCl; 4,3 mM Sacarose; pH 7,4) e transferidos para tubos plásticos previamente lavados com solução de ácido nítrico 0,5% por 24 horas. Os tubos foram mantidos em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  para secagem total dos tecidos. O tecido seco foi submetido à digestão ácida com ácido nítrico suprapuro (Merck) em estufa, a uma temperatura constante de  $60^{\circ}\text{C}$  até a total evaporação do ácido. Após a digestão, foi adicionado 1 mL de ácido nítrico suprapuro 0,2% (Merck) e o material digerido foi centrifugado (2000 g; 10 min). Assim como para o sedimento, a concentração dos metais foi determinada por ionização eletrotérmica em forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. Foi utilizado tecido referência do bivalve *Mytilus edulis* (ERM-CE728 - IRMM) para validação da análise de acúmulo de metais.

### 3.2.7 Biomarcadores

As brânquias e glândulas digestivas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7) e posteriormente centrifugadas (15600 g; 20 minutos; 4°C), para os procedimento de determinação da 7-Etoxiresorufina-O-deetilase, glutathione S transferase e lipoperoxidação. Para os demais biomarcadores foram utilizadas soluções específicas que serão descritas separadamente. O sobrenadante foi utilizado e quando necessário armazenado em ultrafreezer (-72°C) até o momento das análises.

#### 3.2.7.17-Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)

A atividade da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; 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 30 minutos (ex/em: 530/590nm). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina minuto<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>, baseada em uma curva padrão de resorufina.

#### 3.2.7.2 Glutathione S transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada através do método descrito por Keen et al. (1976). Este método se baseia na conjugação, catalisada pela GST, da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). O aumento de CDBN conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDBN conjugado minuto<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.2.7.3 Ensaio de acúmulo de rodamina (MXR)

O ensaio de acúmulo do fluorescente rodamina B (substrato de P-gp) foi realizado de acordo com Kurelec et al. (2000) para avaliação do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR). Neste ensaio, o aumento do acúmulo do fluorescente representa uma redução do MXR. Em torno de 1 - 2 horas após a chegada ao laboratório, os animais foram colocados em uma solução contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de rodamina B por um período de 2 horas, com agitação da água. Após este período, os animais foram mortos e as brânquias e glândulas digestivas retiradas para verificação do acúmulo de rodamina nos tecidos. Os tecidos foram lavados em solução salina (26 mM NaCl; 4,3 mM Sacarose; pH 7,4), homogeneizados em água destilada (1:7 - m/v) e centrifugados (1700 g; 7 minutos; 4°C). A fluorescência referente ao acúmulo de rodamina foi medida (ex:/em: 544/590 nm) e as concentrações determinadas através de uma curva padrão de rodamina, sendo os dados expressos em  $\mu\text{M}$  de rodamina mg de tecido úmido<sup>-1</sup>.

### 3.2.7.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Capacidade antioxidante total (CAO)

As espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil foram medidas através do método proposto por Amado et al. (2009). Os tecidos recém-coletados foram homogeneizados (1:4 - m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM; pH 7,75) com EDTA 2 mM e  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM e centrifugados (15600 g; 20 minutos; 4°C). O sobrenadante obtido foi diluído para concentração de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  de proteína considerando o volume na microplaca. O método baseia-se na detecção de ERO por fluorescência (ex/em: 485/520 nm) utilizando 2'7'-diclorofluorescina diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA) como substrato, monitorado por 30 min. As amostras foram submetidas a duas condições: presença e ausência de 2,2'-azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP). A decomposição de ABAP a 35°C gera a produção de radicais peroxil. A quantidade de ERO foi determinada pela área dos gráficos obtida pelo cálculo da integral das unidades de fluorescência ao longo do tempo de leitura, considerando-se apenas as leituras realizadas sem ABAP e a CAO foi calculada pela diferença entre as áreas dos gráficos obtidos das leituras com presença e ausência de ABAP. Estes parâmetros foram expressos pela área dos gráficos.

### 3.2.7.5 Lipoperoxidação (LPO)

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizado de acordo com Camejo et al. (1998) para medida de lipoperoxidação. Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 357 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.2.7.6 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa com hemócitos foi realizado segundo Tice et al. (2000), com modificações de Fedato et al. (2010). Amostras de hemolinfa dos animais foram coletadas do músculo adutor posterior de cada indivíduo, utilizando-se uma seringa de 1 mL e obtendo-se cerca de 500 uL de hemolinfa por animal amostrado. Durante todo o período de amostragem as amostras de hemolinfa coletadas foram mantidas em um recipiente com gelo. A hemolinfa foi misturada a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e então, espalhada sobre lâminas histológicas, previamente preparadas com um filme de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Estas lâminas permaneceram por 30 minutos sob refrigeração (4°C), e tiveram suas lamínulas retiradas. Feito isto, as lâminas ficaram submersas por no mínimo uma hora em solução de lise (1 mL Triton X-100, 10 mL DMSO, q.s.p. 100 mL SLE) preparada a partir de uma solução de lise estoque (SLE): NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM. Em seguida, as lâminas foram mantidas por 30 minutos em cuba de eletroforese contendo tampão em condição alcalina (pH > 13), para que as moléculas de DNA relaxassem e desnaturassem. A corrida de eletroforese (20 min) ocorreu em 300 mA, 25V (1 V.cm<sup>-1</sup>) e depois as lâminas foram neutralizadas com um tampão de neutralização (Tris 0,4 M) com três banhos de 5 minutos cada. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e mantidas sob-refrigeração até análise citológica. Após serem coradas com GelRed, as lâminas foram codificadas e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram analisados

100 nucleóides por animal e cada nucleóide analisado recebeu uma classificação de acordo com o dano: classe 0 = ausência de cauda do cometa, classe 1 = cauda do cometa menor que o diâmetro do nucleóide, classe 2 = cauda do cometa maior que o diâmetro do nucleóide e classe 3 = cauda do cometa maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore calculado pela fórmula:  $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$ , em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o escore total para as células analisadas pode variar de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 300 (dano máximo = todas as células apresentam dano de classe 3).

#### 3.2.7.7 *Metalotioneína (MT)*

O conteúdo de metalotioneínas foi determinado segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997a) com modificações. São quantificadas proteínas semelhantes à metalotioneínas (MT-like), que serão tratadas no presente trabalho como metalotioneínas (MT). As branquias foram homogeneizadas (1:5 - m/v) em tampão (Sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM, p-mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugadas por 45 minutos (21300 g; 4 °C), o sobrenadante foi submetido a fracionamento etanol/clorofórmio ácido para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutationa reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em nmol de GSH mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.2.7.8 *Proteínas totais*

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250.

A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

### 3.2.8 Análises Estatísticas

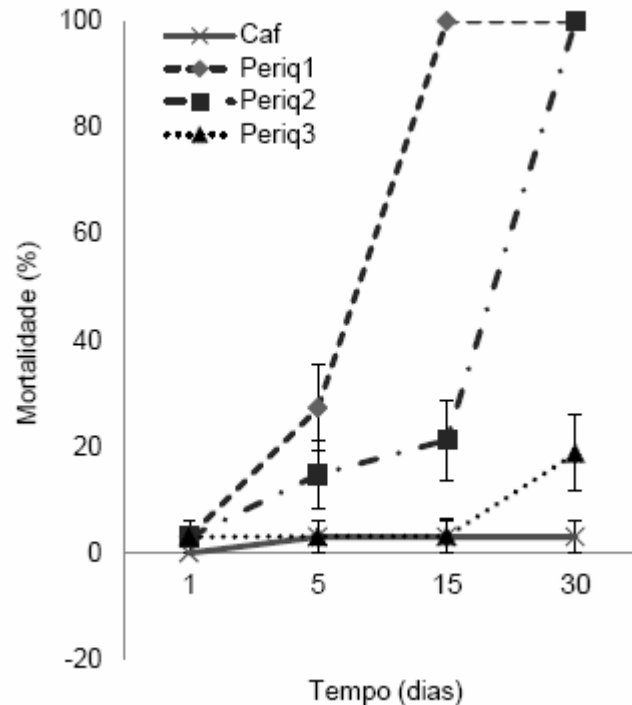
Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão. No caso da mortalidade observada, os dados foram expressos percentual  $\pm$  erro padrão, calculado através da fórmula:  $\sqrt{P \times (1-P)} / \sqrt{n}$ , onde P = percentual e n = número total de indivíduos.

Os dados físicos e químicos avaliados foram comparados entre os diferentes pontos estudados (Coleta, Caf, Periq1, Periq2 e Periq3), sem considerar os diferentes tempos experimentais. Os valores médios obtidos de cada biomarcador foram utilizados para comparações entre: (i) os pontos onde foram realizados os testes *in situ* (Caf, Periq1, Periq2 e Periq3), em todos os tempos experimentais, com o ponto de coleta; (ii) os diferentes tempos experimentais de um mesmo ponto (1, 5, 15 e 30 dias); (iii) os pontos (Caf, Periq1, Periq2 e Periq3) nos quais foram realizados os testes *in situ* em um mesmo tempo experimental. Para estas análises foi utilizada análise de variância paramétrica (ANOVA), seguido por um teste de comparações múltiplas (Teste de Student Newman-Keuls) quando indicado. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS

Durante os testes ocorreu mortalidade dos animais, principalmente nos pontos localizados no córrego contaminado por chorume. A morte dos animais foi considerada quando observada abertura da concha. No Periq1 ocorreu 100% de mortalidade dos animais após 15 e 30 dias de confinamento, 27% em 5 dias e apenas 3% em 1 dia. No Periq2 houve 100% de mortalidade no teste de 30 dias, 15% em 15 dias e 3% nos outros dois períodos. No Periq3 ocorreu 19% de mortalidade no teste de 30 dias, e nos demais tempos apenas 3%. No ponto Caf a mortalidade observada foi sempre inferior a 6%. A mortalidade observada nos animais confinados no córrego contaminado por chorume decresceu com o aumento da distância em relação à fonte de chorume (Fig.6). Devido à mortalidade os dados de Periq1 em 15 e 30 e Periq2 em 30 dias não foram obtidos. Em Periq1 optou-se pela não realização do ensaio de acúmulo de rodamina em 5 dias, pois houve 27% de mortalidade e para este ensaio utilizariam-se indivíduos exclusivos.

**Figura 6** - Mortalidade (%  $\pm$  EP), ao longo do tempo, dos bivalves *C. fluminea* submetidos a testes *in situ* no ribeirão Cafezal (Caf) e em três pontos de um córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3).



### 3.3.1 Parâmetros Físicos e Químicos da Água

Os valores obtidos para temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica, pH e turbidez nos pontos Coleta e Caf e nos pontos contaminados por chorume estão indicados na Tabela 3. A condutividade nos pontos contaminados (Periq1, Periq2 e Periq3) decresceu com o aumento da distância em relação à fonte de chorume, e foi significativamente mais elevada que as medidas de condutividade nos pontos Coleta e Caf. Foi observado que no Caf a concentração de oxigênio dissolvido era significativamente maior que nos demais pontos.

**Tabela 3** - Parâmetros físicos e químicos da água dos locais avaliados (Média ± EP, n = 3).

Parâmetro	Coleta	Caf	Periq1	Periq2	Periq3
<b>Temperatura</b> (°C)	22,4 ± 1,9	18,6 ± 0,1	23,0 ± 0,6	21,4 ± 0,7	20,8 ± 0,8
<b>OD</b> (mg mL <sup>-1</sup> )	7,57 ± 0,60 <sup>a</sup>	9,82 ± 0,16 <sup>b</sup>	7,63 ± 0,44 <sup>a</sup>	7,69 ± 0,42 <sup>a</sup>	8,11 ± 0,60 <sup>a</sup>
<b>Condutividade</b> (uS cm <sup>-1</sup> )	133 ± 21 <sup>a</sup>	42 ± 1 <sup>a</sup>	974 ± 88 <sup>b</sup>	590 ± 47 <sup>c</sup>	436 ± 40 <sup>c</sup>
<b>pH</b>	6,75 ± 0,32	6,81 ± 0,28	7,33 ± 0,06	7,35 ± 0,05	7,00 ± 0,16
<b>Turbidez</b> (NTU)	10,35 ± 2,05	8,25 ± 0,65	17,07 ± 2,25	10,85 ± 2,15	16,73 ± 2,00

OD: Oxigênio dissolvido; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos (P < 0,05).

### 3.3.2 Concentração de Metais no Sedimento

Os resultados da concentração de alguns metais no sedimento dos locais estudados estão apresentados na Tabela 4. Foi observada concentração significativamente maior de Cr e Ni no sedimento dos três pontos do córrego dos Periquitos em relação ao ponto Caf. No caso do Ni essa diferença também ocorreu em relação ao ponto Coleta. A concentração de Pb foi significativamente menor no ponto Caf em relação ao ponto Coleta. O Cd não foi detectado em nenhum dos pontos.

**Tabela 4** - Concentração de metais (ug g<sup>-1</sup>) fracamente ligados ao sedimento dos locais avaliados (Média ± EP, n = 3-4).

Local	Cr	Cu	Cd	Pb	Al	Ni
<b>Coleta</b>	2,45±0,67	32,00±3,26	n.d.	4,72±0,39	818,25±112,21	1,07±0,06
<b>Caf</b>	1,56±0,53	47,44±13,93	n.d.	1,82±0,96 *	685,92±158,79	1,34±0,30
<b>Periq1</b>	3,95±0,59 #	60,86±4,91	n.d.	3,96±0,50	1074,20±125,86	2,61±0,17 *#
<b>Periq2</b>	4,44±0,19 #	55,86±4,59	n.d.	2,55±0,13	1080,80±61,45	2,61±0,15 *#
<b>Periq3</b>	3,82±0,45 #	61,94±1,75	n.d.	2,26±0,44	904,03±27,77	2,62±0,16 *#

\* indica diferença significativa em relação ao local Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf (P ≤ 0,05). n.d.- não detectado. Limites de detecção: Al 0,1 µg.L<sup>-1</sup>; Cd 0,002 µg.L<sup>-1</sup>; Cr 0,004 µg.L<sup>-1</sup>; Cu 0,014 µg.L<sup>-1</sup>; Ni 0,07 µg.L<sup>-1</sup>; Pb 0,05 µg.L<sup>-1</sup>.

### 3.3.3 Acúmulo de Metais nos Tecidos

A concentração de Cr, Cu, Cd, Pb, Al, Ni e Mn nas brânquias e glândulas digestivas de *C. fluminea* do ponto Coleta e daqueles animais mantidos por 1, 5, 15 e 30 dias no Caf, Periq1, Periq2 e Periq3 estão indicados nas Tabela 5 e 6, respectivamente. As análises no tecido de referência (ERM-CE728 - IRMM) mostraram recuperação de 105% para o Cr, 104% para o Cu, 100% para o Mn e 45% para o Cd. Os animais apresentaram maior acúmulo de metais nas brânquias do que na glândula digestiva, apresentando de duas a cinco vezes mais metais no tecido branquial.

Dentre os metais analisados o Cr foi o que aumentou mais claramente nos tecidos de *C. fluminea* confinados nos três pontos do córrego dos Periquitos em relação aos bivalves dos pontos Coleta e Caf. Já no teste de 1 dia foi constatado aumento de acúmulo deste metal, que continuou aumentando nos outros tempos experimentais, e chegou a ser 2 vezes maior nas brânquias e 4 vezes na glândula digestiva já nos animais confinados por 5 dias no córrego dos Periquitos. O Cu também aumentou nos dois tecidos, mas apenas nos animais confinados no Periq2. Além disso, foi observada diminuição dos metais Al e Ni acumulados nos tecidos dos animais submetidos aos testes de toxicidade *in situ* no córrego dos Periquitos e no Caf em relação ao ponto Coleta e diminuição de Mn, Cu e Cd apenas no Caf.

**Tabela 5** - Acúmulo de metais em branquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco) de *C. fluminea* do ponto Coleta e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias no ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego **contaminado por chorume** (Periq1, Periq2 e Periq3) (Média  $\pm$  EP, n = 3-7).

