

MANUELA DREYER DA SILVA

**BIOMONITORAMENTO DE UMA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO
NATURAL (RPPN) ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM *Astyanax sp.***

**Monografia apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina
da Silva de Assis.**

**Co-orientadora: Msc. Fabíola Xochilt
Valdez Domingos.**

**CURITIBA
2004**

Who hears the fishes when they cry?

Henry David Thoreau (1849)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar essas palavras a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com minha vida acadêmica e pessoal, contribuindo para tornar possível meu projeto (ou meus projetos de vida) e fazendo dessa escolha uma realização muito mais feliz.

À minha mãe Tânia e ao pai Gerson por todo o apoio não apenas nessa conquista, mas em todas as outras de minha vida. Obrigada também por todo carinho e compreensão extra trabalho. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Diogo, Rosana e Filipe (com 'i') por todos os momentos vividos juntos, companheirismo e amizade.

Ao sobrinho Caio, que tantas vezes esteve do meu lado, com seu jeitinho curioso e encantador.

Ao Le, namorado querido e amado, amigo de todas as horas e Biólogo que tanto me ajudou e me fez compreender um pouquinho dessa profissão.

À minha orientadora Helena, pela orientação, conselhos, paciência e amizade, que me fizeram crescer como pessoa e como Bióloga.

À Fabíola, pela força, pelas oportunidades oferecidas e pelo companheirismo.

Às gurias da facul, amigas de tantos momentos, de tantas conquistas, de tantas descobertas e viagens, amigas da vida. Agradecimento especial pra Jú, pro Le e pra Lailinha, amigos que me ajudaram muito nas fases de campo desse projeto.

Às gurias extra facul, que fizeram parte das mais variadas fases da minha vida e, como não poderia deixar de ser, amigas nesse momento também.

À Lílian, Rossana, Cláudia, Sílvia e todo o pessoal do laboratório e do departamento, por todos os auxílios, mesmo que corridos, e bate-papos diários.

Aos amigos e colegas de profissão, pelas conversas na cantina e nos corredores, que me fizeram crescer durante todo esse caminho.

À Rô, da coordenação, que faz do nosso curso o que ele é. Por todas as ajudinhas e conversas na hora em que precisei.

Ao pessoal do laboratório do professor Marcelo Aranha, da UFPR, pela ajuda na identificação dos espécimes utilizados nesse trabalho.

Ao Alexandre e a sua família, por tornarem esse trabalho realidade e pela amizade oferecida. Obrigada também ao pessoal da Fazenda Duas Barras, em especial ao seu João, pela paciência e conhecimento oferecidos nas fases de campo.

Com carinho, obrigada a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE GRÁFICOS	IX
LISTA DE TABELAS	XX
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL	11
1.2. CONTAMINANTES AMBIENTAIS	12
1.2.1. Herbicidas Organoclorados	15
1.2.2. Herbicidas utilizados em plantações de arroz	16
1.3. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	17
1.4. BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	18
1.4.1. EROD	19
1.4.2. GST	21
1.4.3. Microscopia de luz	22
1.4.3.1. Organização estrutural da brânquia	23
1.4.3.2. Organização estrutural do rim	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVOS GERAIS	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. ÁREA DE ESTUDO	26
3.2. COLETA DAS AMOSTRAS	27
3.3. DESCRIÇÃO DO BIOINDICADOR	30
3.4. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS	32
3.4.1. Medida da atividade da EROD	32
3.4.1.1. Extração Enzimática	32
3.4.1.2. Análise da Atividade da EROD	32
3.4.2. Medida da atividade da GST	33
3.4.2.1. Extração Enzimática	33
3.4.2.2. Padronização da medida de atividade da GST	34

3.4.2.3. Análise da Atividade da GST	34
3.4.3. Concentração Protéica	35
3.4.4. Microscopia de Luz	35
3.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	36
4. RESULTADOS	37
4.1. EROD	37
4.1.1. Análise da atividade da EROD	37
4.2. GST	37
4.2.1. Padronização da medida de atividade da GST	37
4.2.2. Análise da atividade da GST	39
4.3. MICROSCOPIA ÓPTICA	39
4.3.1. Análise da estrutura branquial de <i>Astyanax</i> sp.	39
4.3.2. Análise da estrutura renal de <i>Astyanax</i> sp.	45
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Movimentos dos agrotóxicos em ambientes aquáticos _____	14
FIGURA 2 - Mapa da região do Estado do Paraná, indicando a cidade de Planaltina do Paraná e a Fazenda Duas Barras (ponto vermelho) _____	26
FIGURA 3 - Plantação de arroz à frente e uma porção da RPPN aos fundos ____	27
FIGURA 4 - Mapa representativo da Fazenda Duas Barras (com a área protegida - RPPN) e do cultivo de arroz. Os pontos indicados em vermelho representam os locais de coleta _____	28
FIGURA 5 - Córrego formado pela irrigação do cultivo de arroz _____	29
FIGURA 6 - Tanques de criação dos peixes utilizados como Controle – Fazenda Águas Verdes, Araucária, PR _____	30
FIGURA 7 - Imagem do bioindicador <i>Astyanax</i> sp. _____	31
FIGURA 8 - Reação química catalisada pelo CYP450, expressa sob a forma da enzima EROD (O = oxigênio; N = nitrogênio; OH = grupo hidroxila) _____	33
FIGURA 9 - Brânquia de <i>Astyanax</i> sp. Estrutura da lamela primária (L1 ^a) e secundária (L2 ^a) de um exemplar do grupo controle. Barra = 50µm (coloração: hematoxilina-eosina) _____	40
FIGURA 10 - Hiperplasia do epitélio branquial e fusão das lamelas branquiais observadas em <i>Astyanax</i> sp. coletado na RPPN. Barra = 50µm (coloração: hematoxilina-eosina) _____	41
FIGURA 11 - Aneurisma na região de fusão de lamelas observado em <i>Astyanax</i> sp. coletado no interior do cultivo de arroz . Barra = 25µm (coloração: hematoxilina-eosina) _____	41
FIGURA 12 - Aneurismas nas extremidades distais das lamelas observados em <i>Astyanax</i> sp coletado na RPPN. Barra = 25µm (coloração: hematoxilina-eosina)	42
FIGURA 13 - Rim posterior de <i>Astyanax</i> sp. Glomérulo e ducto coletor de um exemplar do grupo controle. Barra = 50µm (coloração: hematoxilina-eosina)____	45
FIGURA 14 - Necroses no rim posterior: observado em <i>Astyanax</i> sp. coletado no interior do cultivo de arroz. Barra = 50µm (coloração: hematoxilina-eosina) _____	46

FIGURA 15 - Extravasamento de sangue no tecido do rim posterior observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 50 μ m
(coloração: hematoxilina-eosina) _____ 46

FIGURA 16 - Inclusões citoplasmáticas nos ductos do rim posterior: observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 25 μ m
(coloração: hematoxilina-eosina) _____ 47

FIGURA 17 - Ductos com coloração diferenciada no rim posterior: observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 25 μ m
(coloração: hematoxilina-eosina) _____ 47

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Atividade específica (AE) da EROD ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) no fígado de <i>Astyanax</i> sp, nos grupos controle, da RPPN e da plantação de arroz, em diferentes épocas do ano_ _____	37
GRÁFICO 2 - Curva de substrato GSH _____	38
GRÁFICO 3 - Curva de substrato CDNB _____	38
GRÁFICO 4 - Atividade específica (AE) da GST ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) no fígado de <i>Astyanax</i> sp, nos grupos controle, da RPPN e da plantação de arroz, em diferentes épocas do ano_ _____	39
GRÁFICO 5 – Porcentagem de hiperplasia observada nas brânquias de <i>Astyanax</i> sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano _____	43
GRÁFICO 6 - Porcentagem de aneurisma observada nas brânquias de <i>Astyanax</i> sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano_ _____	43
GRÁFICO 7 - Porcentagem de necrose observada no rim posterior de <i>Astyanax</i> sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano _____	48
GRÁFICO 8 - Porcentagem da presença de sangue no rim posterior de <i>Astyanax</i> sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano _____	48