	Coleta	Caf	Periq1	Periq2	Periq3	
Cr	1		11,43 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	# 18,24 $\pm$ 2,44 <sup>a</sup>	#16,95 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	*#22,59 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>
	5	13,35 $\pm$ 0,11	11,04 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	*# 31,44 $\pm$ 4,39 <sup>b</sup>	#20,04 $\pm$ 1,51 <sup>ab</sup>	#17,51 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>
	15		13,74 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	n.a.	*#29,83 $\pm$ 1,87 <sup>b</sup>	*#34,32 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup>
	30		10,85 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	*#22,75 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>
Cu	1		65,95 $\pm$ 8,61 <sup>a</sup>	99,08 $\pm$ 12,34 <sup>a</sup>	*78,14 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>	93,24 $\pm$ 12,87 <sup>a</sup>
	5	96,98 $\pm$ 2,84	*58,74 $\pm$ 7,82 <sup>a</sup>	#112,73 $\pm$ 12,33 <sup>a</sup>	*69,99 $\pm$ 4,75 <sup>a</sup>	91,99 $\pm$ 13,56 <sup>a</sup>
	15		115,94 $\pm$ 13,12 <sup>b</sup>	n.a.	*133,17 $\pm$ 3,54 <sup>b</sup>	93,98 $\pm$ 3,92 <sup>a</sup>
	30		71,88 $\pm$ 5,48 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	#100,04 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>
Cd	1		*0,20 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	#1,04 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	#1,29 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
	5	1,17 $\pm$ 0,14	0,86 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	*0,42 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	*0,62 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	#1,67 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
	15		*1,55 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	n.a.	1,50 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	#0,58 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
	30		1,00 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	1,07 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>
Pb	1		0,51 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	#0,20 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
	5	0,34 $\pm$ 0,11	*0,76 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	#0,29 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
	15		0,41 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	n.a.	0,51 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,21 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
	30		0,26 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	#0,54 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
Al	1		*80,51 $\pm$ 7,44 <sup>a</sup>	143,39 $\pm$ 39,88 <sup>a</sup>	*93,81 $\pm$ 17,94 <sup>a</sup>	#189,71 $\pm$ 17,58 <sup>a</sup>
	5	172,04 $\pm$ 20,29	*50,31 $\pm$ 6,23 <sup>ab</sup>	62,84 $\pm$ 26,25 <sup>a</sup>	*51,28 $\pm$ 11,59 <sup>a</sup>	*73,36 $\pm$ 19,84 <sup>b</sup>
	15		*30,71 $\pm$ 3,04 <sup>b</sup>	n.a.	*62,05 $\pm$ 5,96 <sup>a</sup>	*86,54 $\pm$ 30,48 <sup>b</sup>
	30		*22,96 $\pm$ 4,05 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	*#82,63 $\pm$ 9,00 <sup>b</sup>
Ni	1		2,41 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	2,01 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	*1,39 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	*1,83 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>
	5	2,79 $\pm$ 0,41	1,29 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	*1,09 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	*0,92 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	*1,37 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
	15		2,55 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	n.a.	*1,93 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	*1,31 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
	30		3,92 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	*#1,25 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Mn	1		*15,70 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup>	*#51,01 $\pm$ 5,93 <sup>a</sup>	#88,85 $\pm$ 14,67 <sup>a</sup>	#66,79 $\pm$ 8,26 <sup>a</sup>
	5	79,88 $\pm$ 6,02	*13,85 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>	*20,61 $\pm$ 2,21 <sup>b</sup>	#38,86 $\pm$ 11,56 <sup>b</sup>	#63,75 $\pm$ 4,80 <sup>a</sup>
	15		*18,47 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup>	n.a.	#58,57 $\pm$ 4,22 <sup>ab</sup>	#57,11 $\pm$ 8,51 <sup>ab</sup>
	30		*25,76 $\pm$ 4,02 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	*#39,13 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>

\* indica diferença significativa em relação ao local Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local ( $P \leq 0,05$ ). n.a. – Não analisado devido a mortalidade dos animais. Limites de detecção: Al 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cd 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cr 0,004  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cu 0,014  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Mn 0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Ni 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Pb 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela 6** - Acúmulo de metais em glândulas digestivas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco) de *C. fluminea* do ponto Coleta e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias no ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por choroume (Periq1, Periq2 e Periq3) Média  $\pm$  EP, n = 3-7).

	Coleta	Caf	Periq1	Periq2	Periq3	
Cr	1		4,05 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	#8,75 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	7,61 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	*#9,05 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>
	5	5,09 $\pm$ 0,89	3,28 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	*#13,46 $\pm$ 1,69 <sup>b</sup>	*#14,81 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>	*#10,45 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>
	15		4,80 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	n.a.	*#17,31 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>	*#17,03 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>
	30		3,51 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	*#18,22 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>
Cu	1		*48,46 $\pm$ 5,10 <sup>a</sup>	#66,94 $\pm$ 2,91 <sup>a</sup>	#66,76 $\pm$ 4,72 <sup>a</sup>	57,91 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>
	5	70,18 $\pm$ 8,51	*48,69 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	#86,18 $\pm$ 13,07 <sup>a</sup>	*#90,91 $\pm$ 2,53 <sup>b</sup>	69,18 $\pm$ 4,36 <sup>a</sup>
	15		*31,53 $\pm$ 4,70 <sup>a</sup>	n.a.	*#101,28 $\pm$ 5,00 <sup>b</sup>	#79,58 $\pm$ 5,50 <sup>a</sup>
	30		*29,13 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	#80,32 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>
Cd	1		*0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	#0,14 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	#0,24 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	#0,16 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	5	0,16 $\pm$ 0,04	*0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	#0,33 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	#0,32 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	15		0,14 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	n.a.	#0,33 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	#0,30 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
	30		0,16 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	0,24 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Pb	1		*0,67 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	#0,06 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	#0,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	#0,13 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	5	0,10 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	#0,10 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	#0,14 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	#0,15 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	15		0,12 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	n.a.	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	#0,24 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
	30		0,09 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	0,15 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
Al	1		84,80 $\pm$ 25,45 <sup>a</sup>	#27,04 $\pm$ 9,43 <sup>a</sup>	*#18,84 $\pm$ 4,76 <sup>a</sup>	#21,11 $\pm$ 4,87 <sup>a</sup>
	5	42,96 $\pm$ 14,49	48,08 $\pm$ 6,67 <sup>a</sup>	47,79 $\pm$ 10,98 <sup>a</sup>	*#12,40 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	30,70 $\pm$ 11,43 <sup>a</sup>
	15		60,44 $\pm$ 9,94 <sup>a</sup>	n.a.	*#11,86 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	*#7,65 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup>
	30		67,90 $\pm$ 19,37 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	*#6,81 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>
Ni	1		*0,42 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	*0,45 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
	5	0,71 $\pm$ 0,04	*0,28 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	#0,67 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	*0,51 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
	15		0,54 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	n.a.	*0,51 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	30		0,53 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	0,43 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Mn	1		17,41 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	23,70 $\pm$ 2,80 <sup>a</sup>	#29,08 $\pm$ 3,94 <sup>ab</sup>	#31,92 $\pm$ 2,63 <sup>a</sup>
	5	32,82 $\pm$ 5,81	9,88 $\pm$ 1,85 <sup>ab</sup>	#36,32 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	#22,10 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	#26,97 $\pm$ 3,25 <sup>a</sup>
	15		6,16 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	n.a.	#53,04 $\pm$ 14,86 <sup>b</sup>	#29,79 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>
	30		5,61 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	#14,64 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>

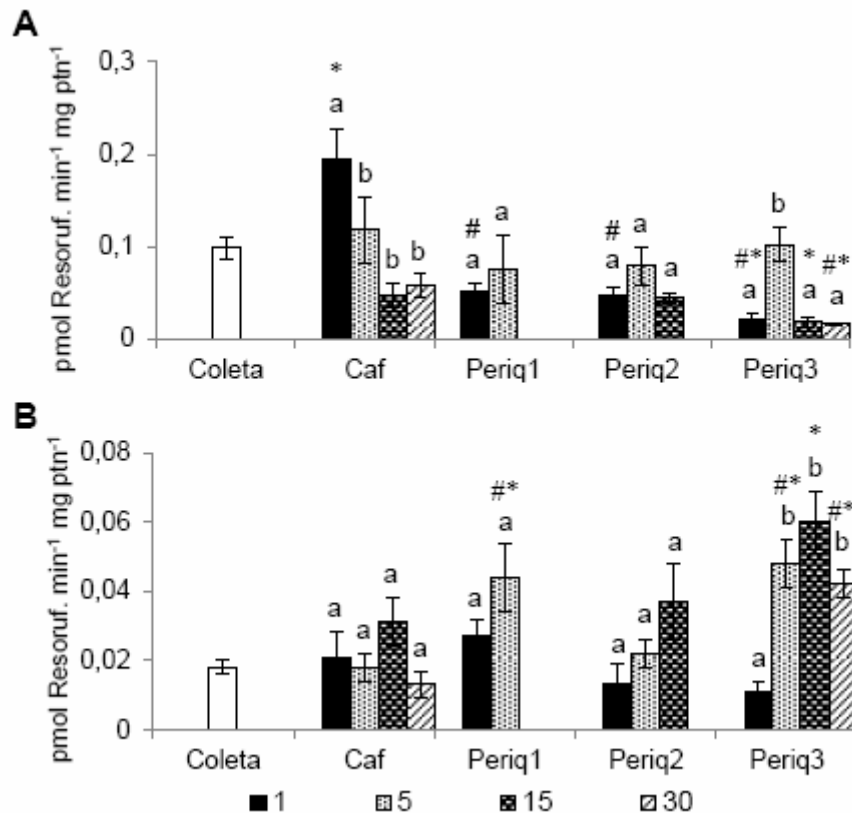
\* indica diferença significativa em relação ao local Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local ( $P \leq 0,05$ ). n.a. – Não analisado devido a mortalidade dos animais. Limites de detecção: Al 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cd 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cr 0,004  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cu 0,014  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Mn 0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Ni 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Pb 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3.4 Biomarcadores

#### 3.3.4.1 7 Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)

A atividade da EROD foi medida nas brânquias e glândula digestiva e esta foi cerca de 5 vezes maior no tecido branquial em relação ao outro tecido. Em brânquias foi observada uma redução da atividade da enzima no Periq3, nos tempos de 1, 15 e 30 dias, quando comparada ao ponto Coleta e Caf. No Periq1 e Periq2 no teste de 1 dia foi observada diferença na atividade da EROD em relação ao Caf (Fig. 7A). Diferente do observado nas brânquias, na glândula digestiva foi observado aumento da EROD no Periq1 em 5 dias e no Periq3 em 5, 15 e 30 dias. Essas diferenças ocorreram em relação ao ponto Coleta e Caf, com exceção do teste de 5 dias no Periq3, no qual não foi observada diferença significativa em relação ao Caf. (Fig. 7B).

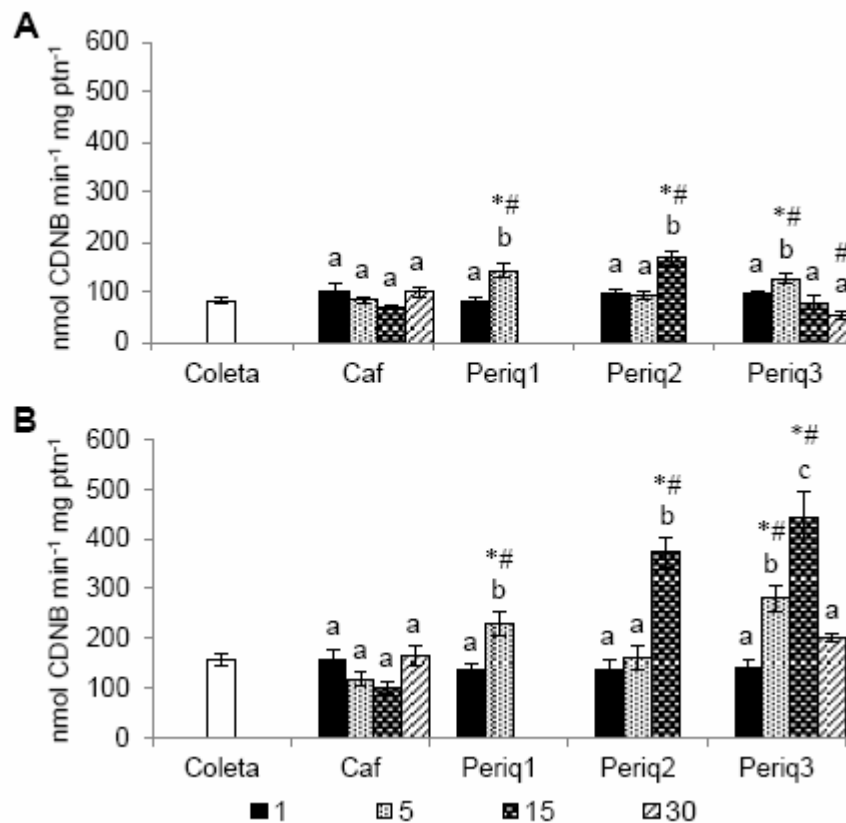
**Figura 7 – Atividade da 7-Etoxioresorufina O-deetilase (pmol Resorufina min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P ≤ 0,05).**



#### 3.3.4.2 Glutathione S transferase (GST)

Foi detectada uma elevada atividade da GST nos dois tecidos em Periq1, Periq2 e Periq3, significativamente maior em relação ao ponto Coleta e Caf, após 5 e/ou 15 dias de teste. Nas brânquias, o aumento da atividade da GST em Periq3 ocorreu no teste de 5 dias e em 30 dias ocorreu diminuição significativa desta em relação ao Caf. Neste mesmo ponto, os animais apresentaram um aumento progressivo da atividade da enzima em glândula digestiva que posteriormente se normalizou em 30 dias de teste. (Fig.8)

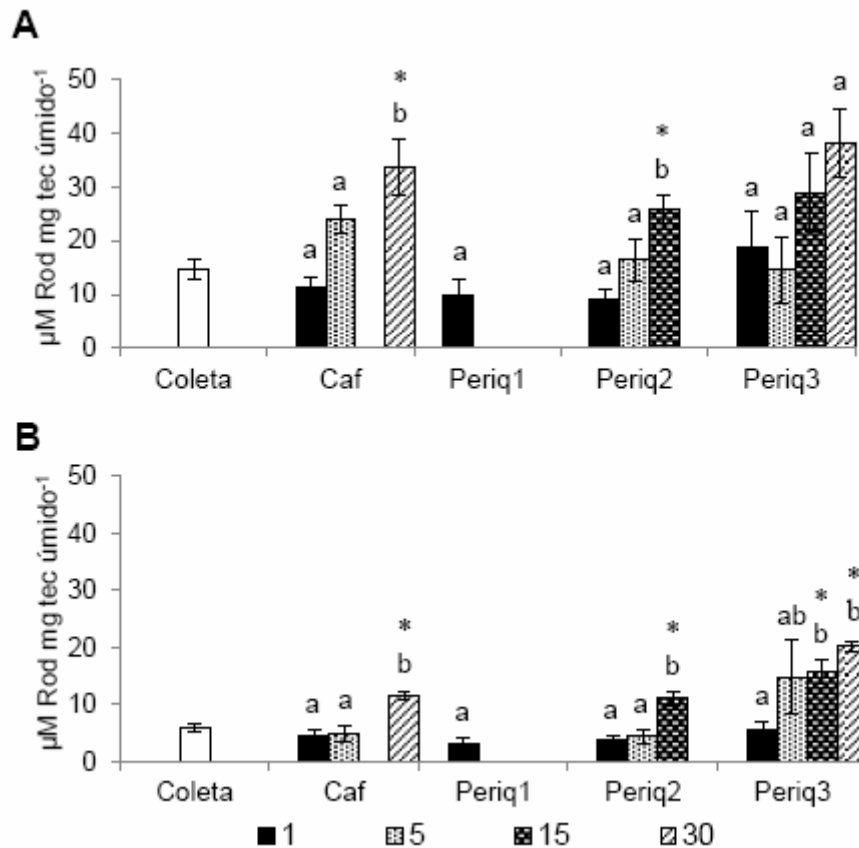
**Figura 8** –Atividade da Glutathione S transferase (nmol CDNB conjugado min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P ≤ 0,05).



#### 3.3.4.3 Ensaio de acúmulo de Rodamina (MXR)

O maior acúmulo de rodamina nos tecidos representa uma diminuição do MXR. No presente estudo, foi observada uma redução significativa no MXR em ambos os tecidos avaliados, principalmente nos maiores tempos experimentais do Caf, Periq2 e Periq3 em relação ao ponto Coleta. Nas brânquias foi observada redução do MXR em Periq2 no teste de 15 dias e no Caf no teste de 30 dias. Como nas brânquias, em glândula digestiva também foi observada redução do MXR no Periq2 e no Caf, mas também nos tempos de 15 e 30 dias no Periq3. (Fig.9).

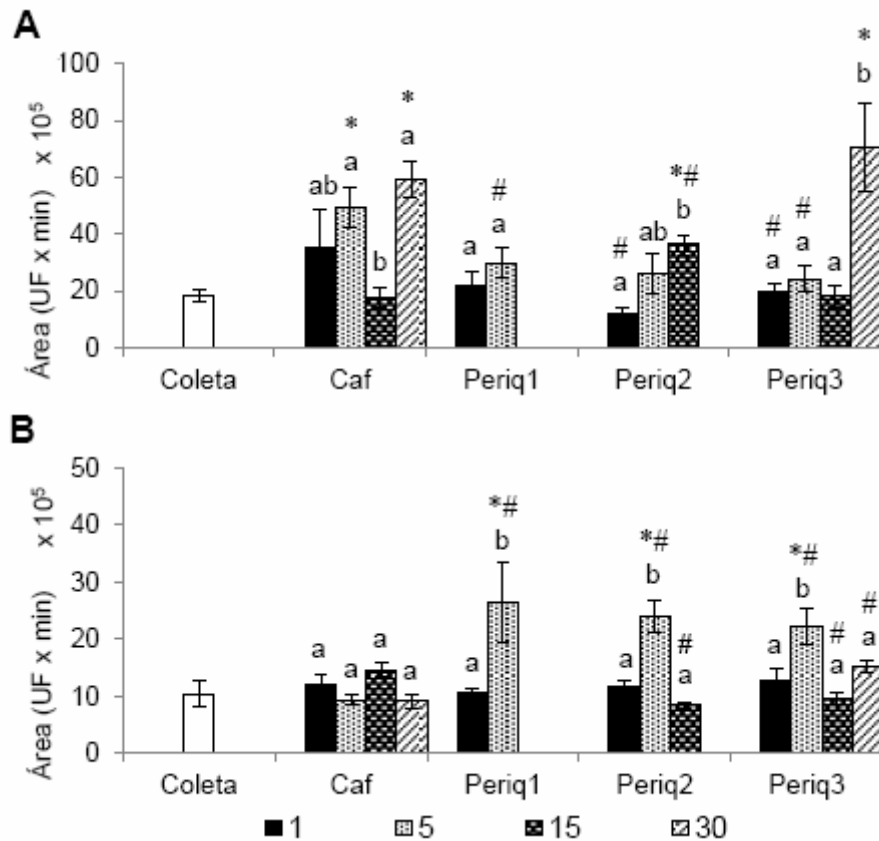
**Figura 9 - Mecanismo de resistência a multixenobióticos (Rodamina mg tecido úmido<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P <0,05).**



#### 3.3.4.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (CAO)

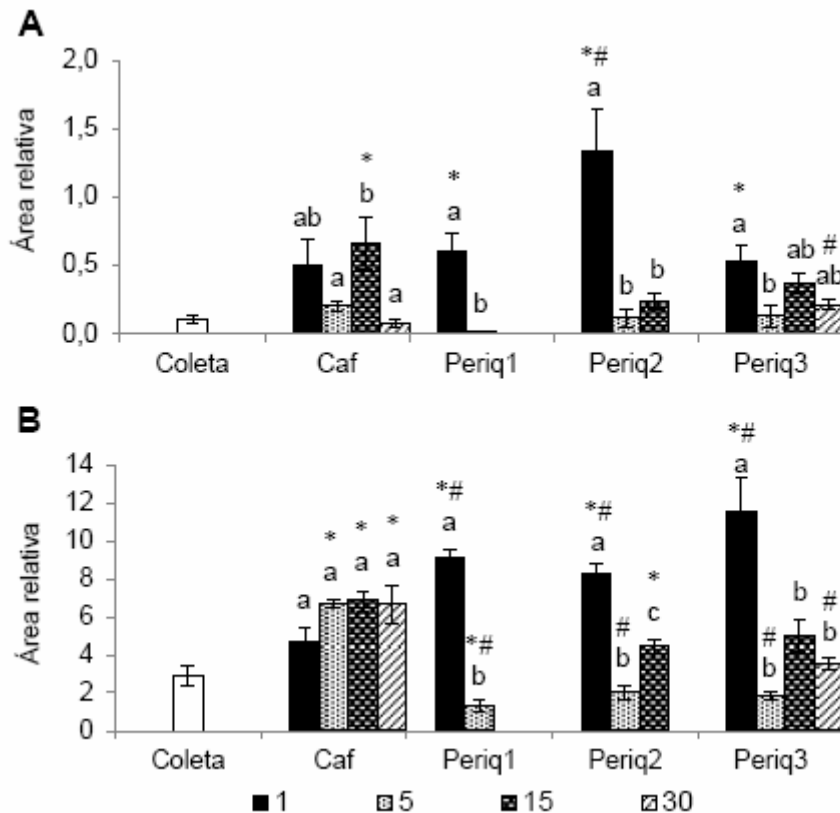
Foi observada, nos dois tecidos, maior geração de ERO nos pontos avaliados no córrego contaminado por chorume em relação ao ponto Coleta. Em brânquias foi observado aumento significativo em Periq2 e Periq3 em 15 e 30 dias, respectivamente. Os animais mantidos no ribeirão Cafezal também apresentaram aumento na geração de ERO nos tempos de 5 e 30 dias. Na glândula digestiva o aumento significativo na geração de ERO foi observado em Periq1, Periq2 e Periq3 em 5 dias de teste (Fig.10).

**Figura 10 - Espécies reativas de oxigênio (Área) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P <0,05).**



A CAO tem relação inversa com a área relativa apresentada, ou seja, o aumento da área relativa representa a diminuição da CAO. Observou-se, portanto, redução da CAO em Periq1, Periq2 e Periq3, em ambos os tecidos, em 1 dia de teste. Em 5 dias ocorre o restabelecimento da CAO e aumento significativo no Periq1 em relação ao ponto Coleta e nos três pontos em relação ao Caf. No Periq2 foi observada redução da CAO também no teste de 15 dias. A redução da CAO também ocorreu nos bivalves mantidos no Caf em relação ao ponto Coleta nos tempos de 5, 15 e 30 dias (Fig.11).

**Figura 11 - Capacidade antioxidante total [(Média ± EP) Área relativa] em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P < 0,05).**

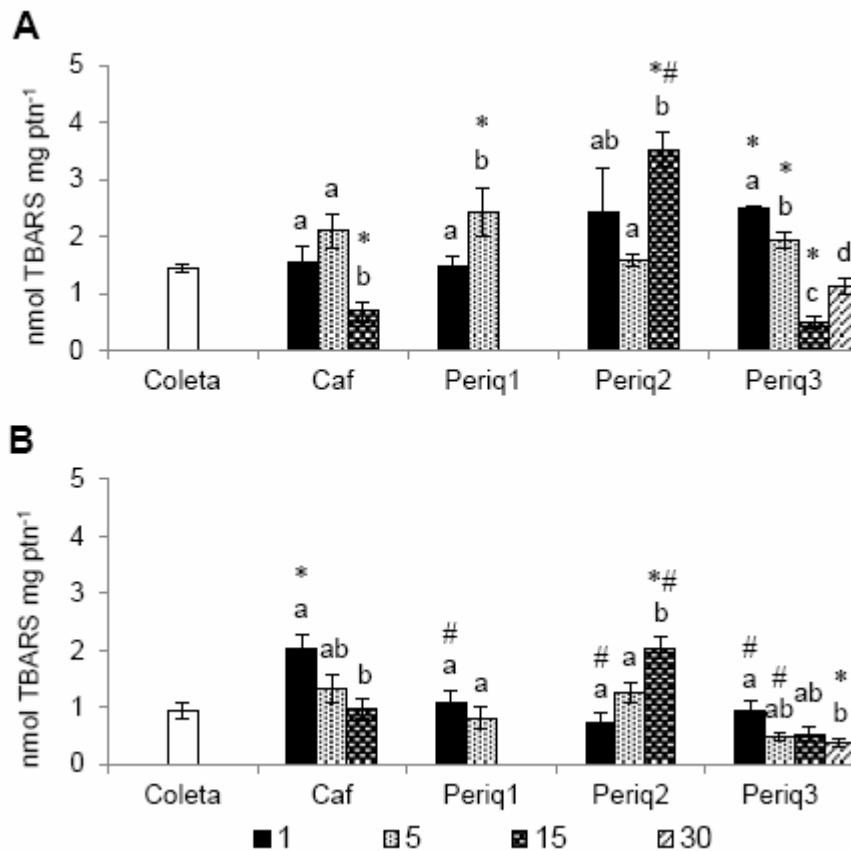


### 3.3.4.5 Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação foi evidenciada através do ensaio TBARS (Fig.12). Foi observado aumento de TBARS em brânquias de *C. fluminea* submetidos a testes *in situ* em Periq1, Periq2 e Periq3 em relação ao ponto Coleta, entretanto estes aumentos ocorreram em tempos experimentais distintos. No Periq1, o aumento foi observado em 5 dias de exposição, enquanto no Periq2 o aumento ocorreu apenas em 15 dias. No Periq3 foi observado aumento significativo de TBARS em 1 e 5 dias, e redução em 15 dias. Na glândula digestiva aumento significativo foi observado apenas no Periq2 após 15 dias de exposição. Neste mesmo tecido ocorreu redução de TBARS nos animais confinados por 30 dias no Periq3. No Caf, foi observada

redução de lipoperoxidação em 15 dias, quando comparado as testes de 1 e 5 dias neste mesmo local, o que evidencia redução deste parâmetro ao longo do tempo.

**Figura 12 - TBARS (nmol TBARS mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por choroume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P < 0,05).**

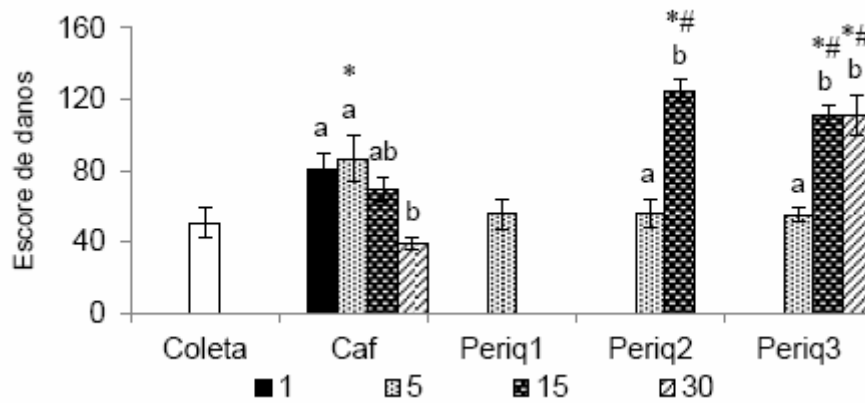


#### 3.3.4.6 Ensaio do cometa

Os hemócitos de *C. fluminea* foram avaliados através do ensaio do cometa, para detecção de danos na molécula de DNA. Os dados de 1 dia não foram obtidos. Foi verificado que após 15 dias de teste ocorreu aumento significativo do escore de danos nos bivalves mantidos em Periq2 e Periq3 em relação aos pontos Coleta e Caf. Este aumento se manteve no tempo de 30 dias em Periq3. Os animais

confinados no ribeirão Cafezal apresentaram o escore de danos significativamente maior que o ponto Coleta no tempo de 5 dias, entretanto ocorreu diminuição significativa deste em 30 dias em relação ao observado em 1 e 5 dias neste mesmo local (Fig.13).

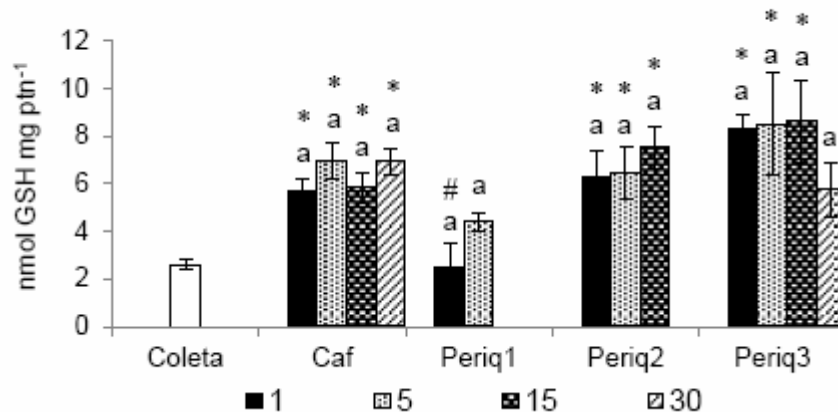
**Figura 13 - Danos no DNA de hemócitos (Escore de danos) de *C. fluminea* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local ( $P < 0,05$ ).**



#### 3.3.4.7 Metalotioneína (MT)

O conteúdo de MT apresentou-se significativamente maior nos animais submetidos a testes em Periq2 e Periq3 nos tempos de 1, 5 e 15 dias, e também no Caf em relação ao ponto Coleta. No Periq3, ocorreu restabelecimento do conteúdo de MT após 30 dias de exposição. Em Periq1 não foi observada alteração no conteúdo de MT (Fig.14).

**Figura 14 -** Conteúdo de metalotioneínas (nmol de GSH mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias de *C. ilumines* do ponto de Coleta (Coleta) e submetidos a testes *in situ* por 1, 5, 15 e 30 dias em um ribeirão Cafezal (Caf) e três pontos no córrego contaminado por chorume (Periq1, Periq2 e Periq3). As barras representam a média e as linhas verticais o EP. \* indica diferença significativa em relação à Coleta; # indica diferença significativa em relação ao Caf em um mesmo tempo; Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo local (P < 0,05).



### 3.4 DISCUSSÃO

Os potenciais efeitos dos contaminantes presentes em misturas complexas em organismos aquáticos são difíceis de serem determinados. Geralmente a toxicidade dos compostos é avaliada de forma individual ou em misturas simples. Os efeitos de compostos em misturas podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos e estes vão ser determinados de acordo com a concentração dos compostos, interações dos compostos no meio, nos sítios de entrada e eliminação destes pelos organismos e nos sítios de ação tóxica (Spurgeon et al. 2010). O chorume consiste em uma mistura complexa e variável, e por isso, é difícil identificar se os compostos presentes nele causaram alterações em *C. fluminea* de forma individual ou conjunta.

Dados de análises realizadas no chorume bruto e em amostras coletadas a jusante do lançamento do efluente no córrego dos Periquitos nos meses de abril e julho/2010 (meses nos quais foram realizados os testes do presente trabalho), cedidos pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da UEL mostram que o chorume bruto apresentava altos valores de condutividade elétrica (8865  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ),

DBO (593 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) e DQO (3025 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), amônia (957 mg L<sup>-1</sup>), nitrogênio Kjeldahl total (NKT 1052 mg L<sup>-1</sup>), cloretos (1751 mg L<sup>-1</sup>) e fósforo total (2 mg L<sup>-1</sup>). As análises feitas no córrego, a jusante do lançamento de chorume, demonstram a ocorrência de diluição do chorume, porém alguns valores continuam elevados, acima do permitido na Resolução CONAMA 357/2005 para corpos d'água de Classes 2 e 3, como a condutividade elétrica (1405 µS cm<sup>-1</sup>), DBO (33 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), amônia (28 mg L<sup>-1</sup>) e fósforo total (0,6 mg L<sup>-1</sup>). Ainda nas mesmas análises foram detectados, no chorume bruto, alumínio total (0,435 mg L<sup>-1</sup>), cobre total (0,081 mg L<sup>-1</sup>), cromo total (0,06 mg L<sup>-1</sup>), ferro total (8,74 mg L<sup>-1</sup>), manganês total (1,68 mg L<sup>-1</sup>), níquel total (0,017 mg L<sup>-1</sup>) e prata total (0,40 mg L<sup>-1</sup>).

Os metais, de forma geral, não são considerados o maior problema de contaminação por chorume, principalmente pela baixa concentração em que são encontrados (Christensen et al. 2001). A legislação brasileira, por meio da Resolução CONAMA 344/04, apresenta limites de concentrações de metais no sedimento para áreas a serem dragadas, que representam os limiares de baixa probabilidade (Nível 1) ou provável (Nível 2) efeito adverso a biota. A concentração de metais no sedimento, observado no presente estudo, foi, de forma geral, inferior aos limites estabelecidos nesta Resolução, com exceção do cobre, que foi detectado em concentrações próximas a 60 ug g<sup>-1</sup> nos pontos do córrego dos Periquitos, e cujo limite estabelecido (Nível 1) é de 35,7 ug g<sup>-1</sup>. O presente trabalho mostrou que as concentrações de Cr e Ni foram significativamente maiores nos sedimentos nos três pontos do córrego contaminado por chorume, porém as concentrações encontradas são baixas quando comparadas aos limites estabelecidos para sedimentos a serem dragados na resolução CONAMA 344/04 (Cr - 37,3 ug g<sup>-1</sup>; Ni - 18 ug g<sup>-1</sup>) e às concentrações verificadas em sedimentos de outros locais contaminados (Cossu et al. 2000). Apesar disso, os metais fracamente ligados no sedimento são potencialmente biodisponíveis e podem ser um fator aditivo que provocaram efeitos em *C. fluminea*.

A concentração de metais no tecido dos animais é influenciada pela presença e concentração dos mesmos no alimento, no sedimento e na água do local no qual eles estão vivendo e representa a condição do local ao longo do tempo e não apenas no momento da amostragem (Peltier et al. 2008). As concentrações acumuladas variam entre espécies e por isso é importante que haja um cuidado na extrapolação dos dados. Os metais determinados nas brânquias e glândulas

digestivas de *C. fluminea* apresentaram-se em concentrações próximas a encontradas nos tecidos desta mesma espécie em condições controle de outros trabalhos, e apenas o Cr e Cu foram detectados em níveis mais elevados (Tabela 7). Por exemplo, a maior concentração de Cd encontrada no presente trabalho foi 1,67  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco enquanto Peltier et al. (2008) encontraram em organismos controle concentração de 2,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco. Para o Cr, as concentrações observadas por Shoults-Wilson et al. (2009) em organismos controle variou de 1 a 8  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco, considerando-se todo o corpo do animal, valores próximos aos determinados nos tecidos dos animais dos pontos Coleta e Caf do presente estudo. Já nos animais confinados no córrego dos Periquitos as concentrações de Cr em brânquias chegaram a 34  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco e em glândula digestiva 18  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido seco. Apesar disso, foram observadas diferenças significativas entre a concentração de alguns metais nos diferentes pontos estudados. A concentração de Cr, tanto nas brânquias como na glândula digestiva, foi maior nos animais confinados nos pontos do córrego contaminado (Periq1, Periq2 e Periq3) em relação aos pontos Coleta e Caf. O Cr pode ser considerado um potencial contaminante e agente causador de alterações e danos nos bivalves expostos a estes locais e a sua acumulação em tecidos de *C. fluminea* poderia ser utilizado como um biomarcador de exposição ao chorume, considerando-se que biomarcadores são definidos como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções (Depledge et al. 1995), que podem ser medidos dentro de um organismo ou em seus produtos e não no organismo intacto (Gestel e Brummelen 1996) e os biomarcadores de exposição são a detecção ou medida de uma substância exógena ou seu metabólito ou ainda o produto da interação entre o xenobiótico e algum alvo que são medidos dentro de um compartimento do organismo (WHO, 1993).

**Tabela 7** - Comparação entre as concentrações nas brânquias e glândulas digestivas dos metais avaliados no presente trabalho e as concentrações destes metais no tecido de *C. fluminea* em condições controle de outros trabalhos.

Metal	Tecido	Concentração *	Referência
Al	Brânquia	20-189 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	6-84 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	67-185 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Angelo et al. (2007)
Cd	Brânquia	0,2-1,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	0,04-0,33 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	0,59 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Angelo et al. (2007)
	Brânquia	0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec úmido	Legeay et al. (2005)
	Todo corpo	0,1-0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Marie et al. (2006)
	Todo corpo	0,8-2,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Peltier et al. (2008)
	Todo corpo	1-2 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Peltier et al. (2009)
Cr	Brânquia	10-34 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	3-18 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	1-8 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Shoults-Wilson et al. (2009)
Cu	Brânquia	58-133 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	29-101 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	32-38 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Peltier et al. (2008)
	Todo corpo	65-75 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Peltier et al. (2009)
	Todo corpo	24 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Shoults-Wilson et al. (2009)
Ni	Brânquia	1-4 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	0,28-0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	2-3 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Peltier et al. (2009)
Pb	Brânquia	0,20-0,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Glândula digestiva	0,06-0,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Presente trabalho
	Todo corpo	0,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Angelo et al. (2007)
	Todo corpo	0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ tec seco	Shoults-Wilson et al. (2009)

\* A concentração indicada representa o intervalo no qual os valores se mantiveram, ou seja, a menor e a maior concentração observada.

Os três pontos avaliados no córrego contaminado promoveram a mortalidade dos animais de forma diferenciada. No ponto mais próximo da fonte de chorume (Periq1) foi onde ocorreu 100% de mortalidade no menor tempo de exposição, seguido pelo ponto intermediário (Periq2), no qual a mortalidade de todos os bivalves expostos foi observada em 30 dias. Já no ponto mais distante da fonte de poluição (Periq3), foi observado aumento da mortalidade apenas em 30 dias. Os efeitos letais observados estão possivelmente relacionados à intoxicação dos animais, já que não foram observadas baixas concentrações de oxigênio dissolvido ou variações importantes de temperatura e pH. A mortalidade mostrou, assim como

a condutividade elétrica determinada, que ocorrem diluição e deposição de compostos tóxicos ao longo do córrego, promovendo uma depuração natural do mesmo.