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Metodologia de quantificação utilizada na análise da fusão de lamelas secundárias nas brânquias de *Astyanax* sp _____ 44
- TABELA 2 - Análise da fusão das lamelas secundárias nas brânquias de *Astyanax* sp., nos ponto Controle, RPPN e arroz, em diferentes épocas do ano _____ 44

RESUMO

Unidades de Conservação (UC's) são porções do território nacional com características naturais de relevante valor, de domínio público ou propriedades privadas, às quais aplicam-se garantias de proteção. Dentre as UC's está a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN). Como muitas RPPN's se encontram em áreas sujeitas a diversos impactos, os estudos de biomonitoramento nessas áreas devem ser desenvolvidos, objetivando a padronização do uso de biomarcadores, a partir da utilização de parâmetro biológico (bioindicador). Neste estudo foi utilizado como bioindicador o lambari do gênero *Astyanax* sp. Dentre os biomarcadores mais utilizados, os biomarcadores bioquímicos (GST-Glutationa S-transferase e EROD-etoxiresorufina-O-deetilase) e os morfológicos (histopatologia de brânquias e rim) merecem destaque neste projeto. As áreas estudadas foram a RPPN Fazenda Duas Barras, PR, e a plantação de arroz vizinha, na qual há pulverização de herbicidas organoclorados. A pesquisa pretendeu analisar, através do estudo desses biomarcadores em *Astyanax* sp, um ponto dentro da RPPN e um ponto no cultivo. O controle foi realizado em laboratório, seguindo a mesma metodologia empregada em campo. Foi realizada uma coleta em outubro de 2003 (época da pulverização) e outra em maio de 2004. Foram coletados 8 indivíduos por ponto amostrado. Para análise das enzimas propostas, optou-se pela confecção de *pools* de fígado. Para a histologia, a brânquia e o rim de cada indivíduo foram analisados. A atividade da EROD foi medida segundo o método de BURKE e MAYER, 1974 (*Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. Drug metabolism and Disposition. v. 2, p. 583-588*), e a atividade da GST, segundo PLUTA *et al.*, 1991 (*Untersuchungen zur Biotransformation – Entgiftungsaktivität der Mischfunktionellen Oxidasen, MFO - in der Fischleber. Forschungsvorhaben BGA Code Nr. 1342 118*). A análise enzimática demonstrou uma indução significativa da atividade da GST (média±erro padrão) expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ na RPPN na última coleta ($197,9\pm 9,7$), quando comparado ao grupo controle ($117,3\pm 8,8$). A atividade da EROD não apresentou alteração significativa. Foram verificadas alterações branquiais (hiperplasia, aneurisma e fusão lamelar) e renais (necrose e presença de sangue no tecido), tanto nos indivíduos coletados na RPPN, quanto nos coletados no cultivo de arroz, em ambas as coletas. Os dados obtidos neste trabalho permitem afirmar que há impacto em ambas as áreas e que esse impacto pode ter sido causado pela administração de organoclorados no arroz, mas não se descarta a hipótese de haver exposição múltipla da RPPN a vários xenobiontes, vindos do cultivo vizinho e de efluentes do Rio Ivaí (vizinho à RPPN).

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL

“Unidades de Conservação (UC’s) são porções do território nacional, incluindo as águas territoriais, com características naturais de relevante valor, de domínio público ou propriedades privadas, legalmente instituídas pelo Poder Público com objetivos e limites definidos, sob regimes especiais de administração e às quais aplicam-se garantias de proteção” (FUNATURA, 1989).

Dada a pluralidade dos objetivos de conservação ambiental, faz-se necessário considerar tipos distintos de UC’s. Essas classes distintas são denominadas categorias de unidades de conservação, cada uma das quais atendendo prioritariamente a determinados objetivos.

Através do Decreto 4.262, o Estado do Paraná instituiu, pioneiramente no Brasil, a categoria de manejo de conservação denominada Reserva Particular do Patrimônio Natural - RPPN (SEMA, 2004). Essa categoria de manejo foi criada em 1990, para legitimar as intenções conservacionistas de proprietários rurais. A Lei 9.985 de 2000, que aprovou o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), deu mais força as RPPN’s, tornando-as categoria de unidade de conservação.

As RPPN’s são áreas privadas, naturais ou pouco alteradas, de tamanhos variáveis, que são oficialmente protegidas para conservação da biodiversidade e/ou outros atributos naturais considerados relevantes. Essas áreas são instituídas por manifestação e destinação dos proprietários, sendo reconhecidas pelo Estado, destinando-se de forma perpétua à conservação dos atributos que tornaram possível seu reconhecimento.

Sendo as UC’s de dimensões e características tão variáveis, os objetivos de manejo podem variar entre as RPPN’s. Nas RPPN’s do Paraná podem ser implementadas atividades de pesquisa, educação ambiental e turismo em áreas naturais, com anuência do proprietário, devidamente autorizadas e licenciadas pelo Instituto Ambiental do Paraná.

No estado do Paraná existem 175 RPPN’s, perfazendo 34.102,34 hectares de área conservada. Destas, 07 áreas são de âmbito Federal,

somando 6.857,18 hectares, e 168 áreas são de âmbito Estadual, com 27.245,16 hectares (SEMA, 2004).

As RPPN's têm servido cada vez mais como instrumento adicional para o fortalecimento do sistema de conservação da natureza, permitindo em várias situações a manutenção de um grau mais elevado de conectividade da paisagem natural, assim como o incremento da representação de áreas prioritárias para a conservação, ainda não contempladas pela rede de áreas públicas protegidas.

Tendo em vista o atendimento do objetivo geral de conservação, muitos objetivos básicos das UC's foram identificados, entre eles, preservação da diversidade biológica; proteção de espécies raras, endêmicas, vulneráveis ou em perigo de extinção; preservação de recursos de flora e/ou fauna; incentivo à pesquisa científica; incentivo à educação ambiental; contribuição do monitoramento ambiental; entre outros.

As características citadas acima são suficientes para que as UC's sejam, de fato, protegidas. A necessidade de compreender e manejar essas áreas é tarefa prioritária, já que, muitas vezes, as demandas sócio-econômicas (atividades industriais, agrícolas, turísticas, entre outras) tendem a colidir com os interesses conservacionistas.

Como muitas RPPN's se encontram freqüentemente em áreas de grande atividade antropogênica, estando sujeitas a diversos impactos nas regiões do entorno e mesmo dentro das UC's, os estudos de biomonitoramento nessas áreas devem ser desenvolvidos, objetivando a detecção e a minimização dos possíveis impactos existentes.

1.2 CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Poluente é uma substância que excede a capacidade de mobilização pelo meio, de origem natural ou como resultado da atividade humana e que apresenta um efeito de prejuízo à qualidade ambiental. Contaminantes ambientais, por sua vez, causam desvio da composição normal de um ecossistema (ODUM, 1988). Atualmente, muitos desses contaminantes ambientais possuem origem na utilização de agrotóxicos.

No passado, os organismos indesejáveis à agricultura eram controlados através da aplicação de pequeno número de compostos inorgânicos à base de cobre e arsênico, além de alguns inseticidas de ocorrência natural, como as piretrinas. Até a II Guerra Mundial o desenvolvimento de compostos orgânicos foi lento, porém, com a descoberta da propriedade inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, iniciou-se a expansão e desenvolvimento de uso, característico dos últimos 40 anos. Em função do modelo de agricultura adotado a partir desse período, estas substâncias passaram, então, a ser amplamente utilizadas (UNEP, 1997).

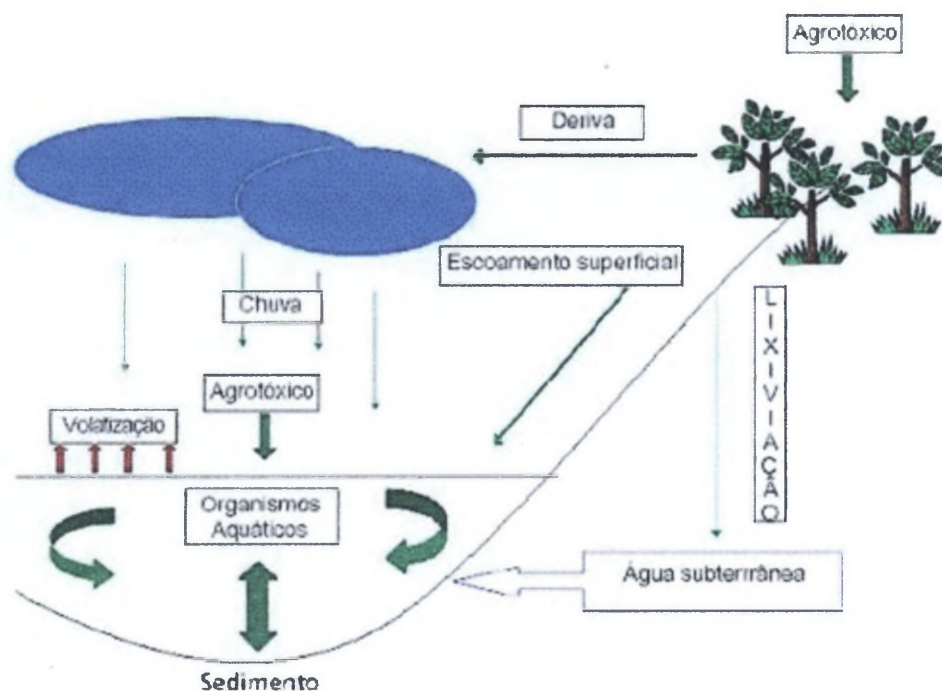
De fato, a utilização de agrotóxicos possibilitou o aumento da produtividade agrícola, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente.

Muitas RPPN's localizam-se próximas a áreas com intensa atividade antrópica e, por esse motivo, sofrem intensos impactos, como acúmulo de produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) provindos de indústrias e acúmulo de pesticidas vindos das áreas agrícolas do entorno.

Muitos contaminantes são transportados por rios, riachos, córregos, etc. Enquanto permanecerem presentes na coluna d'água estes contaminantes podem ser bioacumulados por organismos aquáticos. Os contaminantes geralmente se ligam a partículas em suspensão e se acumulam no sedimento e, deste local, podem ser liberados lentamente para a camada de água, tornando-se disponíveis para os organismos bentônicos (NIPPER, 1990).

A Figura 1 mostra que os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial, a partir de áreas onde ocorreram aplicações. Além de afetar os próprios cursos de água superficiais, os agrotóxicos podem também alcançar os lençóis freáticos.

FIGURA 1 - Movimentos dos agrotóxicos em ambientes aquáticos.
Fonte: TOMITA, 2002. *O Biológico, São Paulo*, v.64, n.2, p.135-142.



Os agrotóxicos representam um grande problema ambiental e de saúde pública, devido a sua expressiva utilização (milhares de toneladas de agrotóxicos são utilizados anualmente) e a sua toxicidade (aguda, subaguda e em longo prazo). Os pesticidas podem ser categorizados consoante o seu objetivo de utilização. Os três mais importantes grupos são os herbicidas, os inseticidas e os fungicidas (UNEP, 1997).

Os inseticidas têm seu maior uso nos cultivos de arroz, algodão, frutas e hortaliças e 70% da demanda dos herbicidas recai sobre os cereais (especialmente milho, trigo, arroz e cevada), soja e cana-de-açúcar. Quatro culturas, cereais de grãos pequenos (cevada e trigo), milho, arroz e algodão, utilizam no mundo metade dos produtos fitossanitários (FAO, 1981).

No presente projeto, foi considerada, principalmente, a categoria dos herbicidas.

1.2.1 Herbicidas Organoclorados

Os herbicidas são largamente utilizados em culturas agrícolas e terrenos florestais e podem, ainda, ser aplicados diretamente em lagos para controle do crescimento exagerado de algas, plantas submersas, flutuantes ou emergentes.

Os pesticidas organoclorados pertencem à classe dos poluentes orgânicos persistentes (POP's), ou seja, são compostos que possuem resistência à degradação. São persistentes por apresentarem grande estabilidade química e pronunciada ação residual, levando de 2 a 5 anos para que 75 a 100% do composto não seja mais encontrado no local de aplicação (MENZER, 1991).

Os organoclorados podem ser transportados por longas distâncias e podem participar de diversos ciclos biogeoquímicos sem sofrerem muita degradação. Além disso, tendem a ser bioacumulados pelos organismos, o que traduz um risco aos humanos e demais espécies, estando, portanto, associados a graves efeitos ambientais.

Após a Segunda Guerra Mundial, ocorreu um súbito aumento no uso dos herbicidas sintéticos e orgânicos. Logo se começou a observar que tais compostos eram encontrados com freqüência no ambiente natural, principalmente em organismos que não constituíam seu alvo inicial. Estudos sobre os efeitos de pesticidas em peixes tiveram início logo após a introdução do DDT em 1943 (BLUS, 1995).

Por sua toxicidade e persistência no ambiente, os herbicidas organoclorados têm sido alvo principal de atuação de órgãos de proteção ambiental de muitos países. Por serem de difícil degradação, tendem a se concentrar no meio e serem bioacumulados pelos organismos vivos afetando a saúde dos ecossistemas e da mesma forma colocando em risco a saúde humana (FILLMAN *et al.*, 2002).

Estes compostos estão associados a graves efeitos ambientais, atuando sobre uma ampla variedade de espécies e atingindo todos os níveis tróficos (BLUS, 1995).

DEVI *et al.* (1981), afirmam que os organoclorados podem representar sérios problemas no ambiente aquático. É unânime entre diversos autores a

opinião de que a toxicidade para organismos aquáticos seja extremamente elevada, principalmente para peixes (NAQVI e VAISHNAVI, 1993; JONSSON e TOLEDO, 1993; DEVI *et al.*, 1981).

1.2.2 Herbicidas utilizados em plantações de arroz

A cultura do arroz irrigado está entre uma das maiores consumidoras de agrotóxicos. Além disso, é a maior consumidora agrícola de água em nível mundial e, no Brasil, em particular nos estados do Sul, devido ao grande percentual de áreas cultivadas.

Esse modo de produção provoca impactos ainda desconhecidos sobre o meio aquático. O carreamento de nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo e potássio e de agrotóxicos, que são lixiviados e conduzidos para o sistema de drenagem, origina a perda de recursos materiais e financeiros e agride os ecossistemas, pois esses nutrientes e os defensivos agrícolas podem contaminar os ambientes aquáticos, afetando as populações que fazem uso das águas dos corpos receptores (FURTADO e LUCA, 2003).

Na área estudada, o produtor de arroz optou pela aplicação de herbicidas organoclorados, utilizando um avião para despejo dos agroquímicos (um coquetel de três tipos diferentes de organoclorados). A aplicação foi realizada dois meses após o plantio das sementes de arroz, em outubro de 2003. Essa aplicação é realizada apenas uma vez por ano, mas, se necessário, são realizadas pulverizações manuais durante o cultivo.

Esse modo de manejo ocorre na região estudada há, aproximadamente, 15 anos. Os agrotóxicos escolhidos sofreram alterações ao longo desses anos, seguindo as legislações vigentes e o custo da produção. As embalagens utilizadas na área são devolvidas para os fabricantes, conforme indicações atuais.

A Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura, estabelece a proibição de muitos organoclorados, entre eles: Aldrin, BHC, Canfeno clorado (toxafeno), DDT, Dodecacloro, Endrin, Heptacloro, Lindane, Metoxicloro, Nomacloro, Pentaclorofenol, Dicofol e Clorobenzilato. Todavia, os produtos utilizados na plantação em questão estão presentes na lista de agrotóxicos aptos para uso e comércio no estado do

Paraná (princípios ativos: 4,6-Tricloro-1,3,5-Triazina; 2,4-D - Sal Dimetilamina do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético e 2,4 Dicloro fenoxiacético).