A enzima EROD, utilizada como biomarcador, representa indiretamente a atividade de enzimas de biotransformação de Fase I, da família CYP1A. Esta família de citocromo P450 é frequentemente utilizada como biomarcador de exposição de alguns compostos orgânicos, como HPAs, PCBs e dioxinas, principalmente em vertebrados (Van der Oost et al. 2003). Em bivalves, apesar de existirem evidências da existência de proteínas semelhantes a CYP1A (Wootton et al. 1995) e alguns trabalhos mostrarem alterações na atividade da EROD nestes organismos expostos a diferentes compostos (Binelli et al. 2006; Faria et al. 2009; Martín-Díaz et al. 2009), uso deste biomarcador ainda é questionado, pois como afirma Viarengo et al. (2007) depois de duas décadas de extensa busca, nenhum gene de CYP1A foi encontrado no DNA nuclear de moluscos. Nestes animais a atividade da EROD na fração microsomal é baixa ou não detectável e a fração citosólica pode não representar a atividade da CYP1A (Faria et al. 2009). No presente trabalho, a atividade da EROD em *C. fluminea* foi determinada na fração citosólica e apresentou-se baixa, sendo os valores registrados foram, na maioria, menores que  $0,1 \text{ pmol Resorufina min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ .

Entretanto, foram observadas alterações significativas na atividade da enzima nos dois tecidos avaliados. Em brânquias, foi observada uma redução da atividade da EROD no Periq3. A inibição da atividade desta enzima pode trazer consequências para este tecido, já que reduziria sua capacidade de biotransformar compostos planares, tornando o organismo mais susceptível à ação tóxica destes. Em peixes, alguns compostos como metais (Oliveira et al. 2004; Viarengo et al. 1997b), estrógenos (Kirby et al. 2007; Navas e Segner 2000) e alguns fármacos (Beijer et al. 2010) são responsáveis pela inibição da indução da EROD. Além disso, condições como o estresse oxidativo (Barouki e Morel 2001) e o excesso de substratos da enzima (Monari et al. 2009) podem ser responsáveis por essa diminuição. Oliveira et al. (2004) mostraram que o Cr é um dos metais que inibe a atividade da EROD no fígado do peixe *Dicentrarchus labrax*, mesmo quando adicionada glutathione reduzida. No presente estudo, este metal foi detectado em concentrações significativamente maiores nos pontos Periq1, Periq2 e Periq3 em relação aos pontos Coleta e Caf, podendo este ser um dos responsáveis pela

inibição da atividade da EROD. A brânquia é o tecido que está mais exposto ao meio e a concentração de metais neste tecido foi maior que em glândula digestiva, fator que pode justificar a diminuição da EROD apenas neste.

Nas glândulas digestivas de *C. fluminea* observou-se o aumento significativo da atividade da EROD já com 5 dias de exposição em Periq1 e Periq3. A indução da atividade desta enzima indica a presença de compostos no ambiente que são biotransformados na Fase I. No bivalve *Dreissena polymorpha* o aumento da EROD foi observado em animais expostos a poluentes orgânicos persistentes (POPs) (Binelli et al. 2005) e PCBs, como o Aroclor 1260 (Binelli et al. 2006; Faria et al. 2009) e em bivalves *Elliptio complanata* observou-se o aumento da atividade da enzima após injeção de produtos farmacêuticos (Martín-Díaz et al. 2009). Peixes expostos a misturas complexas, como em lagoas de esgoto (Mdegela et al. 2010) ou em áreas urbanas próximas a um aterro (Hanson e Larsson 2011) tiveram a atividade da EROD do fígado aumentada. Assim como no presente trabalho, peixes da espécie *Clarias gariepinus* expostos à determinada lagoa de esgoto apresentou indução da EROD apenas no fígado e não nas brânquias. Este fato foi atribuído à presença de compostos na água que inibem a atividade da enzima nas brânquias, comprometendo o primeiro passo da biotransformação que ocorreria neste tecido, e, com isso, maiores quantidades de indutores da enzima alcançam o fígado (Mdegela et al. 2010). Isto pode ter ocorrido nos bivalves confirmados no Periq3 do córrego dos Periquitos, nos quais foi observado aumento significativo da EROD em glândula digestiva e inibição nas brânquias.

No presente trabalho, ocorreu também a indução da enzima de biotransformação de Fase II, GST, em brânquias e glândula digestiva de *C. fluminea* expostos ao córrego contaminado por chorume. O aumento da atividade da GST, em brânquias e glândula digestiva, foi observado em gastrópodes *Bellamyia purificata* expostos a 1, 5 e 10% de efluente de aterro sanitário (chorume), por período de 2, 7 e 15 dias (Li et al. 2008). Experimentos realizados com bivalves em campo evidenciam maior atividade da GST em locais mais poluídos (Luk'yanova e Ireikina 2011; Souza et al. 2012; Torres et al. 2002), com contaminação por misturas, como por exemplo, esgoto municipal (Gagné et al. 2009; Sáenz et al. 2010). Diversos compostos, como os HPAs (Cheung et al. 2004; Gowland et al. 2002), PCBs (Cheung et al. 2002; Cheung et al. 2004), tributiltin (Le Penne e Le Penne 2003) e metais (Zhang et al. 2012) estimulam a indução da atividade destas enzimas em

bivalves, e podem ser responsáveis pelo aumento da atividade desta enzima observado no presente trabalho.

Além de biotransformar compostos para facilitar a excreção, os animais aquáticos têm mecanismos de resistência que os permitem sobreviver em locais com altas concentrações de poluentes. O MXR é um mecanismo por meio do qual as células podem eliminar xenobióticos do seu interior através de transportadores dependentes de ATP e é considerado a primeira linha de defesa contra xenobióticos, pois evita sua acumulação intracelular. No presente trabalho, foi observada diminuição significativa do MXR em *C. fluminea* mantidos em local contaminado por chorume. Alguns compostos, chamados de *chemosensitizers*, são capazes de inibir a ação deste mecanismo, seja por competição ou inibição não competitiva através do bloqueio da ATPase ou, indiretamente, pelo bloqueio do regulador proteína quinase C (Smital e Kurelec 1998). Foi demonstrado que compostos tais como pesticidas, produtos de higiene pessoal, produtos da degradação microbiana (Smital et al. 2004), Pb (Rocha e Souza 2012) e algumas fragrâncias (Luckenback et al. 2004; Smital et al. 2004) inibem o MXR. Kurelec et al. (1998) mostraram que a inibição deste mecanismo está mais relacionada com a alta concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) presente em extratos de resíduos sólidos de um aterro de resíduos domésticos, do que de resíduos predominantemente industriais. Estes autores sugerem que os compostos orgânicos presentes nestes extratos estariam saturando o MXR e inibindo competitivamente o bombeamento de rodamina no ensaio. O chorume pode apresentar elevadas concentrações de COD, e este também pode ter sido um fator importante para a redução do MXR no presente trabalho.

O estresse oxidativo pode se estabelecer devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total da célula. A capacidade antioxidante se dá por ação conjunta de enzimas, como a catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase e moléculas de pequeno peso molecular como a glutatona reduzida (Hermes-Lima 2004). Estes parâmetros vêm sendo bastante utilizados como biomarcadores em bivalves (Faria et al. 2010; Vidal-Linán et al. 2010; Wang et al. 2012), porém podem apresentar alterações variáveis a agentes estressores, sendo que frequentemente ocorre o aumento de algum parâmetro e diminuição de outro. A avaliação da capacidade antioxidante total permite uma visão mais geral sobre a condição do

organismo ou do tecido e sua susceptibilidade ao estresse oxidativo (Regoli 2000). No presente trabalho, foi observada uma redução da capacidade antioxidante total, principalmente após 1 dia de teste com *C. fluminea* nos pontos do córrego contaminado por chorume, que indica o aumento da susceptibilidade dos animais ao estresse oxidativo. Interessante observar que no ribeirão Cafezal também foi observada uma redução, porém ainda menor que nos pontos do córrego contaminado por chorume. A redução da capacidade antioxidante total contra radicais peróxido também já foi observada em bivalves expostos a benzo(a)pireno (Camus et al. 2002), HPAs e Pb em áreas de porto (Bocchetti et al. 2008) e em locais contaminados (Regoli 2000; Pampanim et al. 2005). A amônia, presente em elevada concentração no chorume e no córrego dos Periquitos, também é capaz de causar alterações em parâmetros de estresse oxidativo de peixes (Ching et al. 2009; Hegazi et al. 2010) e em bivalves foi evidenciada a redução de glutatona reduzida (GSH) decorrente da exposição a amônia (Keppler, 2007).

Com a redução da capacidade antioxidante total, observou-se também em 5 dias de teste, principalmente nas glândulas digestivas, o aumento da geração de ERO. A formação destas espécies reativas de O<sub>2</sub> pode aumentar em animais expostos a poluentes por meio de diferentes mecanismos, tais como o ciclo redox, reações redox de metais de transição (Co, Cr, Ni, Va) com O<sub>2</sub> e outras ERO, indução de enzimas de biotransformação, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons por contaminantes lipofílicos ou íons metálicos e pelo comprometimento das defesas antioxidantes (Livingstone 2003). Dois fatores observados no presente trabalho podem estar relacionados ao aumento de ERO observado em 5 dias, a redução da capacidade antioxidante e o aumento significativo de acúmulo de Cr já no teste de 1 dia.

O excesso de ERO pode provocar danos como a lipoperoxidação de membranas, quebras no DNA e desestruturação de proteínas. Nos bivalves expostos ao córrego contaminado por chorume, não foi possível estabelecer uma relação entre o aumento de ERO e o aumento de lipoperoxidação, apesar deste ter sido observado. No presente trabalho, foi observada diminuição da capacidade antioxidante total e redução do MXR em ambos os tecidos, além da redução da EROD em brânquias. Estes resultados indicam que os bivalves expostos ao córrego contaminado por chorume estão com suas defesas comprometidas, ocorrendo o acúmulo de ERO e possível acúmulo de xenobióticos no interior da célula. Danos no

DNA também podem ocorrer pela ação de ERO ou ação direta de xenobióticos. Foi observado o aumento no escore de danos no ensaio do cometa na hemolinfa de *C. fluminea* expostos ao córrego contaminado a partir de 15 dias de teste. Apesar deste biomarcador ter sido analisado em outro tecido, pode-se esperar um possível comprometimento também nos parâmetros de defesa de hemócitos.

O aumento da metalotioneína em *C. fluminea* em Periq2 e Periq3 pode estar relacionado com o aumento de cromo nas brânquias destes bivalves. Um resultado não esperado foi o aumento da metalotioneína no ribeirão Cafezal. É importante dizer que o experimento realizado no ribeirão Cafezal foi feito no mês de julho/2010, enquanto os experimentos no córrego dos Periquitos foram realizados no mês de abril/2010. Sabe-se que os parâmetros biológicos avaliados em animais aquáticos podem variar nas diferentes estações do ano, devido a fatores como temperatura e disponibilidade de alimentos (Baudrimond et al. 1997). Observa-se também a variação inesperada de outros parâmetros no ribeirão Cafezal, como a elevada atividade da EROD nas brânquias, em 1 dia de teste, e redução da CAO e aumento de ERO em relação ao ponto Coleta. O aumento da metalotioneína é comumente relacionado ao aumento da concentração de metais como o cádmio, chumbo, cobre e zinco. O cobre e o zinco são metais essenciais para os organismos, que estão presentes independentemente de contaminação do ambiente. Estes são importantes no metabolismo celular, pois participam de processos e são componentes importantes de proteínas. Estes quando em altas concentrações podem causar danos às células. O cádmio e o chumbo, por sua vez, são metais não essenciais que mesmo em baixas concentrações podem causar danos às células dos animais expostos a eles.

O cromo é um metal essencial, mas que também pode ser tóxico. Este foi o metal que apresentou relação com o aumento de metalotioneína nas brânquias de *C. fluminea*. Aumento da metalotioneína relacionado ao cromo já foi evidenciado em truta arco-íris (Roberts e Oris 2004) e ratos (Solis-Heredia et al. 2000), por exemplo. A ação do cromo no aumento da metalotioneína ainda não é bem esclarecida. Outra possibilidade de relação do cromo com o aumento da metalotioneína seria devido a sua potencial promoção de geração de ERO intracelular, que ocorre quando o Cr(VI) é internalizado e reduzido para Cr(III) (Roberts e Oris 2004), considerando que as metalotioneínas também tem potencial antioxidante (Viarengo et al. 1999) contra os radicais hidroxil e ânion superóxido

(Amiard et al. 2006). A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil reduziu nos bivalves após 1 dia de exposição *in situ* ao chorume, porém neste mesmo período o conteúdo de MT já estava aumentado. Isto pode justificar a manutenção de quantidade de ERO em níveis normais nas brânquias nos primeiros tempos experimentais e seu aumento apenas após exposição prolongada.

### 3.5 CONCLUSÃO

Os testes *in situ* realizados com *C. fluminea* em córrego contaminado por chorume mostraram que os contaminantes presentes neste meio causaram efeitos nestes organismos, bem como a estimulação de algumas defesas, como o aumento de enzimas de biotransformação. Os efeitos letais foram maiores no ponto mais próximo do aterro, porém a diluição natural deste córrego não garantiu que efeitos subletais não ocorressem. O aumento do metal Cr no tecido dos bivalves confinados no córrego contaminado por chorume foi um resultado interessante e sugere que este metal possa ter sido responsável por algumas alterações nos biomarcadores destes animais, bem como o acúmulo tecidual de Cr pode também ser utilizado como biomarcador de exposição para a situação estudada. Dentre os biomarcadores avaliados no presente estudo aqueles que apresentaram melhores resultados foram as enzimas de Fase I e II de biotransformação (EROD; GST), que aumentaram significativamente nos testes de 5 e/ou 15 dias realizados no córrego dos Periquitos, o aumento da geração de ERO em glândula digestiva e redução da capacidade antioxidante total foram bons biomarcadores, pois apresentaram alterações nos menores tempos de teste 5 e 1 dia, respectivamente, e estas foram observadas nos três pontos do córrego contaminado por chorume. Por último, o ensaio do cometa apresentou um bom resultado, no qual foi observado aumento do escore de danos a partir de 15 dias de exposição ao córrego, que é mantido em 30 dias. Os biomarcadores são ferramentas que indicam de forma rápida e eficiente a toxicidade de contaminantes em organismos aquáticos e os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento e diluição realizados no chorume em questão são insuficientes e que em longo prazo este efluente pode causar prejuízos e danos irreversíveis às populações.

**AGRADECIMENTOS**

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida para L.F. Oliveira e ao CNPq pela bolsa de pesquisador para C.B.R. Martinez, que é membro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5). Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado L.F. Oliveira.

## Referências

Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monsserat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407:2115-2123.

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202.

Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R, Baptista DF (2007) Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12:61–72.

Angelo RT, Cringan MS, Chamberlain DL, Stahl AJ, Haslouer SG, Goodrich CA (2007) Residual effects of lead and zinc mining on freshwater mussels in the Spring River Basin (Kansas, Missouri, and Oklahoma, USA). *Sci Total Environ* 384:467–496.

Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48:357–389.

Barouki R, Morel Y (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacology* 61:511–516.

Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Métivand J, Boudou A (1997) Seasonal variations of metallothionein concentrations in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 118:361–367.

Beijer K, Abrahamson A, Brunström B, Brandt I (2010) CYP1A inhibition in fish gill filaments: A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquat Toxicol* 96:145–150.

Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2005) Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere* 61:1074–1082.

Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2006) New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62:510–519

Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Marcchia S, Oliviero L, Pilato F, Pallegriani D, Regoli F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour áreas. *Aquat Toxicol* 89:257–266.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Camejo G, Wallin B, Enojärvi M (1998) Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong D (ed) *Free radical and antioxidants protocols*. Humana Press, New Jersey, pp.377-387.
- Camus L, Jones MB, Børseth JF, Grøsvik BE, Regoli F, Depledge MH (2002) Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Mar Environ Res* 54:425–430.
- Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS (2004) Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ Pollut* 128:393-403.
- Cheung CCC, Zheng PKS, Lam PKS, Richardson BJ (2002) Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar Pollut Bull* 45:181-191.
- Ching B, Chew SF, Wong WP, Ip YK (2009) Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). *Aquat Toxicol* 95:203-212.
- Christensen TH, Kjeldsen P, Bjerg PL, Jensen DL, Christensen JB, Baun A, Albrechtsen H, Heron G (2001) Biochemistry of landfill leachate plumes. *Appl Geochem* 16:659-718.
- Cossu C, Doyote A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox Environ Safe* 45:106-121.
- Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, Van Veld PA (1995) Biochemical mechanisms: Metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand GM (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* 2nd ed. Taylor & Francis, Washington, pp.523-562.
- Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C (2009) Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 149:281–288.
- Eggens ML, Galgani F (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. *Mar Environ Res* 33:213-221.

Faria M, Huertas D, Soto DX, Grmalt JO, Catalan J, Riva MC, Barata C (2010) Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78:232–240.

Fedato RP, Simonato JD, Martinez CBR, Sofia SH (2010) Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat Res* 700:80–85.

Freitas R, Costa E, Velez C, Santos J, Lima A, Oliveira C, Rodrigues AM, Quintino V, Figueira E (2012) Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the polychaete *Diopatra neapolitana*. *Ecotox Environ Safe* 75:109–118.

Gagné F, Blaise C, Pallerin J, Fournier M, Gagnon C, Sherry J, Talbot A (2009) Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: The effects of clam bed distance from the shore. *Sci Total Environ* 407:5844–5854.

Gestel CAM, Brummelen TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5:217–225.

Goldberg ED (1975) The mussel watch: A first step in global marine monitoring. *Mar Pollut Bull* 6:111–132.

Gowland BTG, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L (2002) Implications from field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar Environ Res* 54:231–235.

Hanson N, Larsson A (2011) Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. *Environ Toxicol.* 26:315–324.