Apesar do uso legal desses produtos, da baixa frequência de pulverização e de uma disposição adequada das embalagens, o risco de contaminação no ambiente aquático se torna evidente pelo modo de manejo empregado: irrigação e drenagem. Somando-se a isso, a água utilizada no cultivo, que contém esses agrotóxicos, pode muitas vezes contaminar as regiões vizinhas.

Para ampliar estudos nessa área, o presente trabalho objetivou, portanto, analisar possíveis impactos desses agroquímicos a partir de estudos com biomarcadores sobre uma espécie bioindicadora, na área de cultivo do arroz e no entorno, o qual possui uma região protegida.

1.3 BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A associação de fatores bióticos e abióticos em estudos de avaliação de impacto ambiental de um ambiente fornece dados mais precisos sobre o mesmo. Assim sendo, o biomonitoramento, que consiste em estudos com uma ou mais espécies de organismos (bioindicadores) presentes na área impactada, é de grande importância (SHUGART *et al.*, 1992).

A utilização de bioindicadores se vê necessária quando valores atuais ou valores de entrada de um dado sistema diferem de valores considerados padrões. Nisso baseia-se a principal diferença entre o monitoramento de parâmetros físicos e químicos do uso de bioindicadores de fatores ambientais. No monitoramento físico-químico aborda-se a qualidade e quantidade dos fatores físico-químicos, podendo-se eventualmente inferir-se sobre os efeitos biológicos; enquanto que com os bioindicadores obtêm-se informações sobre os efeitos no sistema biológico, podendo-se eventualmente inferir sobre a qualidade e quantidade do fator estressor. O ideal é ter condições para realizar um biomonitoramento com ambos instrumentos.

A utilização de parâmetros biológicos (bioindicadores) possibilita a avaliação de áreas impactadas e o biomonitoramento de áreas protegidas, através de estudos com biomarcadores. O bioindicador escolhido para esse estudo foi o lambari do gênero *Astyanax* sp.

Segundo SILVA FILHO *et al.* (2000), vários trabalhos utilizam os peixes como bioindicadores, na tentativa de avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes, dentre eles os organoclorados.

1.4 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Segundo PEAKALL (1999), biomarcador pode ser definido como qualquer resposta biológica a químicos ambientais ao indivíduo ou em parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo.

De acordo com alguns autores, existem dois tipos de biomarcadores: aqueles que indicam um efeito direto na exposição do organismo a uma substância química (biomarcadores específicos) e aqueles que indicam qualquer alteração diferente do normal, não se podendo correlacionar exclusivamente com exposição a uma determinada substância (biomarcadores inespecíficos). Os primeiros podem também ser classificados como biomarcadores de efeito, e os segundos, como biomarcadores de exposição. A especificidade dos biomarcadores aos químicos varia grandemente e tanto os específicos como os inespecíficos têm sua importância na avaliação do risco ambiental.

Segundo STEGEMAN *et al.* (1992), os biomarcadores permitem detectar uma contaminação ambiental, avaliar a magnitude da contaminação e identificar espécies ou populações em risco de contaminação. Para que um marcador seja utilizado de maneira eficaz ele deve possuir especificidade (deve demonstrar o efeito específico de um determinado contaminante), seguir uma metodologia e logística acessível, além de produzir resultados que possibilitem diferenciação de possíveis oscilações fisiológicas.

Durante décadas os efeitos de xenobióticos sobre o ambiente aquático foram avaliados pelo monitoramento de mudanças ambientais em cada nível de organização do ecossistema (populações, comunidade, etc), separadamente. A toxicologia ambiental passou a estudar o ambiente de uma forma mais complexa, utilizando marcadores para cada nível de organização. Estes marcadores, bioquímicos, fisiológicos e histológicos, devem apresentar habilidade de medir diferentes respostas causadas pela presença de estressores distintos (HUGGETT *et al.*, 1992).

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, em relação às análises químicas. Por detectarem alterações enzimáticas, os biomarcadores bioquímicos são considerados sistemas de aviso precoce, indicando a contaminação do ambiente antes que ocorram danos mais severos aos organismos e, possivelmente, ao ecossistema (MCCARTHY e SHUGART, 1990). Dentre os marcadores bioquímicos que merecem destaque neste projeto estão a atividade da GST (Glutathione S-transferase) e da EROD (7-etoxiresorufina-O-deetilase), devido a maior especificidade para herbicidas organoclorados.

Técnicas morfológicas, como microscopia de luz, também têm sido utilizadas em trabalhos de toxicologia, pois permitem avaliar o efeito direto de alguns contaminantes em órgãos e tecidos alvo (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2000). A microscopia de luz foi utilizada também nesse trabalho para o estudo do bioindicador *Astyanax* sp.

1.4.1 EROD

A transformação metabólica (biotransformação) dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula. A biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm em comum a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais rapidamente excretadas.

O metabolismo oxidativo envolvendo oxigênio molecular é o processo enzimático inicial na biotransformação da maioria dos compostos orgânicos lipofílicos (reações de fase I). A fase I de reações normalmente transforma xenobióticos lipofílicos em compostos mais solúveis em água, para então sofrerem detoxificação e excreção. Os principais grupos de enzimas envolvidas nesta etapa da biotransformação de xenobióticos são as monooxigenases flavoproteínas (FMO) e as monooxigenases heme proteínas (citocromo P450 –

CYP450). Ambos os grupos são expressos em vertebrados aquáticos e invertebrados. Entretanto, o CYP450 é citado mais freqüentemente na literatura nas monooxigenases em mamíferos e em espécies aquáticas (STEGEMAN, 1992).

O citocromo é uma heme proteína que contém ferro e que, na sua forma reduzida, se complexa com monóxido de carbono, produzindo um composto que absorve luz em 450nm (OMURA e SATO, 1964). É um biomarcador bastante utilizado.

Em peixes e em outros vertebrados, o citocromo P450-dependente de monooxigenases é principalmente encontrado no retículo endoplasmático (RE) e nas mitocôndrias de fígado, rim, cérebro e intestino delgado, assim como em outros órgãos. Eles compreendem uma família de enzimas da fase I, os quais oxidam, reduzem ou hidrolisam substâncias xenobióticas. Entretanto, alguns dos intermediários são altamente reativos e podem resultar em compostos altamente tóxicos e cancerígenos (BUCHELI e FENT, 1995). Além de ser um sistema de enzimas crucial para a transformação de xenobióticos, também tem uma expressiva função no metabolismo de várias substâncias endógenas, como na produção de hormônios esteróides e no metabolismo de ácidos graxos e seus derivados.

Embora existam diferenças entre o sistema de monooxigenases de mamíferos e peixes (geralmente baixa atividade da enzima, diferentes isoenzimas e a falta da indução por fenobarbital para peixes), o sistema tem características globais muito similares. Basicamente ele consiste de duas enzimas principais, a NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450. Conectadas com estas estão o citocromo b_5 e sua redutase, NADH-citocromo b_5 redutase (BUCHELI e FENT, 1995).

As subfamílias do citocromo P450 são classificadas considerando: o peso molecular monomérico, a composição de aminoácidos, a seqüência terminal de aminoácidos, a especificidade ao substrato, a distinção por anticorpos específicos e o tipo de reação em que estão envolvidas.

Há uma crescente utilização da indução da subfamília CYP1A como um biomarcador para indicar a exposição dos organismos a vários compostos indutores (STEGEMAN et al., 1992).

Em animais aquáticos, a subfamília CYP1A1 é expressa cataliticamente pela atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) que tem como substrato a 7-etoxiresorufina, participando de uma reação O-dealquilação (BUCHELI e FENT, 1995).

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade deste sistema de monooxigenases: a quantidade total de CYP1A, a atividade da EROD e a expressão do CYP1A (*Western blots*). Neste trabalho a atividade catalítica será avaliada pela atividade da EROD. Uma das vantagens primárias da utilização da atividade da EROD como biomarcador é a simplicidade de ser mensurada. Pode ser quantificada por espectrofotômetro ou espectrofluorímetro.