Hegazi MM, Attia ZI, Ashour OA (2010) Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquat Toxicol* 99:118–125.

Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Storey KB *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley and Sons, New York, pp.319–368.

Hodgson E, Das PC, Cho TM, Rose RL (2008) Phase I Metabolism of toxicants and metabolic interactions. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.173–204.

Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 20:6183–6188.

Keppler CJ (2007) Effects of ammonia on cellular biomarker responses in oysters (*Crassostrea virginica*). *Bull Environ Contam Toxicol* 78:63–66.

- Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I (2007) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81:233–244.
- Kulikouska D, Klimiuk E (2008) The effect of landfill age on municipal leachate composition. *Bioresour Technol* 99:5981–5985.
- Kurelec B, Britvić S, Pivčević B, Smital T (1998) Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. *Mar Environ Res* 46:415–419.
- Kurelec B, Smital T, Piveeviaë B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307–327.
- Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau J, Bourdineaud J (2005) Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 74:242–253.
- Large AT, Shaw JP, Peters LD, McIntosh AD, Webster L, Mally A, Chipman JK (2002). Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic fields and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54:493–497.
- Le Pennec G, Le Pennec M (2003) Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat Toxicol* 64:131–142.
- Livingstone DR (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Méd Vét* 154: 427–430.
- Li X, Lin L, Luan T, Yang L, Lan C (2008) Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A in glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snails *Bellamya purificata*. *Chemosphere* 70:1903–1909.
- Luckenbach T, Corsi I, Epel D (2004) Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Mar Environ Res* 58:215–219.
- Luk`yanova ON, Ireikina SA (2010) Glutathione-S-transferase as a molecular biomarker of the state of marine organisms influenced by anthropogenic pressure. *Biol Bull* 38:386–392.
- MacKenzie EL (2008) Reactive Oxygen/Reactive Metabolites and Toxicity. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.389–412.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A (2006) Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65:609–617.

- Martín-Díaz ML, Gagné F, Blaise C (2009) The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:237–242.
- Mdegela RH, Braathen M, Mosha RD, Skaare JU, Sandvik M (2010) Assess of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. *Ecotoxicology* 19:722-734.
- Monari M, Foschi J, Matozzo V, Marin MG, Fabbri M, Rosmini R, Serrazanetti GP (2009) Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and theirs role in response to B[a]P. *Comp Biochem Physiol C* 149:382-392.
- Morcillo Y, Porte C (1997) Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat Toxicol* 38:35-46.
- Mozeto AA (2000) Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas. In: Bicudo CEM, Bicudo DC (eds) Workshop de Amostragem em Limnologia, Campos do Jordão, 1999. No prelo.
- Navas JM, Segner H (2000) Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar Environ Res* 50:157–162.
- O'Connor TP (2002) National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research* 53:117–143.
- Oliveira M, Santos MA, Pacheco M (2004) Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L.. *Ecotox Environ Safe* 58:379–385.
- Oygard JK, Mage A, Gjengedal E (2004) Estimation of the mass-balance of elected metals in four sanitary landfills in Western Norway, with emphasis on the heavy metal content of the deposited waste and the leachate. *Water Res* 38:2851–2858.
- Pampanin DM, Camus L, Gomiero A, Marangon I, Volpato E, Nasci C (2005) Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar Pollut Bull* 50:1548–1557.
- Peltier GL, Meyer JL, Jagoe CH, Hopkins WA (2008) Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. *Environ Pollut* 154:283 e 290.
- Peltier GL, Wright MS, Hopkins WA, Meyer JL (2009) Accumulation of trace elements and growth responses in *Corbicula fluminea* downstream of a coal-fired power plant. *Ecotox Environ Safe* 72:1384–1391.
- Regoli F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 50:351–361.

Roberts AP, Oris JT (2004) Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 138:221–228.

Rocha CT, Souza MM (2012) The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:56–67.

Sáenz LA, Seibert EL, Zanette J, Fiedler HD, Curtius AJ, Ferreira JF, Almeida EA, Marques MRF, Bainy ACD (2010) Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxcol Environ Safety* 73:796-804.

Sisinno CLS, Moreira JC (1996) Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 12: 515-523.

Shoults-Wilson WA, Peterson JT, Unrine JM, Rickard J, Black MC (2009) The asian clam *Corbicula fluminea* as a biomonitor of trace element contamination: accounting for different sources of variation using an hierarchical linear model. *Environ Toxicol Chem* 28:2224–2232.

Smital T, Kurelec B (1998) The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat Res* 399:43–53.

Smital T, Luckenbach T, Sauerborn R, Hamdoun AM, Veja RL, Epel D (2004) Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat Res* 552:101–117.

Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra-Santoyo A, Hernández JM, Brambila E, Cebrián ME, Alboras A (2000) Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicology* 142:111–117.

Souza DSM, Ramos APD, Nunes FF, Moresco V, Taniguchi S, Leal DAG, Sasaki ST, Bicego MC, Montone RC, Durigan M, Teixeira AL, Pilotto MR, Delfino N, Franco RMB, Melo CMR, Bainy ACD, Barardi CRM (2012) Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicol Environ Safety* 76:153-161.

Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JCM, Svendsen C, Swain S, Sturzenbaum SR (2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ* 408:3725-3734.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Torres MA, Testa CP, Gáspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm Filho D (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollut Bull* 44:923-932.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149.

Viarengo A, Bettella E, Fabbri R, Burlando B, Lafaurie M (1997b) Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar Environ Res* 44:1-11.

Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 277:1612:1619.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri F (1997a) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar Environ Res* 44:69-84.

Vidal-Liñán L, Bellas J, Campillo JÁ, Beiras R (2010) Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78:265–272.

Wang Z, Yan C, Vulpa CD, Yan Y, Chi Q (2012) Incorporation of *in situ* exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. *Mar Pollut Bull* 64:90–98.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufina-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30:347-570.

Wootton NA, Herring C, Spry JA, Wiseman A, Livingstone DR, Goldfarb OS (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression. (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. *Mar Environ Res* 39:21-26.

Zhang L, Qiu L, Wu H, Liu X, You L, Pei D, Chen L, Wang Q, Zhao J (2012) Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp Biochem Physiol C* 155:517-527.

Zhang Y, Song J, Yuan H, Xu Y, He Z, Duan L (2010) Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentration of lead, mercury, cooper. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:19-25.

## 4 CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHORUME DE ATERRO DOMÉSTICO EM BIVALVES POR MEIO DO USO DE BIOMARCADORES<sup>3</sup>

Luciana F. Oliveira<sup>4</sup>; Marcelo T. Oliveira<sup>5</sup>; Ilce M. S. Cólus<sup>3</sup>; Cláudia B. R. Martinez<sup>26</sup>

### Resumo

O chorume formado em aterros domésticos apresenta em sua composição diversos tipos de contaminantes e pode provocar efeitos tóxicos em organismos aquáticos. Esta toxicidade pode ser avaliada por meio do uso de biomarcadores. Bivalves dulcícolas da espécie *Corbicula fluminea* foram expostos a quatro diluições (50X, 32X, 18X e 10X) de chorume bruto de um aterro doméstico para verificar a toxicidade deste sobre estes animais. Como biomarcadores foram avaliados a atividade das enzimas de biotransformação 7-Etoxiresorufina O-deetilase (EROD) e Glutathione S transferase (GST), o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) e lipoperoxidação (LPO) em brânquias e glândulas digestivas, o conteúdo de metalotioneínas (MT) em brânquias, danos no DNA dos hemócitos e ainda a expressão dos genes da GST e MT em brânquias. O chorume provocou a ocorrência de LPO, redução da EROD em brânquias e redução do MXR destes animais. Além disso, promoveu o aumento da EROD e GST nas menores diluições (10X e 18X) e aumento de MT na maior diluição (50X), indicando a presença de compostos que estimulam a indução de tais parâmetros. Os biomarcadores utilizados neste trabalho evidenciaram que mesmo a maior diluição testada (50X) foi suficiente para provocar efeitos tóxicos nos bivalves, resultado que mostra que esta não é segura para estes organismos.

**Palavras-chave:** Biotransformação. *Corbicula fluminea*. Ensaio do cometa. Lipoperoxidação. Metalotioneína. Expressão gênica.

### 4.1 INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos são utilizados para monitorar a qualidade de recursos hídricos e efluentes e o efeito dos contaminantes nestes organismos pode ser avaliado por meio de testes de toxicidade, nos quais parâmetros em nível de organismo ou sub-organismo são utilizados. Os biomarcadores são alterações

---

<sup>3</sup> Manuscrito a ser submetido para o periódico Ecotoxicology

<sup>4</sup> Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, UEL -Londrina/PR

<sup>5</sup> Departamento de Biologia Geral, UEL - Londrina/PR

<sup>6</sup> \*Autor para correspondência: Tel.: +55-43-33714650 Fax: +55-43-33714207 E-mail: [cbueno@uel.br](mailto:cbueno@uel.br)

biológicas que os organismos expressam diante de um poluente (Sarkar et al. 2006) e podem ser definidos como variações induzidas por contaminantes em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (Depledge et al. 1995).

O chorume é uma mistura complexa produzida em decorrência da decomposição do lixo que contém matéria orgânica dissolvida, macrocomponentes orgânicos, elemento traço, compostos orgânicos xenobióticos e outros componentes em baixas concentrações (Christensen et al. 2001). A avaliação da toxicidade do chorume é difícil dada sua composição complexa e bastante variável, mas já foi realizada por meio de testes agudos de toxicidade em microalgas, microcrustáceos, bactérias e outros, avaliando-se como mortalidade, inibição de crescimento e inibição da luminescência (Bernard et al. 1996). O uso de biomarcadores para avaliação da toxicidade do chorume foi empregado poucas vezes. Deguthi et al. (2007) mostraram que o chorume pode causar alterações em parâmetros genéticos do peixe *Carassius auratus* por meio do ensaio do cometa e teste do micronúcleo. Neste caso, a exposição ao chorume bruto causou maior genotoxicidade e mutagenicidade nos tecidos avaliados em relação ao chorume tratado. Parâmetros de estresse oxidativo também já foram avaliados no gastrópode *Bellamyia purificata* após exposição ao chorume, e foi observado aumento da atividade da enzima Glutathione S transferase e redução da concentração de glutathione total de forma dose-dependente (Li et al. 2008).

Diversos biomarcadores podem ser utilizados para avaliação da toxicidade do chorume. Por exemplo, as três fases da biotransformação de xenobióticos podem sofrer alterações devido à presença de contaminantes. Dentre os parâmetros de biotransformação que podem ser avaliados estão a 7-Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é utilizado como medida indireta da atividade catalítica da família CYP1A do citocromo P450, envolvidos na Fase I (Whyte et al. 2000), a atividade da enzima de fase II, Glutathione S transferase (GST) (Hodgson et al. 2008) e o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), responsável pela eliminação de xenobióticos na fase III de biotransformação (Bard 2000). Além disso, o estabelecimento do estresse oxidativo, devido ao aumento de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou redução da capacidade antioxidante, frequentemente está relacionado com a ação tóxica de contaminantes orgânicos ou inorgânicos. Os danos causados pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de

lipoperoxidação tecidual (Wilhelm Filho 1996). A metalotioneína (MT) é um biomarcador frequentemente utilizado e o seu aumento é geralmente relacionado ao aumento ou presença de metais (Amiard et al. 2006). A indução da metalotioneína também ocorre por outros compostos químicos e estressores, principalmente agentes oxidantes, já que esta apresenta um papel de antioxidante (Viarengo et al. 1999). Um dos efeitos observados em organismos aquáticos expostos a contaminação é o dano genético. Os contaminantes presentes no meio aquático podem ser classificados como genotóxicos, quando produzem alterações na molécula de DNA de animais expostos a concentrações subletais (Shugart 1995). Danos no DNA podem ser quantificados por meio do ensaio do cometa (Tice et al. 2000), cuja versão permite a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítios alcalilábeis e *crosslinks* (Silva et al. 2003).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do chorume de aterro doméstico para o bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* por meio de biomarcadores de exposição e efeito e verificar se as diluições testadas são ou não seguras para estes organismos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Desenho Experimental

Bivalves da espécie *Corbicula fluminea* ( $n = 100$ ), medindo  $3,09 \pm 0,06$  cm de comprimento e  $2,74 \pm 0,06$  cm de altura (média  $\pm$  EP), foram coletados em um lago urbano (Igapó III) no município de Londrina (PR) e transferidos para o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde foram mantidos em aquário contendo água limpa e aerada por sete dias para aclimação. Após este período os animais foram expostos em laboratório por 5 e 15 dias, apenas à água limpa (condição controle ou CTR) ou a diferentes diluições de chorume bruto obtido do aterro controlado do município de Londrina, cedido pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo, da UEL. Os bivalves foram expostos em recipientes de vidro (1 L) a quatro diluições do chorume: 50, 32, 18, 10 vezes. Em cada recipiente foram colocados 10 indivíduos.

#### 4.2.2 Amostragem

Após os períodos de experimento (5 e 15 dias), a hemolinfa dos bivalves foi retirada do músculo adutor anterior, com auxílio de seringas de 1 mL, para realização do ensaio do cometa. Na sequência, os animais foram mortos através do rompimento deste músculo. As brânquias e glândulas digestivas foram removidas com auxílio de pinça e tesoura, e estes tecidos foram utilizados para análise de diferentes parâmetros. É importante esclarecer que a glândula digestiva não é facilmente diferenciada dos tecidos adjacentes, e por isso a denominação de glândula digestiva utilizada no presente trabalho refere-se ao tecido glandular e tecidos adjacentes. Os tecidos foram congelados em  $-72^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises dos biomarcadores.

#### 4.2.3 Biomarcadores

As brânquias e glândulas digestivas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7) e posteriormente centrifugadas (15600 g; 20 minutos;  $4^{\circ}\text{C}$ ), para os procedimentos de determinação da 7-Etoxiresorufina-O-deetilase, Glutathione S transferase e lipoperoxidação. Para os demais biomarcadores foram utilizadas soluções específicas que serão descritas separadamente. O sobrenadante foi utilizado e quando necessário armazenado em ultrafreezer ( $-72^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises.

##### 4.2.3.1 7-Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; pH 7,6; NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-7-Etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 30 minutos (ex/em: 530/590nm). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina  $\text{minuto}^{-1}$   $\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ , baseada em uma curva padrão de resorufina.

#### 4.2.3.2 *Glutathione S transferase (GST)*

A atividade da GST foi determinada através do método descrito por Keen et al. (1976). Este método se baseia na conjugação, catalisada pela GST, da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDNB conjugado  $\text{minuto}^{-1}$  mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.3 *Ensaio de acúmulo de Rodamina*

O ensaio de acúmulo do fluorescente rodamina B (substrato de P-gp) foi realizado de acordo com Kurelec et al. (2000) para avaliação do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR). Neste ensaio, o aumento do acúmulo do fluorescente representa uma redução do MXR. As brânquias e glândulas digestivas foram mantidas *ex vivo* em solução de 2,5  $\mu\text{M}$  do fluorescente rodamina B por um período de 2 horas. Após este período, os tecidos foram lavados em solução salina (26 mM NaCl; 4,3 mM Sacarose; pH 7,4), homogeneizados em água destilada (1:7 - m/v) e centrifugados (1700 g; 7 minutos; 4°C). A fluorescência referente ao acúmulo de rodamina foi medida (ex/em: 544/590 nm) e as concentrações determinadas através de uma curva padrão de rodamina, sendo os dados expressos em  $\mu\text{M}$  de rodamina mg de tecido úmido<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.4 *Lipoperoxidação (LPO)*

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizado de acordo com Camejo et al. (1998) como medida de lipoperoxidação. Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2mM KCl; 1,4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 357mM NaCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.5 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa com hemócitos foi realizado segundo Tice et al. (2000), com modificações de Fedato et al. (2010). Amostras de hemolinfa dos animais foram coletadas do músculo adutor posterior de cada indivíduo, utilizando-se uma seringa de 1 mL e obtendo-se cerca de 500 uL de hemolinfa por animal amostrado. Durante todo o período de amostragem, as amostras de hemolinfa coletadas foram mantidas em um recipiente com gelo.

A hemolinfa foi misturada a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e então, espalhada sobre lâminas histológicas, previamente preparadas com um filme de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Estas lâminas preparadas permaneceram por 30 minutos sobre refrigeração (4°C), e tiveram suas lamínulas retiradas. Feito isto, as lâminas ficaram submersas por no mínimo uma hora em solução de lise (1 mL Triton X-100, 10 mL DMSO, q.s.p. 100 mL SLE) preparada a partir de uma solução de lise estoque (SLE): NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM. Em seguida, as lâminas foram postas em cuba de eletroforese sob tampão em condição alcalina (pH>13), onde as lâminas de hemolinfa, antes da corrida de eletroforese, permaneceram por 30 minutos, e para as lâminas com células da brânquia, 40 minutos, para que as moléculas de DNA relaxassem e desnaturassem. A corrida de eletroforese (20 min) ocorreu em 300 mA, 25V (1V.cm<sup>-1</sup>) e depois as lâminas foram neutralizadas com um tampão de neutralização (Tris 0,4 M) com três banhos de 5 minutos cada.

As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e mantidas sob-refrigeração até análise citológica. Após serem coradas com GelRed, as lâminas foram codificadas e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 nucleóides por animal e cada nucleóide analisado recebeu uma classificação de acordo com o dano: classe 0 = ausência de cauda do cometa, classe 1 = cauda do cometa menor que o diâmetro do nucleóide, classe 2 = cauda do cometa maior que o diâmetro do nucleóide e classe 3 = cauda do cometa maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) será multiplicado pelo valor de cada classe e o escore será calculado pela fórmula: (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD), em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o escore total para as células analisadas pode variar de 0 (dano mínimo = nenhuma

célula danificada) a 300 (dano máximo = todas as células apresentam dano de classe 3).