A alteração da atividade de isoenzimas específicas de citocromo P450 é uma resposta sensível à exposição dos animais a certos tipos de químicos antropogênicos, como os organoclorados. Esta exposição pode levar a uma estimulação da transcrição do gene CYP1A, mediada por estimulação do receptor, resultando no aumento do nível de mRNA específico, nova síntese de isoenzimas de citocromo P450 (CYP1A) e no aumento da respectiva atividade catalítica (EROD). Este aumento do conteúdo enzimático e/ou da atividade tem sido relatado por contaminação em numerosos estudos realizados (BUCHELI e FENT, 1995).

1.4.2 GST

O oxigênio é indispensável para a vida da maioria dos organismos, sendo utilizado como substrato de muitas enzimas. Muitas das reações nas quais esse elemento é utilizado geram as chamadas espécies ativas de oxigênio (EAO). Uma condição para o desenvolvimento da vida aeróbica é a presença de mecanismos de detoxificação das EAOs (STOREY, 1996). Muitos tipos de defesas estão envolvidos nesse processo, constituindo o chamado Sistema de Defesas Antioxidantes (SDA). Estes sistemas têm funções de prevenção, reparação e interceptação das EAO e podem ou não ser catalisados por enzimas. Um exemplo de defesa antioxidante que inclui compostos químicos não enzimáticos é a glutatona (GSH). Um SDA do tipo

enzimático inclui a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST).

As Glutathione S-transferases (GSTs) representam o maior grupo de enzimas detoxificantes. Esta superfamília de enzimas ocorre em seres procarióticos, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, peixes e mamíferos.

A enzima GST desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione.

O quociente entre a glutathione reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) na célula é um bom indicador dos níveis de estresse oxidativo. A GST catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com diversos tipos de xenobióticos ou componentes celulares danificados pelas EAO (STOREY, 1996).

As GSTs são classificadas como alfa, mi, pi, e teta, de acordo com suas propriedades físicas, químicas e imunológicas. Cada classe de GST pode ser diferentemente induzida por carcinógenos, poluentes ambientais e estresse oxidativo.

Animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos, os quais sofrem detoxificação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima glutathione S-transferase. Esta enzima de biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes de origem industrial e agrícola (CHO *et al.*, 1999).

1.4.3 Microscopia de luz

Técnicas morfológicas como microscopia de luz têm sido utilizadas em trabalhos de toxicologia, já que permitem avaliar possíveis efeitos de alguns xenobiontes em órgãos e tecidos alvo.

Segundo FENT (1996), os efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos.

WESTER e CANTON (1991) relatam que através da morfologia é possível tanto revelar os órgãos alvo mais afetados quanto detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes

aos quais foram expostos. A histopatologia permite, ainda, diferenciar lesões promovidas por doenças daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (SCHWAIGER *et al*, 1997).

Nesse trabalho foram analisados, através de biomarcadores morfológicos, dois órgãos vitais dos peixes do gênero *Astyanax* sp.: as brânquias e o rim posterior. O estudo com brânquias visa retratar a exposição hídrica aos contaminantes, uma vez que essas estruturas estão em contato direto e constante com a água do meio. O rim, por sua vez, foi selecionado por apresentar expressiva atuação na eliminação de compostos tóxicos. Enquanto as brânquias retratam exposição aguda frente aos contaminantes, os rins retratam exposição crônica.

1.4.3.1 Organização estrutural da brânquia

As brânquias formam o sistema respiratório dos peixes e, portanto, estão organizadas para poder realizar as trocas gasosas necessárias. Para que ocorram as trocas essenciais à sobrevivência desses organismos, as brânquias estão dispostas de forma a aproximar o sangue da água, o que facilita a absorção do O₂ e a liberação do CO₂.

Para que isso ocorra, porém, é necessária a exposição de um sistema de capilares, fato este que torna o tecido extremamente vulnerável em relação ao meio ambiente. Partículas como sedimentos, parasitas e/ou xenobióticos podem, dessa forma, causar efeitos prejudiciais às brânquias mais facilmente.

As brânquias da maioria dos teleósteos são compostas geralmente por quatro pares de arcos branquiais, que são sustentados por um esqueleto ósseo. Dos arcos branquiais partem filamentos sustentados por cartilagem (lamelas primárias), das quais partem as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são constituídas por um epitélio simples, no qual ocorrem as trocas gasosas (HICKMAN e TRUMP, 1969).

As brânquias são revestidas por um epitélio do tipo pavimentoso. Ele apresenta-se liso na região da lamela secundária e com microsaliências na região da lamela primária. As lamelas primárias são sustentadas por tecido cartilagenoso e possuem muitos vasos sanguíneos. As lamelas secundárias, por sua vez, são constituídas por três camadas de células: duas de células

pavimentosas (externas) e uma camada intermediária constituída de células pilares. Os prolongamentos das células pilares formam os capilares, através dos quais ocorrem as trocas gasosas.

1.4.3.2 Organização estrutural do rim

O rim dos vertebrados terrestres é o único órgão responsável pela excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Nos peixes, este órgão é auxiliado nesta tarefa pelas brânquias e outros tecidos como esôfago, intestino e epitélio opercular. Nas várias classes de vertebrados, encontramos diversos tipos de rins, adaptados ao ambiente onde o animal vive (HICKMAN e TRUMP, 1969; BEYENBACH, 1995).

O rim dos peixes teleósteos localiza-se dorsalmente, junto à coluna vertebral e é dividido em rim anterior, que contém o tecido hematopoiético, e rim posterior, que possui os glomérulos (unidades filtrantes) e os diversos túbulos (HICKMAN e TRUMP, 1969). A estrutura morfológica do rim dos teleósteos em geral é caracterizada por apresentar néfrons com corpúsculos renais (glomérulos e cápsula de Bowman).

O rim dos teleósteos de água doce possui glomérulos bem desenvolvidos e ricamente vascularizados, juntamente com túbulos proximais e distais, túbulos e ductos coletores (HICKMAN e TRUMP, 1969). Os glomérulos estão concentrados na região posterior e são responsáveis pela ultrafiltração do sangue, produzindo um fluido filtrado que dará origem à urina (HENTSCHEL e ELGER, 1989).

Na maioria dos peixes, o lugar predominante da hematopoiese está localizado no rim anterior, mas há porções desse tecido na região posterior. A maior parte desse tecido é composta por células precursoras do sangue. Também se encontram células indiferenciadas e células responsáveis pela defesa do organismo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar um ponto no interior da RPPN Fazenda Duas Barras, PR, e outro ponto no entorno, utilizando biomarcadores bioquímicos (atividade da GST e da EROD) e biomarcadores morfológicos (histopatologia de brânquias e rim), através do bioindicador *Astyanax* sp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto de contaminantes ambientais através da atividade da GST (Glutathione S-transferase) no bioindicador *Astyanax* sp.;
- Avaliar o impacto de contaminantes ambientais através da atividade da EROD (7-etoxiresorufina-O-deetilase) no bioindicador *Astyanax* sp.;
- Avaliar o impacto de contaminantes ambientais através da morfologia de células do rim e brânquias no bioindicador *Astyanax* sp.;
- Avaliar o uso da associação de diferentes classes de biomarcadores em *Astyanax* sp, na identificação dos efeitos tóxicos de poluentes na RPPN Fazenda Duas Barras.

Dessa forma, a pesquisa objetivou fornecer subsídios para que os órgãos responsáveis pelo gerenciamento ambiental possam desenvolver estratégias para um efetivo controle das alterações em Unidades de Conservação, devido, principalmente, ao uso de pesticidas em campos agrícolas do entorno dessas áreas. Tais estratégias devem interligar o manejo das UC's e ações de Educação Ambiental das comunidades vizinhas.

3 METODOLOGIA

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A Fazenda Duas Barras, localizada no município de Planaltina do Paraná, estrada de São Sebastião, possui uma área total de 866.20 hectares, sendo 533.7 hectares destinados para pastagem e 332.5 hectares compõem mata nativa. Desta, 171 hectares constituem Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) – (Fig. 2).

FIGURA 2 – Mapa da região do Estado do Paraná, indicando a cidade de Planaltina do Paraná e a Fazenda Duas Barras (ponto vermelho).