#### 4.2.3.6 Metalotioneína (MT)

O conteúdo de metalotioneínas foi determinado apenas nas brânquias segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997a) com modificações. São quantificadas proteínas semelhantes à metalotioneínas (*MT-like*), que serão tratadas no presente trabalho como metalotioneínas (MT). As brânquias foram homogeneizadas (1:5 - m/v) em tampão (Sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM, p-mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugadas por 45 minutos (21300 g; 4 °C), e o sobrenadante foi submetido a fracionamento etanol/clorofórmio ácido para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutatona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em nmol de GSH mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.7 Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com soro albumina bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

#### 4.2.3.8 Expressão gênica de Glutathione S transferase (*piGST*) e metalotioneína (MT)

As análises de expressão gênica foram realizadas apenas no experimento de 5 dias e diluição de 50X no tecido branquial. Pretende-se realizar a análise referente às outras diluições, tempo e tecido, e por isso o que será apresentado aqui se trata de dados preliminares.

### *Extração do RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)*

Após o experimento de 5 dias de exposição à diluição de 50X, as brânquias de *C. fluminea* foram dissecadas e imediatamente submetidas à extração do RNA total pelo emprego do reagente TRIzol® (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante, com algumas modificações: 1 ml de Trizol e 5 pérolas de vidro foram adicionadas as amostras em microtubos de 1,5 ml. As amostras foram então submetidas à homogeneização em aparelho tipo Vórtex por 01 minuto, congeladas em nitrogênio líquido e subseqüentemente a nova agitação em aparelho tipo Vórtex por 3 minutos para lise celular. O volume foi então transferido para um novo microtubo de 1,5 ml (separação do tecido remanescente) e incubado em repouso entre 15°C a 30°C (temperatura ambiente) por um período de 05 minutos em ambiente protegido da luz (dissociação de complexos nucleoproteicos). Em seguida, foi adicionado 200 µl de clorofórmio. As amostras foram então homogeneizadas em Vortex por 10 segundos e deixadas em repouso por adicionais 10 segundos (este procedimento foi repetido 3 vezes). As amostras foram submetidas à incubação em repouso entre 15°C - 30°C por 15 minutos, agitando a amostra em aparelho tipo Vortex a cada 3 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 20 minutos e a fase aquosa obtida foi transferida (apenas 400 µL) para um novo microtubo. As amostras foram então tratadas com soluções de (fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico) (25:24:1) e Clorofil (clorofórmio/álcool-isoamílico) (24:1) em centrifugações subseqüentes nas mesmas condições descritas anteriormente. Após estes processos, procedeu-se a precipitação e eluição do RNA total de acordo com as instruções do fabricante.

A qualidade e quantidade do RNA foram avaliadas em eletroforese de gel de agarose e por espectrofotometria. A transcrição reversa foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research) a partir do RNA total, utilizando Oligo dT (Invitrogen) e as enzimas M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e RNaseOUT (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa, foram realizadas 3 reações distintas de síntese de cDNA para cada experimento, cujo produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada uma das amostras. Os cDNAs sintetizados foram posteriormente quantificados por espectrofotometria.

*PCR em tempo real*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Tabela 8) foram desenhados empregando o software Gene Runner 3.05 (<http://www.generunner.com>). As seqüências dos genes B-actina (ACT), pi-Glutationa S transferase (piGST) e metalotioneína (MT) foram obtidas a partir de regiões específicas de cada gene descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)): gi|134035961|gb|EF446608.1| *Corbicula fluminea* beta actin mRNA; gi|121544227|gb|EF185126.1| *Corbicula fluminea* metallothionein mRNA; gi|60460482|gb|AY885667.1| *Corbicula fluminea* glutathione S transferase pi-class mRNA). Os 3 pares de oligonucleotídeos referentes aos genes ACT (gene de referência), piGST e MT foram desenhados com temperatura de *melting* ( $T_m$ ) entre 56°C e 58°C. Os oligonucleotídeos, quando analisado com ele mesmo e seu par, não apresentaram *hairpin loops*, dímeros, *bulge loops* ou *internal loops* de acordo com a análise do programa. Apenas um único dímero formado entre os dois *primers* do gene MT quando confrontados um com o outro (4 bases  $T_m$ :-111.1 dG:0.2) e um único dímero formado entre os dois *primers* do gene ACT quando confrontados um com o outro (3 bases  $T_m$ :-111.6 dG:0.3). A especificidade de cada oligonucleotídeo foi avaliada com o auxílio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e posteriormente pela análise da curva de fusão de cada produto de amplificação.

Os dados referentes à expressão dos genes ACT, piGST e MT foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema detector de fluorescência Chromo 4™ Four-Color Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EUA), acoplado ao termociclador PTC-200 (*MJ Research*). Para tal, foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UGG (Invitrogen Inc. EUA), seguindo as instruções do fabricante, utilizando como molde 5 ul de uma diluição 1:20 do produto de cDNA (~5 ng) de cada isolado em suas respectivas condições de tratamento. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 95°C por 5 minutos; 40 repetições de um ciclo de 94°C (desnaturação) por 30 segundos, 58°C (anelamento) por 01 minuto e 72°C (extensão) por 20 segundos, e uma extensão adicional final de 72°C por 2 minutos. A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando que apenas o produto de interesse tenha sido amplificado em cada

reação, através da curva de fusão, variando-se a temperatura de 50 °C a 98 °C em 0,5 °C/2 segundos. As reações foram realizadas em triplicata mecânica e em todos os experimentos foram utilizados controles sem material genético (branco), os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos para excluir ou detectar qualquer tipo de contaminação ou irregularidade. Para a análise foram utilizados dados obtidos a partir de 2 organismos controles e 4 organismos submetidos ao tratamento e foram realizadas 2 reações para verificar a reprodutibilidade dos dados.

Os dados foram previamente analisados através do MJ Opticon Monitor™ Analysis Software (MJ Research) para determinação do CP (*crossing point*) de cada reação e suas respectivas eficiências de amplificação. Foram considerados apenas valores de CP com uma variação de  $\pm 0,5$  entre as triplicas de reação. Os valores obtidos na situação controle foram utilizados como referência para comparação, e os cálculos foram normalizados a partir do gene de referência ACT. Para determinação da expressão relativa dos genes de estudo nas diferentes condições avaliadas foi utilizado programa REST (Relative expression software tool) (QIAGEN), desenvolvido por Pfaffl et al. (2002), baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real (Pfaffl 2001). Os dados foram analisados selecionando-se o modo REST RG.

**Tabela 8** - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (forward e reverse) desenhados para amplificação dos genes de B-actina (ACT), pi-Glutationa S transferase (piGST) e metalotioneína (MT) e o tamanho dos produtos amplificados.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5' → 3')	Tamanho
ACT forward	GCTACGAACTCCCCGAC	103 pb
ACT reverse	CCAGCAGATTCCATACCG	
piGST forward	AAGCAACACCGAATCTACGA	134 pb
piGST reverse	GCCTCCAACATCTATCTCT	
MT forward	ACCGAGAAGACAGCAAGAC	107 pb
MT reverse	GCACCCACTCTCCGCAG	

#### 4.2.4 Análise Estatística

Foi utilizada análise de variância paramétrica (ANOVA), seguido por um teste de comparações múltiplas (Teste de Newman-Keuls), quando indicado, para avaliação da existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as diferentes condições experimentais (CTR X 50x X 32x X 18x X 10x), em cada tempo experimental (5 e 15 dias).

Para as análises de expressão gênica, o programa REST foi empregado para avaliar quais genes apresentaram expressão diferencial (indução ou repressão significativa em relação ao grupo controle). O programa utiliza o modelo estatístico denominado Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl et al. 2002).

#### 4.3 RESULTADOS

Bivalves da espécie *C. fluminea* foram expostos por períodos de 5 e 15 dias a quatro diluições do chorume de um aterro doméstico (50, 32, 18 e 10X). As condições de temperatura ( $17,4 \pm 0,2$  °C) e oxigênio dissolvido ( $7,0 \pm 0,1$  mg mL<sup>-1</sup>) se mantiveram iguais nos diferentes experimentos, porém ocorreu variação na condutividade e pH (Tabela 9). Nos experimentos realizados ocorreu mortalidade de 17% dos indivíduos nas diluições de 18X, 32X e 50X, em 5 dias e 8% nas diluições de 18X e 50X e 100% na diluição de 10X, em 15 dias.

Apesar de não ter sido um resultado sistematizado, foi possível perceber que, logo nos primeiros dias de exposição, os animais dos grupos 18X e 10X apresentaram o comportamento de fechamento das valvas com uma porção do pé exposta e enrijecida.

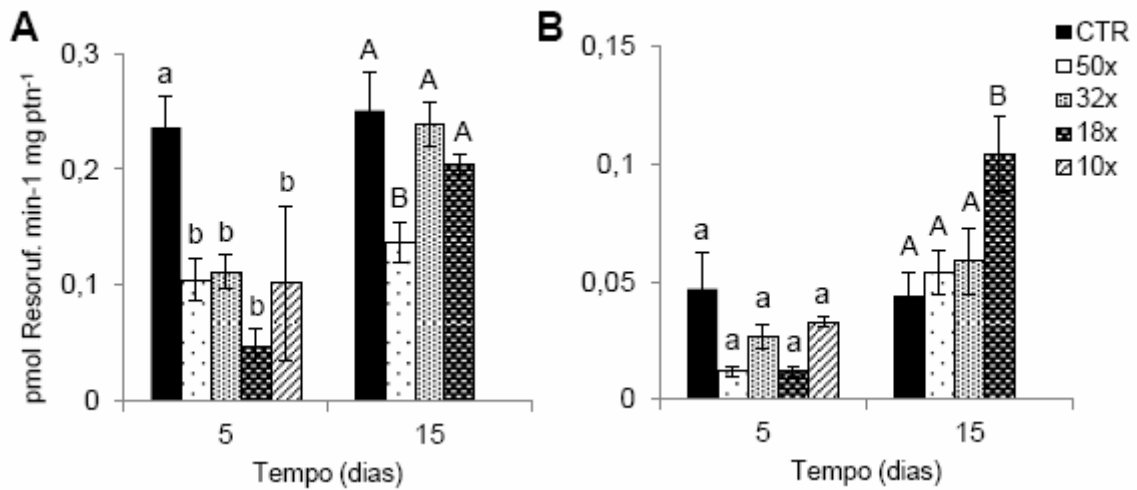
**Tabela 9** - Condutividade e pH dos meios CTR e experimentais aos quais *C. fluminea* foram expostos.

Condições	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	pH
CTR	72,8 $\pm$ 3,8 a	7,1 $\pm$ 0,2 a
50x	236,8 $\pm$ 9,2 b	7,8 $\pm$ 0,2 a
32x	279,4 $\pm$ 9,9 b	7,8 $\pm$ 0,2 a
18x	383,2 $\pm$ 25,6 c	7,9 $\pm$ 0,2 b
10x	665,0 $\pm$ 29,7 d	8,0 $\pm$ 0,1 b

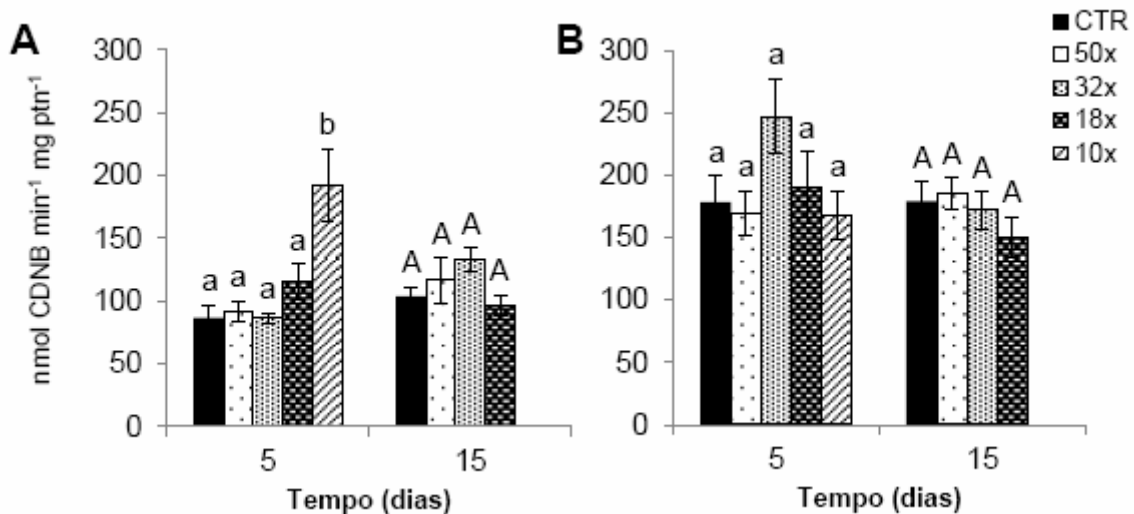
Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições ( $P < 0,05$ ).

Alguns biomarcadores foram analisados para verificar possíveis diferenças entre os animais expostos ao chorume e aqueles expostos apenas à água limpa (CTR). Foram avaliados três parâmetros relacionados às diferentes fases da biotransformação de xenobióticos, a EROD (Fase I), GST (Fase II) e o MXR (Fase III). Ocorreu inibição de EROD nas brânquias dos bivalves expostos ao chorume, mas na glândula digestiva foi observado aumento da atividade desta enzima após 15 dias de exposição à menor diluição (10X) (Fig.15). O aumento da GST aconteceu nas brânquias dos animais expostos por 5 dias à diluição de 10X e na glândula digestiva não houve alteração na atividade desta enzima (Fig.16). O MXR foi evidenciado pelo ensaio de acúmulo do fluorescente Rodamina, cujo maior acúmulo em brânquias e glândula digestiva dos animais expostos ao chorume diluído 18X por 5 dias indica a redução deste mecanismo (Fig.17).

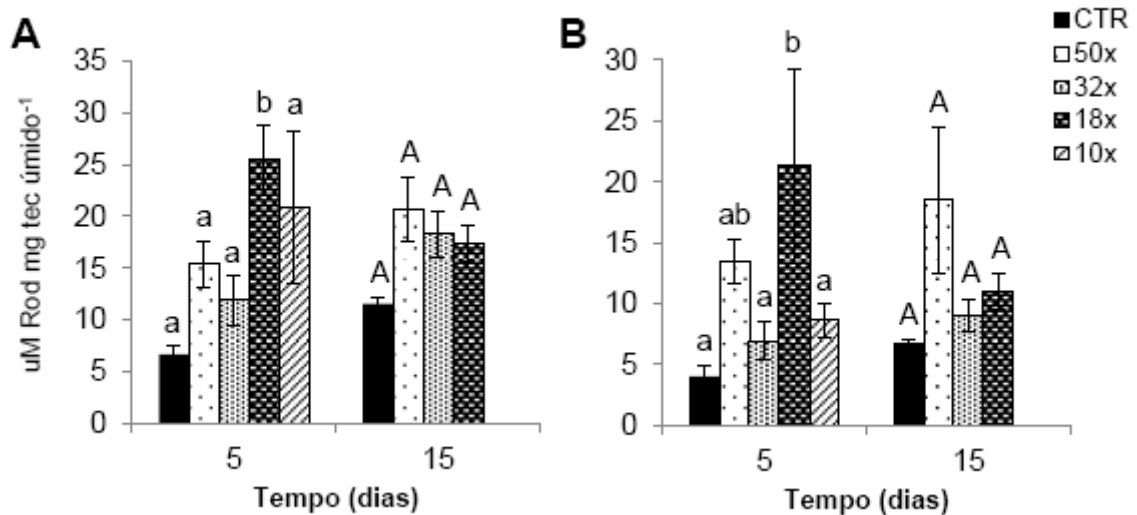
**Figura 15 -** Atividade da 7-Etoxioresorufina O-deetilase ( $\text{pmol Resorufina min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$ ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



**Figura 16 -** Atividade da Glutathiona S transferase ( $\text{nmol CDNB conjugado min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$ ) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

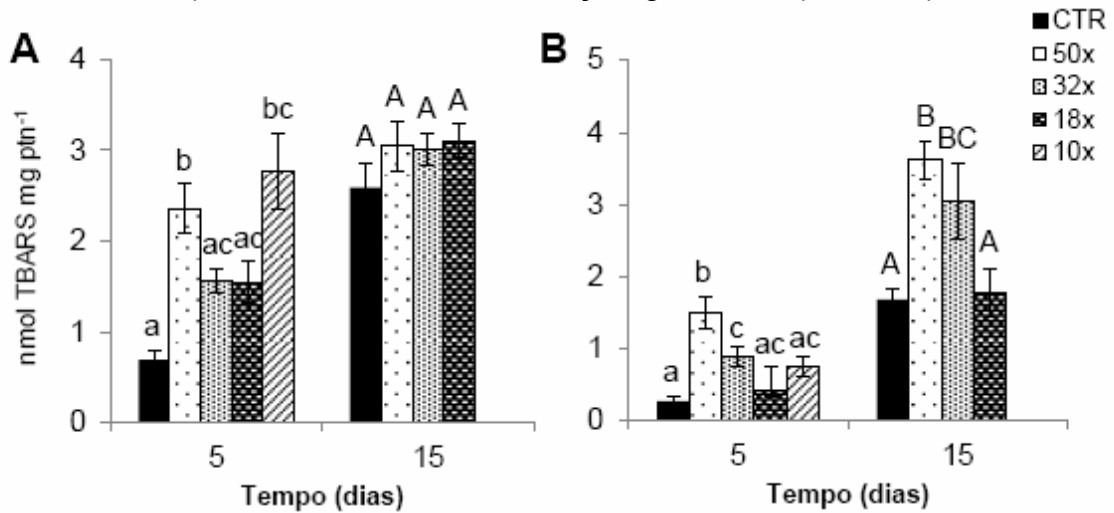


**Figura 17 - Mecanismo de resistência a multioxenobióticos (uM Rodamina mg tecido úmido<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).**

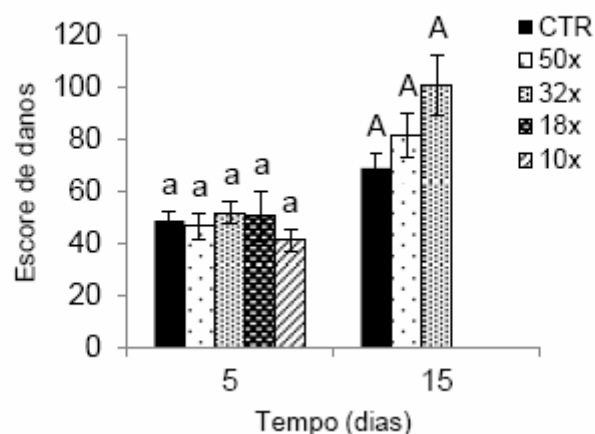


Foi realizada análise de lipoperoxidação, por meio do ensaio TBARS e danos no DNA de hemócitos, por meio do ensaio do cometa. Observou-se aumento de lipoperoxidação em algumas condições experimentais (Fig.18) e em 15 dias observou-se uma tendência de aumento ( $P = 0,07$ ) de danos no DNA nas diluições de 50X e 32X (Fig.19). O experimento para realização do ensaio do cometa não foi feito simultaneamente aos outros parâmetros e também houve mortalidade de 100% dos animais expostos à diluição de 18X, por isso não foi possível a obtenção destes dados.