A RPPN Fazenda Duas Barras foi criada em 1998 e preserva mata nativa de Floresta Estacional Semidecidual. A área possui também importante papel na preservação hidrográfica (Bacia do Ivaí), já que possui nascentes e faz limite com o rio Ivaí. As atividades realizadas atualmente na área protegida abrangem turismo ecológico e pesquisa científica.

Vizinha à RPPN Fazenda Duas Barras há uma propriedade que cultiva arroz (Fig. 3). O limite entre as duas áreas se dá através do Ribeirão Saudade.

Segundo informações do agricultor responsável pela plantação de arroz dessa área, há pulverização de agroquímicos (*organoclorados*) uma vez ao ano, além de pulverizações periódicas ao longo do cultivo, quando necessário.

Devido a ampla utilização de contaminantes no entorno de áreas protegidas e a possibilidade de impactos nas Unidades de Conservação, é de suma importância o desenvolvimento de estudos de biomonitoramento nessas áreas.

Alguns trabalhos de revisão sintetizam os fatores que influenciam a dinâmica de pesticidas no ambiente. Essas pesquisas mostram que é grande o grau de dificuldade na avaliação de riscos de contaminação de ambientes aquáticos decorrente do uso dessas substâncias, dada a grande quantidade de processos envolvidos nessa dinâmica. Portanto, é de suma importância que trabalhos que visem contribuir para a diagnose desses contaminantes sejam realizados.

FIGURA 3 - Plantação de arroz à frente e vista parcial da RPPN aos fundos.



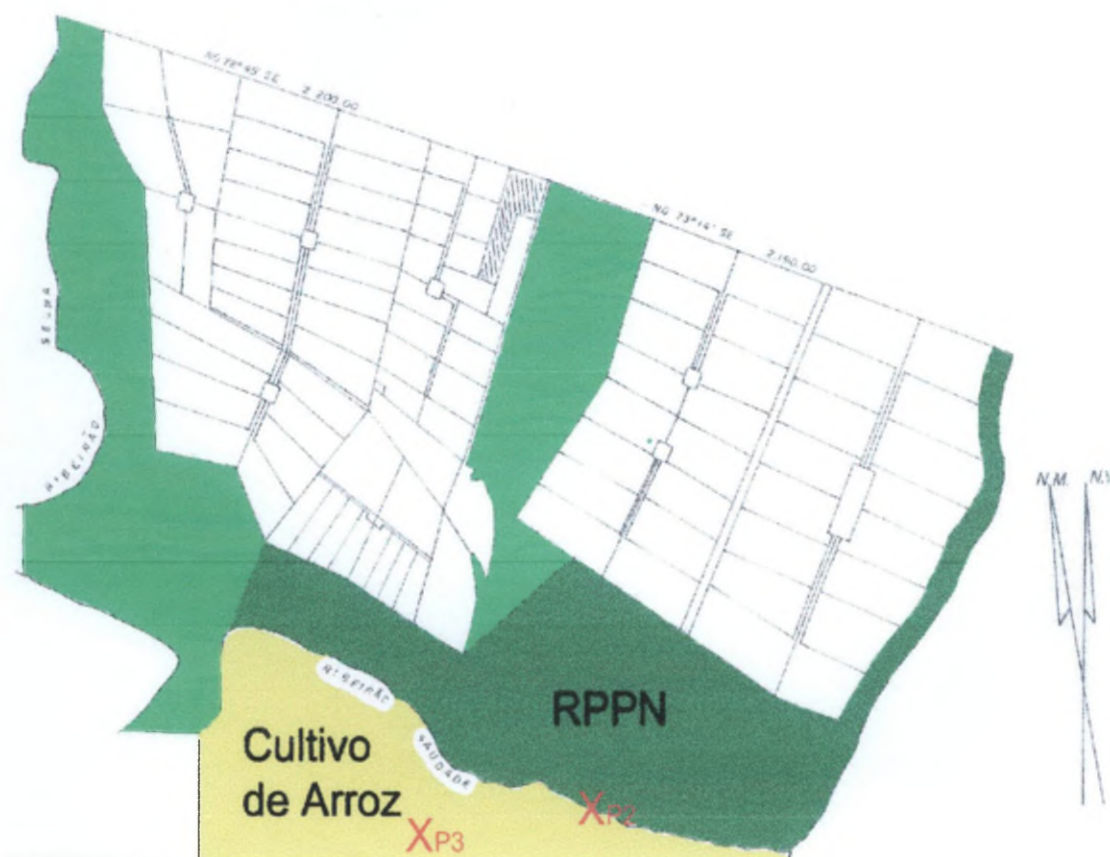
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Uma coleta piloto foi realizada em agosto de 2003 para verificar as espécies de peixes existentes e para demarcar os pontos de coleta. A partir desse esforço de campo, optou-se pela utilização da espécie *Astyanax* sp. como bioindicador, por sua ocorrência nos locais amostrados.

Foram amostradas três áreas dentro da RPPN e duas na plantação de

arroz vizinha, para escolha dos pontos de coleta. Dois pontos foram então definidos: um ponto dentro da RPPN (no Ribeirão Saudade), denominado P2; e outro ponto dentro da plantação de arroz, denominado de P3 (Fig. 5). A escolha dos pontos foi realizada seguindo critérios de facilidade de acesso e transporte do material, ocorrência da espécie em questão e localização em relação à administração dos pesticidas (Fig. 4).

FIGURA 4 - Mapa representativo da Fazenda Duas Barras (com a área protegida - RPPN) e do cultivo de arroz. Os pontos indicados em vermelho representam os locais de coleta., P2 na RPPN e P3 no cultivo de arroz.



Como não foram encontrados indivíduos do gênero *Astyanax* sp. em um ambiente que pudesse ser utilizado como referência, optou-se pela realização de um controle laboratorial, com peixes coletados na Fazenda de Piscicultura Águas Verdes, localizada no município de Araucária, região metropolitana de Curitiba, PR.

Em outubro de 2003 foi realizada a primeira coleta do projeto. O mês da

coleta foi definido por ser a época em que ocorreu a pulverização principal da lavoura de arroz. Aguardou-se a primeira chuva e logo em seguida (duas semanas após a pulverização), a primeira coleta foi realizada, nos pontos P2 e P3. Uma segunda coleta foi realizada no mês de maio de 2004, nos mesmos pontos amostrados na primeira coleta.

FIGURA 5 - Córrego formado pela irrigação do cultivo de arroz.



Os animais foram coletados com o auxílio de redes de espera (malha 1,5 cm), tarrafas e puçás. Após a coleta, os indivíduos foram levados vivos até o local de preparação das amostras, dentro da própria Fazenda Duas Barras.

Foram coletados 8 indivíduos por ponto amostrado, em ambas as coletas. Primeiramente, os animais foram sacrificados através de secção cervical e foram medidos os comprimentos padrão e total dos indivíduos. Em seguida, foram coletados, de cada exemplar, o segundo arco branquial esquerdo e, após secção ventral, retirou-se o fígado e o rim.

As amostras de fígado coletadas foram acondicionadas em criotubos devidamente identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

O segundo arco branquial esquerdo e o rim posterior foram fixados em ALFAC e depois desidratados em álcool, para posterior preparação das lâminas (ver item 3.4.4).

As amostras de fígado obtidas foram encaminhadas para o laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia, UFPR, onde foram transferidas para freezer -70°C , para posterior processamento e realização das análises bioquímicas. Já as amostras de rim e brânquias foram

levadas para o laboratório de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular, onde foram também processadas e analisadas.

O controle foi realizado através de análises em peixes do gênero *Astyanax* sp., previamente coletados e aclimatados em laboratório, durante 40 dias. A preparação das amostras seguiu a mesma metodologia descrita acima. Na Fazenda de origem, os animais foram retirados de tanques-rede (Fig. 6), em abril de 2004 e foram processados em maio do mesmo ano.