**Figura 18 - TBARS (nmol TBARS mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )**



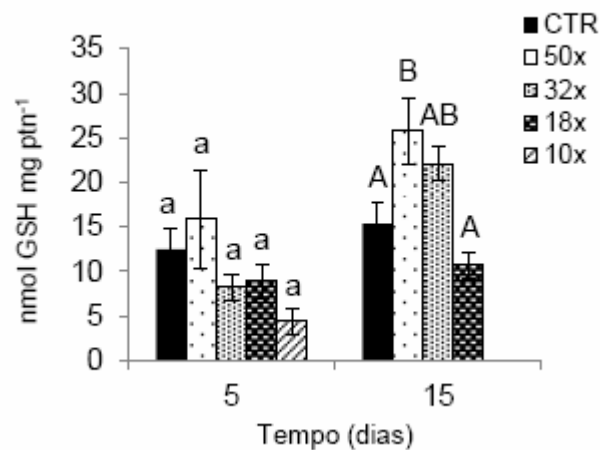
**Figura 19 - Danos no DNA de hemócitos (Escore de danos) de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).**



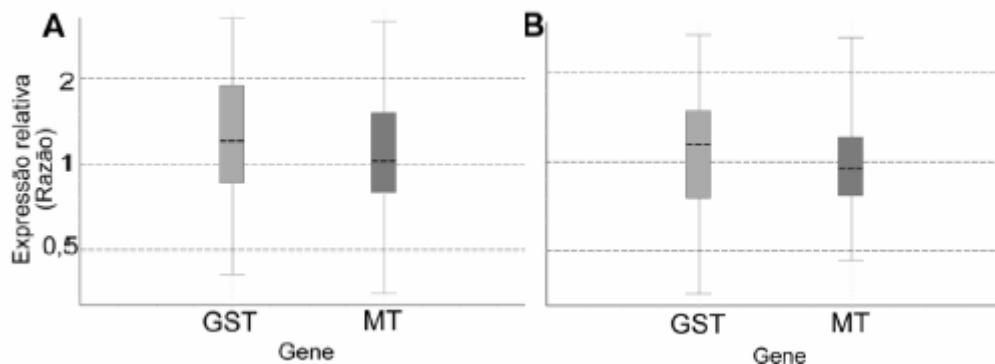
Foi evidenciado o aumento do conteúdo de metalotioneínas em brânquias de *C. fluminea* expostos por 15 dias às diluições de 50X e 32X (Fig.20). Assim como na análise bioquímica, não foi observada diferença na expressão de MT

no tempo de 5 dias na diluição de 50X. A expressão de GST também não sofreu alteração neste período (Fig.21). As sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes utilizados neste estudo foram desenhadas e na Fig.22 as curvas de fusão dos produtos da amplificação mostram a ocorrência de um único pico para cada gene que indica amplificação específica e ausência de dímeros de oligonucleotídeos.

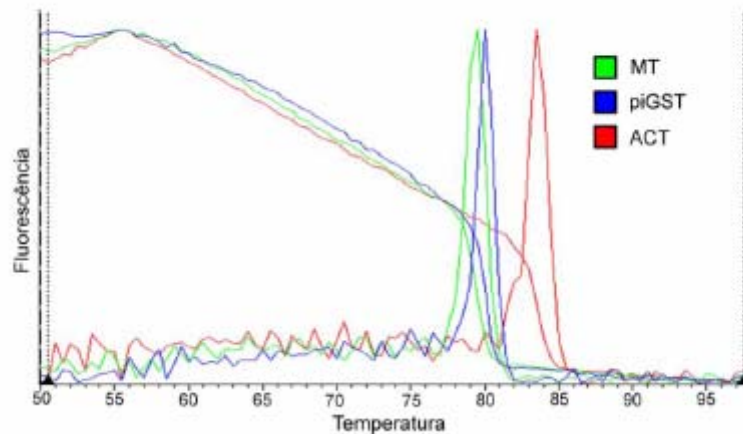
**Figura 20 - Conteúdo de metalotioneínas (nmol GSH mg de proteína<sup>-1</sup>) em brânquias de *C. fluminea* expostos por períodos de 5 e 15 dias ao controle (CTR) e quatro diluições de chorume de aterro doméstico: 50, 32, 18 e 10 vezes. As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras minúsculas (5 dias) ou maiúsculas (15 dias) diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05).**



**Figura 21 - Expressão relativa (Razão) dos genes da glutathione S transferase (GST) e metalotioneína (MT) em brânquias de *C. fluminea* expostos por período de 5 dias ao controle e a diluição de 50X. A e B são referentes a duas reações (réplicas) realizadas com o mesmo material. Os resultados estão representados pela mediana e suas amplitudes (quartis).**



**Figura 22** - Curvas de fusão dos produtos de amplificação referentes aos genes MT e GST e ao gene de referência da (3-Actina de *C. fluminea* empregados neste estudo. A ocorrência de um único pico de fusão para cada gene indica amplificação específica e ausência de dímeros de oligonucleotídeos.



#### 4.4 DISCUSSÃO

Os biomarcadores são ferramentas importantes que permitem um diagnóstico precoce da qualidade do meio em que um animal é exposto e auxiliam nas tomadas de decisão quanto à qualidade e concentração de poluentes em efluentes líquidos produzidos por ação humana. Os biomarcadores avaliados em bivalves expostos a diluições de chorume bruto de um aterro doméstico indicaram a presença de contaminantes em concentrações que são capazes de estimular respostas e produzir efeitos nestes animais.

O chorume produzido em um aterro doméstico consiste em uma mistura de contaminantes e pode conter matéria orgânica dissolvida, macrocomponentes orgânicos (cálcio, magnésio, potássio, amônia e ferro), elemento traço (cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco) compostos orgânicos xenobióticos (hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, compostos alifáticos clorados) e outros componentes em baixas concentrações como boro, arsênio, bário, selênio, mercúrio e cobalto (Christensen et al. 2001). O chorume bruto utilizado no presente trabalho apresentava, segundo análise cedida pelo Laboratório de Hidráulica e Saneamento do Departamento de Construção Civil da UEL, altos valores de condutividade elétrica ( $8865 \text{ uS.cm}^{-1}$ ), DBO ( $593 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$ ) e DQO ( $3025 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$ ), amônia ( $957 \text{ mg.L}^{-1}$ ), nitrogênio Kjeldahl total

(NKT 1052 mg.L<sup>-1</sup>), cloretos (1751 mg.L<sup>-1</sup>) e fósforo total (2 mg.L<sup>-1</sup>), além dos metais alumínio total (0,435 mg.L<sup>-1</sup>), cobre total (0,081 mg.L<sup>-1</sup>), cromo total (0,06 mg.L<sup>-1</sup>), ferro total (8,74 mg.L<sup>-1</sup>), manganês total (1,68 mg.L<sup>-1</sup>), níquel total (0,017 mg.L<sup>-1</sup>) e prata total (0,401 mg.L<sup>-1</sup>), que estão todos, com exceção do Ni, acima do limite estabelecido pela Resolução CONAMA 357/05.

A toxicidade do chorume para *C. fluminea* foi evidenciada pela análise de biomarcadores e os resultados mostraram que esta mistura complexa foi capaz de provocar peroxidação em lipídios de membrana e inibição de processos de biotransformação de fase I e III, EROD e MXR, respectivamente. Apenas nas menores diluições (10 e 18X) foi observada ativação das enzimas de biotransformação de fase I e II e, na maior diluição (50X), o aumento do conteúdo de metalotioneínas.

A biotransformação é uma resposta importante que os organismos apresentam quando são expostos a compostos lipofílicos, pois este processo os transforma em compostos que serão mais facilmente excretados pelo organismo (Van der Oost et al. 2003). Compostos como HPAs (Gowland et al. 2002) e PCBs (Binelli et al. 2006; Faria et al. 2009) podem aumentar a atividade da EROD ou GST em bivalves. O chorume ao qual indivíduos de *C. fluminea* foram expostos estimulou o aumento da GST em brânquias após 5 dias de exposição e aumento da EROD em glândula digestiva após 15 dias, porém isso ocorreu apenas nas menores diluições (10X e 18X, respectivamente). Estes resultados indicam a presença de compostos no chorume que são biotransformados nas Fases I e II, no entanto, diluição igual ou maior que 32X não promoveram ativação destes processos ou demandariam um tempo maior que 15 dias para que isso ocorresse. A expressão do gene pi-GST também não aumentou no tempo de 5 dias na diluição de 50X, assim como a atividade de todas as isoformas da enzima, o que reforça o fato de que os compostos presentes no chorume na maior diluição não estavam em concentrações capazes de ativar diferentes vias do processo de biotransformação.

Ao contrário da resposta apresentada na glândula digestiva, nas brânquias de *C. fluminea* foi observada diminuição da atividade da EROD em todas as diluições de chorume. Diversos compostos podem inibir a indução da EROD em organismos aquáticos (Beijer et al. 2010; Kirby et al. 2007; Navas e Segner 2000; Oliveira et al. 2004; Viarengo et al. 1997b) assim como condições como o estresse oxidativo (Barouki e Morel 2001) ou o excesso de substratos da enzima também

podem ser responsáveis por essa inibição. Apesar de existirem evidências da existência de *CYP1A-like* em bivalves (Wootton et al. 1995), Viarengo et al. (2007) afirma que parâmetros relacionados a fase I de biotransformação não devem ser considerados em monitoramentos focados em bivalves e que o MXR seria um dos parâmetros mais apropriados como biomarcador de exposição a compostos orgânicos nestes animais.

O MXR é considerado a primeira linha de defesa de organismos aquáticos contra xenobióticos, pois contribui com a redução do acúmulo destes nas células. Este mecanismo depende da atividade de glicoproteínas-P (Pg-p), que são dependentes de ATP, e transportam para fora da célula uma variedade de substratos, de estrutura e funções diversas. Os compostos que interagem com este mecanismo são, geralmente, moderadamente hidrofóbicos, planares ou produtos naturais (Bard 2000). No presente estudo, foi observada redução do MXR nos bivalves expostos ao chorume diluído 18X, que pode ter ocorrido pela presença no chorume de compostos denominados *chemosensitizers*, que são capazes de inibir a ação do MXR seja por competição ou inibição não competitiva através do bloqueio da ATPase ou, indiretamente, pelo bloqueio do regulador proteína quinase C (Smital e Kurelec 1998). Dentre estes estão pesticidas, produtos de higiene pessoal, produtos da degradação microbiana (Smital et al. 2004), Pb (Rocha e Souza 2012) e algumas fragrâncias (Luckenback et al. 2004; Smital et al. 2004). A inibição deste mecanismo também pode estar relacionada com a alta concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) presente no chorume, como mostram Kurelec et al. (1998) em extratos de resíduos sólidos de um aterro municipal, principalmente de resíduos domésticos. Na diluição de 10X não foi observada redução do MXR, assim como em 18X, o que leva a hipótese de que nesta diluição possa ter ocorrido síntese de novos transportadores para compensar a inibição provocada pelos compostos presentes no chorume.

O aumento do conteúdo de metalotioneínas em brânquias de *C. fluminea* após 15 dias de exposição ao chorume ocorreu nas diluições de 50 e 32X, e não na diluição de 18X. Estas proteínas de baixo peso molecular são ricas em cisteínas e por isso são consideradas ligantes de metais (Amiard et al. 2006), tem função de captação e liberação de metais, troca de metais, transferência de metais de proteínas para outras biomoléculas e também de atividade redox (Capdevila et al. 2012). Os metais Cu, Fe e Ag, que foram detectados no chorume bruto testado, têm

afinidade por grupamentos tiol das MTs (Capdevila et al. 2012). O gene da MT não apresentou aumento de expressão na condição testada, assim como não foi verificado aumento do conteúdo de MT por meio do ensaio bioquímico, em 5 dias de exposição na diluição de 50X. Bigot et al. (2010) observaram que *C. fluminea* expostos a Cu ( $50 \text{ ug L}^{-1}$ ), Cd (2, 10 e  $50 \text{ ug L}^{-1}$ ) e a mistura destes metais apresentaram aumento na expressão de MT em apenas 12 h de exposição, o que mostra que o chorume no qual os bivalves foram expostos no presente estudo apresentava possivelmente concentrações baixas de metais que não foram suficientes para estimular o aumento da expressão de MT mesmo após um tempo de 5 dias. Outra hipótese que pode ser levantada é de que o aumento da expressão do gene da MT, assim como o aumento do conteúdo desta proteína pode ter ocorrido em um período anterior a 5 dias.

Não foi observado aumento de TBARS concomitantemente com o aumento de MT, o que leva a duas hipóteses. A primeira delas seria que o aumento de metalotioneínas em *C. fluminea* expostos ao chorume estaria sendo estimulado diretamente pela presença de metais e a segunda que o aumento de MT em 15 dias foi um fator que pode ter auxiliado na proteção contra o estresse oxidativo, já que o aumento de lipoperoxidação ocorreria em decorrência deste.

A presença, por exemplo, dos metais Cu (Liao et al 2007) e Al (Kádár et al. 2001) na água causa o fechamento das valvas de bivalves dulcícolas. Em 60% de *C. fluminea* expostos a  $0,03 \text{ ug L}^{-1}$  de Cu ocorreu o fechamento das valvas após 9h de exposição (Liao et al 2007). O comportamento de fechamento das valvas também foi observado no presente trabalho nos animais expostos ao chorume, em especial nas menores diluições. Este fato leva a hipótese de que o chorume mais concentrado (18X e 10X) provoca este comportamento e pode estar sendo utilizado pelos bivalves como forma de proteção. Este comportamento pode ser um dos fatores que justifique os valores inalterados de MT e TBARS e a redução do MXR na diluição de 18X em 15 dias, ao contrário do que foi observado nas diluições de 32X e 50X.

#### 4.5 CONCLUSÃO

As concentrações do chorume testadas no presente trabalho foram tóxicas para *C. fluminea* e mesmo a maior diluição (50X) apresentou efeitos para estes organismos, resultado que mostra que esta não é segura. Os efeitos mais importantes foram a ocorrência de lipoperoxidação, que indica o estabelecimento de estresse oxidativo e a redução da atividade da EROD nas brânquias e redução do MXR, parâmetros de Fase I e III de biotransformação, cujo comprometimento torna os animais mais susceptíveis a ação tóxica e acúmulo celular de xenobióticos. Como respostas dos bivalves frente a exposição desta mistura observou-se aumento da atividade da EROD na glândula digestiva, aumento da atividade da GST e conteúdo de MT nas brânquias, indicando a presença de concentrações de xenobióticos orgânicos e metais que estimulam o aumento destes parâmetros. Estes biomarcadores deveriam ser considerados para a definição das diluições e tratamentos que o chorume bruto deveria sofrer antes de ser lançado no ambiente.

#### AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida para L.F. Oliveira e ao CNPq pela bolsa de pesquisador para C.B.R. Martinez, que é membro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5). Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado L.F. Oliveira.

## Referências

- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monsserat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407: 2115-2123.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202.
- Barouki R, Morel Y (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacology* 61:511–516.
- Beijer K, Abrahamson A, Brunström B, Brandt I (2010) CYP1A inhibition in fish gill filaments: A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquat Toxicol* 96:145–150.
- Bernard C, Guido P, Colin J, AnneLD (1996) Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates – I Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere* 33:2303-2320.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2005) Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in *Zebra mussels* from the Italian Great Lakes. *Chemosphere* 61:1074–1082.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2006) New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62:510–519.
- Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Marcchia S, Oliviero L, Pilato F, Pallegriani D, Regoli F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat Toxicol* 89:257–266.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Camejo G, Wallin B, Enojärvi M (1998) Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Armstrong D (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp.377-387.
- Capdevila M, Bofill R, Palacios Ò, Atrian S (2012) State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord Chem Rev* 256:46–62.
- Christensen TH, Kjeldsen P, Bjerg PL, Jensen DL, Christensen JB, Baun A, Albrechtsen H, Heron G (2001) Biochemistry of landfill leachate plumes. *Appl Geochem* 16:659-718.

Deguthi Y, Toyoizumi T, Masuda S, Yasuhara, A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinae N (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachate in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat Res* 627:178-185.

Depledge MH, Aagaard A, Györkös P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar Pollut Bull* 31:19-27.

Eggens ML, Galgani F (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. *Mar Environ Res* 33:213-221.

Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C (2009) Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 149:281–288.

Faria M, Huertas D, Soto DX, Grimalt JO, Catalan J, Riva MC, Barata C (2010) Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78:232–240.

Fedato RP, Simonato JD, Martinez CBR, Sofia SH (2010) Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat Res* 700:80–85.

Gowland BTG, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L (2002) Implications from field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar Environ Res* 54:231–235.

Hodgson E, Das PC, Cho TM, Rose RL (2008) Phase I Metabolism of Toxicants and Metabolic Interactions. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.173-204.

Kádár E, Salánki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR, White KN (2001) Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat Toxicol* 55: 137–148.

Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 20:6183-6188.

Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I (2007) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81:233–244.

Kurelec B, Britvić S, Pivčević B, Smital T (1998) Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. *Mar Environ Res* 46:415-419.

Kurelec B, Smital T, Piveeviaë B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307-327.