Para análise das enzimas propostas (itens 3.4.1 e 3.4.2), optou-se pela utilização de *pools* de fígado. Dos 8 indivíduos coletados, foram confeccionados 4 *pools* de 2 fígados cada. Para a histopatologia, cada indivíduo foi analisado separadamente.

FIGURA 6 - Tanques de criação dos peixes utilizados como Controle – Fazenda Águas Verdes, Araucária, PR.



3.3 DESCRIÇÃO DO BIOINDICADOR

Neste estudo, foi utilizado como bioindicador o lambari do gênero *Astyanax* sp. (Fig. 7), que segue a seguinte descrição taxonômica:

- Superordem Teleostei;
- Ordem Ostariophysoidei;
- Subordem Characioidea;
- Família Characidae.

O lambari é uma espécie nativa extremamente ativa e largamente distribuída no território brasileiro, sendo encontrado em grandes grupos

habitando rios, lagos e represas. O termo Lambari é uma designação (nome popular) a quase 150 espécies dos gêneros *Astyanax* sp, *Moenkhausia* sp, *Hyphessobryco* sp, *Hemigrammus* sp, e outros. Em outras regiões do Brasil, o lambari pode receber o nome de Piaba ou Canivete.

Os peixes do gênero *Astyanax* sp. são peixes de escamas, de pequeno porte, raramente ultrapassando 10 cm de comprimento total. Sua coloração é bastante variada. O gênero compreende espécies onívoras, que consomem vários itens alimentares vegetais e animais (flores, frutos, sementes, insetos, crustáceos, algas, detritos, etc.). A distribuição geográfica do gênero em questão se dá nas bacias Amazônicas, Araguaia-Tocantins, São Francisco, Prata e Atlântico Sul.

Essa espécie foi escolhida considerando sua ocorrência na área de estudo, além da relativa facilidade na captura e facilidade de aclimação.

FIGURA 7 - Imagem do bioindicador *Astyanax* sp.



Para este trabalho foram selecionados órgãos vitais do *Astyanax* sp., representantes de cada uma das vias de exposição ao xenobionte. Representando a via de exposição hídrica optou-se pela análise da brânquia, através da histologia. Representando a via de exposição trófica, por sua vez, optou-se pelo estudo bioquímico do fígado e pelo estudo histopatológico do rim posterior.

3.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS

3.4.1 Medida da atividade da EROD

3.4.1.1 Extração Enzimática

Para a análise da atividade da EROD, o fígado foi processado para a extração da fração S₉, baseando-se nas metodologias descritas por STEGEMAN (1992) e por SILVA DE ASSIS (1998).

As amostras (armazenadas em freezer -70°C) foram descongeladas em temperatura de 4°C e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,4, com auxílio do homogeneizador automático Potter – Elvehjem.

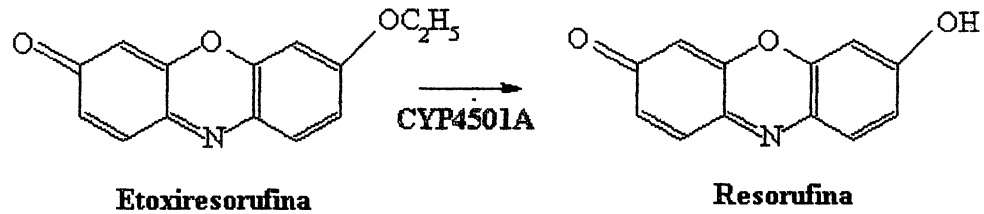
Foram confeccionados *pools* de dois fígados para realização da homogeneização. Portanto, do total de 8 peixes coletados por ponto, foram realizados 4 *pools*.

O homogeneizado utilizado como fonte de enzimas foi adquirido a partir da Fração S₉, obtida pela centrifugação de 30 minutos a 10000 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado (fração S₉) e o pellet desprezado. Foi preparado um homogeneizado 10% (peso do tecido / volume de tampão).

3.4.1.2 Análise da atividade da EROD

A atividade das monooxigenases, ou enzimas de biotransformação – oxigenases de função mista (MFOs), pode ser medida através de reações bioquímicas utilizando o substrato 7-etoxiresorufina. O substrato 7-etoxiresorufina é oxidado pela etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), formando resorufina, que é medida por fluorescência (Fig. 8).

FIGURA 8 - Reação química catalisada pelo CYP450, expressa sob a forma da enzima EROD (O = oxigênio; N = nitrogênio; OH = grupo hidroxila).



A atividade da EROD foi medida segundo o método de BURKE e MAYER (1974), modificado por SILVA DE ASSIS (1998) e adaptado às condições laboratoriais. O princípio do método consistiu na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-desetilação. A reação foi medida no espectrofluorímetro Shimadzu e calculada usando a curva do padrão externo ou curva de calibração. A medida enzimática foi realizada a partir da excitação 530 nm e emissão 590 nm.

Foram pipetados na cubeta do espectrofluorímetro 50 μl de cada *pool* (dosagem da proteína de 6,0 mg/mL do homogenato 10% preparado) e 430 μl do substrato 7ER (7-etoxiresorufina) na concentração de 5,0 μM . Essa solução foi incubada durante 5 minutos a 26,5°C. A reação foi iniciada com a adição de 20 μl de NaDPH 2,6 mM. A cinética enzimática foi realizada durante 15 minutos, sendo a fluorescência medida de 30 em 30 segundos. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$.

3.4.2 Medida da atividade da GST

3.4.2.1 Extração Enzimática

Seguindo a metodologia descrita para a extração enzimática realizada para a EROD, as amostras de fígado foram também descongeladas em temperatura de 4°C e homogeneizadas, mas nesse caso em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5.

Também foram realizados *pools* dos fígados nos diferentes pontos de coleta. Diferindo do descrito para a EROD, porém, no controle foram confeccionados 6 *pools*, para que houvesse disponibilidade de material para a

padronização da metodologia.

3.4.2.2 Padronização da medida de atividade da GST

A partir dos homogeneizados extras preparados a partir dos peixes utilizados como controle, foram realizados diferentes experimentos, no intuito de padronizar a metodologia para medida da atividade da GST.

Foi medida a atividade da glutathione-S-transferase em diferentes concentrações dos substratos CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e GSH (Glutathione na forma reduzida), a fim de se utilizar as concentrações mais indicadas para o bioindicador utilizado. Também foram utilizadas diferentes concentrações da enzima (diferentes diluições do homogeneizado).

Em uma diluição da enzima de 1/10 do homogeneizado 10% (peso do tecido / volume de tampão), foram utilizadas as seguintes concentrações do substrato GSH: 0,5mM, 1,0mM, 1,5mM, 2,0mM, 2,5mM, mantendo a concentração do CDNB fixa em 2,5mM.

Além da variação da GSH, foram utilizadas as seguintes concentrações do substrato CDNB: 0,5mM, 1,0mM, 1,5mM, 2,0mM, 3,0mM, mantendo a concentração do GSH fixa em 2mM.

Os reagentes com as concentrações acima citadas foram confeccionados a partir de soluções de GSH 10mM em tampão fosfato e de CDNB 60mM em etanol. As concentrações mencionadas dizem respeito ao reagente já presente na solução reação utilizada para análise da GST (150 μ l CDNB + 900 μ l GSH + 4950 μ l tampão fosfato 0,1M, pH = 6,5).

3.4.2.3 Análise da atividade da GST

As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância, através da leitura em microplacas.

A amostra de enzima já diluída (100 μ l) foi pipetada em microplaca, com adição de 200 μ l de solução reação, sendo que cada substrato seguiu as concentrações encontradas a partir da padronização da metodologia. Foram realizadas três réplicas de cada pool. O aumento linear da absorbância a

340nm foi monitorado e a atividade foi expressa em nmoles de conjugado GSH-CDNB produzido por minuto⁻¹ mg⁻¹ de proteína, usando-se o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar⁻¹ cm⁻¹.

3.4.3 Concentração Protéica

A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada em microplacas, segundo BRADFORD (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

3.4.4 Microscopia de Luz

O segundo arco branquial e a amostra de rim coletada permaneceram no fixador ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) por 16 horas. Em seguida as peças foram desidratadas em série crescente de álcoois 90% e 95% por 1 hora e em álcool 100% por 30 minutos duas vezes.