Large AT, Shaw JP, Peters LD, McIntosh AD, Webster L, Mally A, Chipman JK (2002) Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54:493–497.

Li X, Lin L, Luan T, Yang L, Lan C (2008) Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A in glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snails *Bellamya purificata*. *Chemosphere* 70:1903–1909.

Liao C, Lin C, Jou L, Chiang K (2007) Linking valve closure behavior and sodium transport mechanism in freshwater clam *Corbicula fluminea* in response to copper. *Environ Pollut* 147:656–667.

Luckenbach T, Corsi I, Epel D (2004) Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multitoxin defense systems in mussels. *Mar Environ Res* 58:215–219.

MacKenzie EL (2008) Reactive Oxygen/Reactive Metabolites and Toxicity. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.389–412.

Morcillo Y, Porte C (1997) Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat Toxicol* 38:35–46.

Navas JM, Segner H (2000) Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar Environ Res* 50:157–162.

Oliveira M, Santos MA, Pacheco M (2004) Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L.. *Ecotox Environ Safe* 58:379–385.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002–2007.

Regoli F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 50:351–361.

Rocha CT, Souza MM (2012) The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:56–67.

Sarkar A, Ray D, Shrivastava An, Sarker S (2006) Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 333–340.

- Smital T, Kurelec B (1998) The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat Res* 399:43–53.
- Smital T, Luckenbach T, Sauerborn R, Hamdoun AM, Veja RL, Epel D (2004) Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat Res* 552:101–117.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149.
- Viarengo A, Bettella E, Fabbri R, Burlando B, Lafaurie M (1997b) Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar Environ Res* 44:1-11.
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 277:1612:1619.
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A (2007) Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C* 146:281-300.
- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri F (1997a) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar Environ Res* 44:69-84.
- Wilhelm Filho D (1996) Fish antioxidant defenses – A comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res* 29:1735-1742.
- Wootton NA, Herring C, Spry JA, Wiseman A, Livingstone DR, Goldfarb OS (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression. (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. *Mar Environ Res* 39:21-26.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Experimentos *in situ* e em laboratório foram utilizados para avaliar a toxicidade do chorume de aterro doméstico em uma espécie de bivalve. Os dados obtidos mostraram que em ambos os tipos de teste foi possível observar efeitos tóxicos desta mistura nos animais. Resultados que se repetiram nos dois testes foram: a redução da EROD em brânquias e indução na glândula digestiva, o aumento de GST, redução do MXR e ocorrência de lipoperoxidação e aumento do conteúdo de metalotioneínas. Estes dados indicam que o chorume que espécimes de *C. fluminea* foram expostos contém compostos que provocam esses efeitos e respostas. A diminuição da EROD branquial e do MXR demonstra a presença de compostos potencialmente inibidores das enzimas e glicoproteínas envolvidas nestas fases da biotransformação, por outro lado, o aumento observado de EROD na glândula digestiva e de GST mostra que os animais tiveram o processo de biotransformação estimulado. A ocorrência de lipoperoxidação nos tecidos de bivalves evidencia o estabelecimento de estresse oxidativo, que se dá pelo aumento da geração de ERO e por uma capacidade antioxidante total insuficiente. Por último, o aumento da metalotioneína observada possivelmente esta relacionada a presença de metais, principalmente o cromo cuja acumulação aumentou. O ensaio do cometa, apesar de não apresentar diferença significativa nos testes realizados em laboratório, foi um biomarcador cujo aumento observado apareceram de forma bastante expressiva após 15 dias de exposição.

Não foi observada nenhuma resposta concentração-dependente, o que indica que a depuração natural do córrego dos Periquitos ou as diluições testadas em laboratório ainda contém quantidades de contaminantes suficientes para promover alterações nos bivalves. O metal Cr foi observado, tanto no sedimento quanto nos tecidos dos bivalves, aumentado igualmente nos três pontos do córrego dos Periquitos em relação aos pontos Coleta e Caf. O acúmulo tecidual deste metal pode ser considerado um bom biomarcador de exposição nestas condições e possivelmente está entre os compostos que causaram toxicidade para *C. fluminea*. Apesar disso, a concentração deste metal no sedimento apresentou-se baixa em relação à Resolução CONAMA 344/04, o que estimula um questionamento sobre a necessidade de verificação da mesma.

## REFERENCIAS

- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, Gomes OF, Medeiros MHG, Di Mascio P (2005) Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J Exp Mar Biol Ecol* 318:21-30.
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monsserat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407:2115-2123.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202.
- Angelo RT, Cringan MS, Chamberlain DL, Stahl AJ, Haslouer SG, Goodrich CA (2007) Residual effects of lead and zinc mining on freshwater mussels in the Spring River Basin (Kansas, Missouri, and Oklahoma, USA). *Sci Total Environ* 384:467–496.
- Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R, Baptista DF (2007) Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12:61–72.
- Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48:357–389.
- Barouki R, Morel Y (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacology* 61:511–516.
- Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Métivand J, Boudou A (1997) Seasonal variations of metallothionein concentrations in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 118:361–367.
- Beijer K, Abrahamson A, Brunström B, Brandt I (2010) CYP1A inhibition in fish gill filaments: A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquat Toxicol* 96:145–150.
- Bernard C, Guido P, Colin J, AnneLD (1996) Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates – I Determination of leachate toxicity with a battery o acute tests. *Chemosphere* 33:2303-2320.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2005) Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere* 61:1074–1082.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2006) New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62:510–519.

Bjelland S, Seeberg E (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531: 37–80.

Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Marcchia S, Oliviero L, Pilato F, Pallegri D, Regoli F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat Toxicol* 89:257–266.

Boening DW (1999) An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environ Monit and Assess* 55:459–470.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *SciTotal Environ* 247:295–311.

Camejo G, Wallin B, Enojärvi M (1998) Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Amstrong D (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp.377–387.

Camus L, Jones MB, Børseth JF, Grøsvik BE, Regoli F, Depledge MH (2002) Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Mar Environ Res* 54:425–430.

Capdevila M, Bofill R, Palacios Ò, Atrian S (2012) State-of-the-art of metallothionein at the beginning of the 21st century. *Coord Chem Rev* 256:46–62.

Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655:41–46.

Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS (2004) Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ Pollut* 128:393–403.

Cheung CCC, Zheng PKS, Lam PKS, Richardson BJ (2002) Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar Pollut Bull* 45:181–191.

Ching B, Chew SF, Wong WP, Ip YK (2009) Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). *Aquat Toxicol* 95:203–212.

Christensen TH, Kjeldsen P, Bjerg PL, Jensen DL, Christensen JB, Baun A, Albrechtsen H, Heron G (2001) Biochemistry of landfill leachate plumes. *Appl Geochem* 16:659–718.

Cossu C, Doyote A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox Environ Safe* 45:106-121.

Cravo A, Pereira C, Gomes T, Cardoso C, Serafim A, Almeida C, Rocha T, Lopes B, Company R, Medeiros A, Norberto R, Pereira R, Araújo O, Bebianno MJ (2012) A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Mar Environ Res* 75:23-34.

Deguthi Y, Toyozumi T, Masuda S, Yasuhara, A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinoshita N (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachate in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat Res* 627:178-185.

Depledge MH, Aagaard A, Györkös P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar Pollut Bull* 31:19-27..

Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, Van Veld PA (1995) Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand GM (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* 2nd ed. Taylor & Francis, Washington, pp.523-562.

Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2005). cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. *Comp Biochem and Physiol - C* 140:300–308.

Eggens ML, Galgani F (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. *Mar Environ Res* 33:213-221.

Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C (2009) Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 149:281–288.

Faria M, Huertas D, Soto DX, Grimalt JO, Catalan J, Riva MC, Barata C (2010) Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78:232–240.

Fedato RP, Simonato JD, Martinez CBR, Sofia SH (2010) Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat Res* 700:80–85.

Fernicola NAGG, Bohrer-Morel MBC, Bainy ACD (2003) Ecotoxicologia. In: Azevedo FA, Chasin AAM (ed) *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima Editora e Intertox, São Paulo, pp221-244.

Franco JF, Trivella DBB, Trevisan R, Dinslaken DF, Marques MRF, Bainy ACD, Dafre AL (2006) Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *ChemBiol Interact* 160:p.232-240.

Freitas R, Costa E, Velez C, Santos J, Lima A, Oliveira C, Rodrigues AM, Quintino V, Figueira E (2012) Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana*. *Ecotox Environ Safe* 75:109–118.

Gagné F, Blaise C, Pallerin J, Fournier M, Gagnon C, Sherry J, Talbot A (2009) Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: The effects of clam bed distance from the shore. *Sci Total Environ* 407:5844-5854.

Goldberg ED (1975) The mussel watch: a first step in global marine monitoring. *Mar Pollut Bull* 6:111–132.

Gowland BTG, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L (2002) Implications from field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar Environ Res* 54:231–235.

Hanson N, Larsson A (2011) Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. *Environ Toxicol.* 26:315-324.

Hegazi MM, Attia ZI, Ashour OA (2010) Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquat Toxicol* 99:118-125.

Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Storey KB *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley and Sons, New York, pp.319-368.

Hodgson E, Das PC, Cho TM, Rose RL (2008) Phase I Metabolism of Toxicants and Metabolic Interactions. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.173-204.

Kádár E, Salanki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR, White KN (2001) Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat Toxicol* 55: 137–148.

Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 20:6183-6188.

Keppler CJ (2007) Effects of ammonia on cellular biomarker responses in oysters (*Crassostrea virginica*). *Bull Environ Contam Toxicol* 78:63-66.

Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I (2007) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81:233–244.

Kulikouska D, Klimiuk E (2008) The effect of landfill age on municipal leachate composition. *Bioresour Technol* 99:5981–5985.

Kurelec B, Britvić S, Pivčević B, Smital T (1998) Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. *Mar Environ Res* 46:415-419.

Kurelec B, Smital T, Piveeviaë B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307-327.

Large AT, Shaw JP, Peters LD, McIntosh AD, Webster L, Mally A, Chipman JK (2002) Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54:493–497.

Le Pennec G, Le Pennec M (2003) Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat Toxicol* 64:131-142.

Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau J, Bourdineaud J (2005) Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 74:242–253.

Li X, Lin L, Luan T, Yang L, Lan C (2008) Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A in glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snails *Bellamyia purificata*. *Chemosphere* 70:1903-1909.

Liao C, Lin C, Jou L, Chiang K (2007) Linking valve closure behavior and sodium transport mechanism in freshwater clam *Corbicula fluminea* in response to copper. *Environ Pollut* 147:656-667.

Livingstone DR (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Méd Vét* 154: 427-430.

Luckenbach T, Corsi I, Epel D (2004) Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Mar Environ Res* 58:215–219.

Luk`yanova ON, Ireikina SA (2010) Glutathione-S-transferase as a molecular biomarker of the state of marine organisms influenced by anthropogenic pressure. *Biol Bull* 38:386-392.

MacKenzie EL (2008) Reactive Oxygen/Reactive Metabolites and Toxicity. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.389-412.

Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ2*:91-104.

Marie V, Baudrimont M, Boudou A (2006) Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65:609–617.

Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2004) Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. *Trends Analyt Chem* 23:10–11.

Martín-Díaz ML, Gagné F, Blaise C (2009) The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:237–242.

Mdegela RH, Braathen M, Mosha RD, Skaare JU, Sandvik M (2010) Assess of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. *Ecotoxicology* 19:722-734.

Mendes LT, Costa JS, França E, Teixeira R, Lopes DD, Silva MCP, Alves JC, Antonia LHD (2006). Aspecto físico-químico e bacteriológico da hidrologia subterrânea na região do depósito de resíduos sólidos urbanos, Londrina, Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* 27:139-146.

Monari M, Foschi J, Matozzo V, Marin MG, Fabbri M, Rosmini R, Serrazanetti GP (2009) Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and theirs role in response to B[a]P. *Comp Biochem Physiol C* 149:382-392.

Monserrat JM, Martinez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Pinho GLL, Chaves IS, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A (2007) Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives *Comp Biochem Physiol, C-Toxicol Pharmacol* 146:221–234.

Morcillo Y, Porte C (1997) Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat Toxicol* 38:35-46.

Mozeto AA (2000) Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas. In: Bicudo CEM, Bicudo DC (eds) *Workshop de Amostragem em Limnologia, Campos do Jordão, 1999*. No prelo.

Navas JM, Segner H (2000) Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar Environ Res* 50:157–162.

Newman MC, Clements WH (2008) *Ecotoxicology A Comprehensive Treatment*. CRC Press, Boca Raton.

Ng TYT, Wang W (2007) Interactions of silver, cadmium and copper accumulation in green mussels (*Perna viridis*). *Environ Toxicol Chem* 26:1764-1769.

O'Connor TP (2002) National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Mar Environ Res* 53:117–143.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface waters: a review, *Mutat Res* 567:109–149.

Oliveira M, Santos MA, Pacheco M (2004) Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L.. *Ecotox Environ Safe* 58:379–385.

Oygaard JK, Mage A, Gjengedal E (2004) Estimation of the mass-balance of elected metals in four sanitary landfills in Western Norway, with emphasis on the heavy metal content of the deposited waste and the leachate. *Water Res* 38:2851–2858.

Pampanin DM, Camus L, Gomiero A, Marangon I, Volpato E, Nasci C (2005) Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar Pollut Bull* 50:1548–1557.

Peltier GL, Meyer JL, Jagoe CH, Hopkins WA (2008) Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. *Environ Pollut* 154:283 e 290.

Peltier GL, Wright MS, Hopkins WA, Meyer JL (2009) Accumulation of trace elements and growth responses in *Corbicula fluminea* downstream of a coal-fired power plant. *Ecotox Environ Safe* 72:1384–1391.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.

Piña B, Casado M, Quirós L (2007) Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trends Anal Chem* 26:1145-1154.

Quirós L, Piña B, Solé M, Blasco J, López MA, Riva MC, Barceló D, Raldúa D (2007) Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies. *Chemosphere* 67:1144-1154.

Rand GM, Wells PG, McCarty LS (1995) Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand GM (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington, pp.3-70.

Regoli F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 50:351–361.

Richardson BJ, Mak E, Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels integrate biomarker responses? *Mar Pollut Bull* 57:503–514.

Roberts AP, Oris JT (2004) Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 138:221–228.

Rocha CT, Souza MM (2012) The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:56–67.

Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, André V, Lebailly P, Cachot J (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat Toxicol* 79:65–77.

Rodrigues JCA, Pires-Junior OR, Coutinho MF, Martins-Silva MJ (2007) First occurrence of the Asian Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Paranoá Lake, Brasília, Brazil. *Braz J Biol* 67:789-790.

Sáenz LA, Seibert EL, Zanette J, Fiedler HD, Curtius AJ, Ferreira JF, Almeida EA, Marques MRF, Bainy ACD (2010) Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxcol Environ Safety* 73:796-804.

Sarkar A, Ray D, Shrivastava An, Sarker S (2006) Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 333–340.

Shoults-Wilson WA, Peterson JT, Unrine JM, Rickard J, Black MC (2009) The asian clam *Corbicula fluminea* as a biomonitor of trace element contamination: accounting for different sources of variation using an hierarchical linear model. *Environ Toxicol Chem* 28:2224–2232.

Shugart LR (1995) Environmental Genotoxicology. In: Rand GM (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington, pp.405-420.

Silva J, Erdtmann B, Pegas HJA (2003) *Genética toxicológica*. Alcance, Porto Alegre.

Silva, SMCP (Coordenadora). Fatores intervenientes na poluição do solo decorrente da disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos: estudo de caso. Projeto de pesquisa n.9884, Programa APOIO A PROJETOS DE PESQUISA BÁSICA E APLICADA, Fundação Araucária, 2007.

Sisinno CLS, Moreira JC (1996) Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 12: 515-523.

Smital T, Kurelec B (1998) The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat Res* 399:43–53.

Smital T, Luckenbach T, Sauerborn R, Hamdoun AM, Veja RL, Epel D (2004) Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat Res* 552:101–117.

Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra-Santoyo A, Hernández JM, Brambila E, Cebrián ME, Alboras A (2000) Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicology* 142:111–117.

Souza DSM, Ramos APD, Nunes FF, Moresco V, Taniguchi S, Leal DAG, Sasaki ST, Bicego MC, Montone RC, Durigan M, Teixeira AL, Pilotto MR, Delfino N, Franco

RMB, Melo CMR, Bairy ACD, Barardi CRM (2012) Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicol Environ Safety* 76:153-161.

Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JCM, Svendsen C, Swain S, Sturzenbaum SR (2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ* 408:3725-3734.

Stien X, Percic P, Ganaissia-Barelli M, Roméo M, Lafaurie M (1998) Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut* 99:339-345.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Torres MA, Testa CP, Gáspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm Filho D (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollut Bull* 44:923-932.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149.

Veldhoen N, Ikononou MG, Helbing CC (2012) Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. *Ecotoxicol Environ Safety* 76:23-38.

Viarengo A, Bettella E, Fabbri R, Burlando B, Lafaurie M (1997b) Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar Environ Res* 44:1-11.

Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 277:1612-1619.

Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A (2007) Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C* 146:281-300.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri F (1997a) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar Environ Res* 44:69-84.

Vidal-Liñán L, Bellas J, Campillo JÁ, Beiras R (2010) Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78:265-272.

Wang L, Pan, L, Liu N, Xu C, Miao J (2011) Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. *Food Chem Toxicol* 49: 3407-3417.

Wang Z, Yan C, Vulpa CD, Yan Y, Chi Q (2012) Incorporation of *in situ* exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. *Mar Pollut Bull* 64:90–98.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufina-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30:347-570.

Wilhelm Filho D (1996) Fish antioxidant defenses – A comparative approach. *Braz J Med Biol Res* 29:1735-1742.

WHO: International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, *Environmental Health Criteria* 155.

Wootton NA, Herring C, Spry JA, Wiseman A, Livingstone DR, Goldfarb OS (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression. (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. *Mar Environ Res* 39:21-26.

Zhang L, Qiu L, Wu H, Liu X, You L, Pei D, Chen L, Wang Q, Zhao J (2012) Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp Biochem Physiol C* 155:517-527.

Zhang Y, Song J, Yuan H, Xu Y, He Z, Duan L (2010) Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentration of lead, mercury, cooper. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:19-25.