O material foi diafanizado utilizando-se 3 banhos de 5 minutos em xilol. A inclusão foi realizada em paraplast plus a 56°C por 2 horas.

Para a microtomia, os blocos foram mantidos em freezer por 15 minutos, a fim de facilitar a obtenção de bons cortes. Os cortes foram afixados às lâminas com albumina 1% e distendidos sobre uma chapa quente.

Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina 1%. Para o processo de coloração, as lâminas foram diafanizadas em xilol (dois banhos de 5 minutos cada), em seguida, hidratadas em série decrescente de álcoois (5 minutos em álcool 100%, 90% e 70%), imersas em água destilada e então coradas.

Após coloração, as lâminas passaram por uma desidratação para montagem das lâminas permanentes, em série de álcoois (70% lavar, 70% 1 minuto, 90% e 100% durante 5 minutos). Foram, então, novamente diafanizadas com xilol e finalmente montadas com resina e lamínula.

As características morfológicas foram analisadas em microscópio de luz.

3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados da análise das atividades enzimáticas foram analisados estatisticamente por Anova de uma via, seguido da Prova de Tukey para comparação entre os grupos, com nível de significância maior que 0,05.

4 RESULTADOS

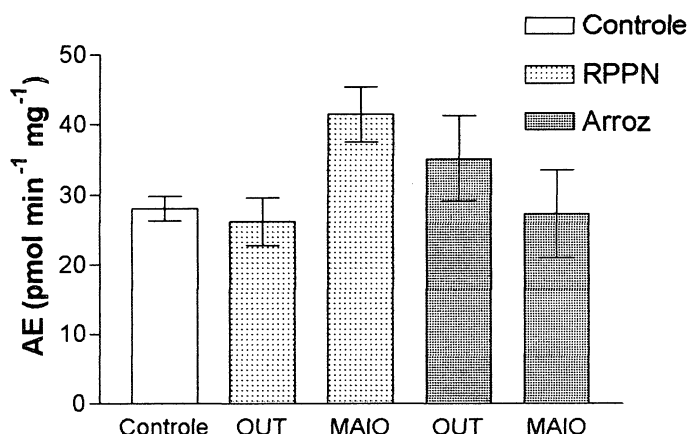
4.1 EROD

4.1.1 Análise da atividade da EROD

Utilizando a metodologia descrita acima, foi realizada a análise da atividade da EROD nos lambaris do ponto Controle, de dentro da RPPN (coleta de outubro/2003 e maio/2004) e de dentro da plantação de arroz (coleta de outubro/2003 e maio/2004).

Não foi observada alteração significativa da atividade da EROD em nenhum dos pontos analisados, como é possível observar no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - Atividade específica (AE) da EROD ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) no fígado de *Astyanax* sp, nos grupos controle, da RPPN e da plantação de arroz, em diferentes épocas do ano.



4.2 GST

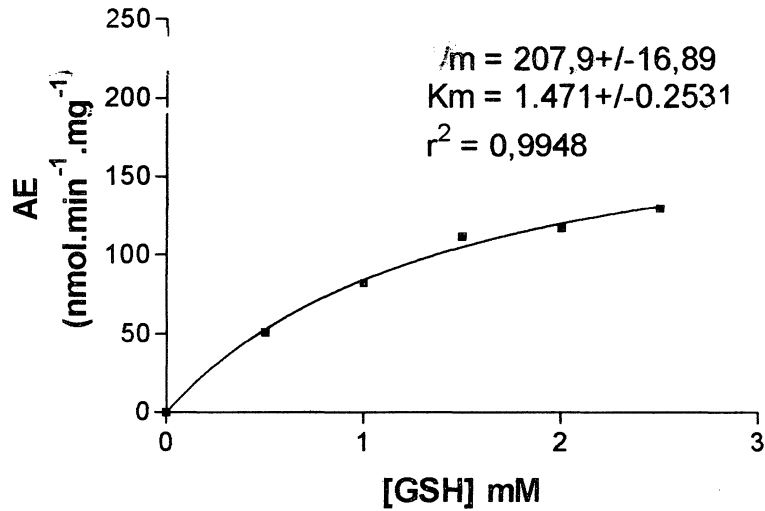
4.2.1 Padronização da medida de atividade da GST

Os resultados da padronização da metodologia para análise da atividade da glutathione-S-transferase em *Astyanax* sp foram obtidos através da análise dos espécimes controle, processados em laboratório.

O Gráfico 2, Curva de Substrato, representa a variação da atividade da enzima GST no fígado do lambari, segundo a concentração do substrato

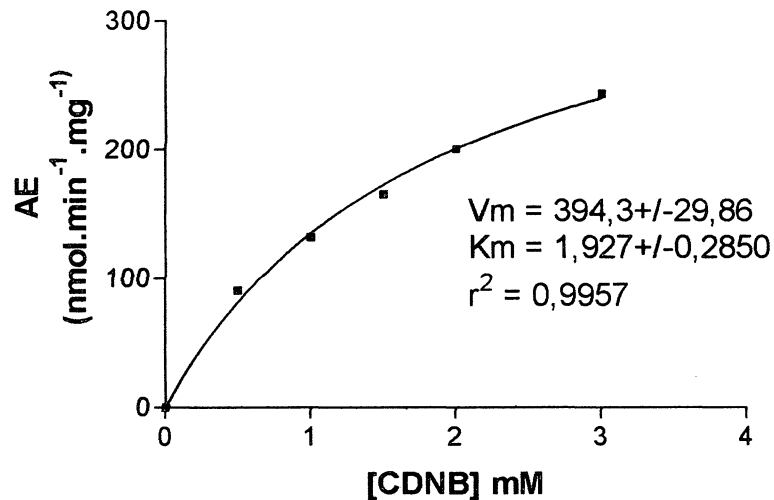
GSH. A dosagem da proteína foi de 6,0 mg/mL de um homogenato 10%.

GRÁFICO 2 - Curva de substrato GSH.



O Gráfico 3, Curva de Substrato, representa a variação da atividade da enzima GST no fígado do lamabari, segundo a concentração do substrato CDNB. A dosagem da proteína foi de 6,0 mg/mL de um homogenato 10%.

GRÁFICO 3 - Curva de substrato CDNB.



Através dos resultados obtidos, optou-se pela utilização da concentração de 2,0 mM do substrato GSH e da concentração de 2,5 mM do substrato CDNB, ambas na solução reação, para a medida da atividade da GST em

Astyanax sp, a partir de uma amostra com concentração protéica de 6,0 mg/mL.

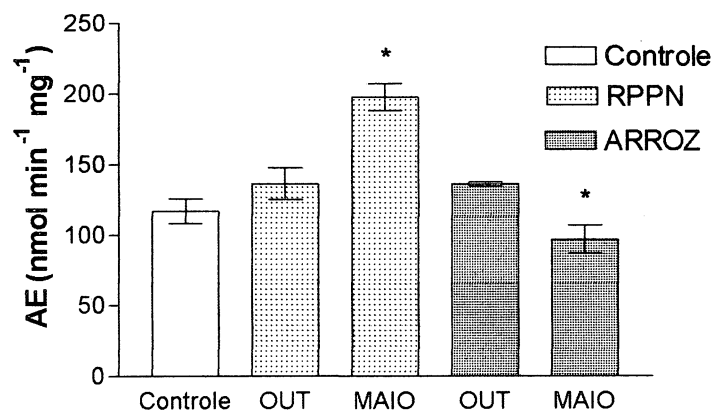
4.2.2 Análise da atividade da GST

Seguindo a padronização descrita acima, foi realizada a análise da atividade da GST nos lambaris do ponto Controle, de dentro da RPPN (coleta de outubro/2003 e maio/2004) e de dentro da plantação de arroz (coleta de outubro/2003 e maio/2004).

Foi observado um aumento significativo da atividade da GST no grupo coletado dentro da RPPN, coleta de mai/2004, em relação aos demais grupos, como é possível observar no Gráfico 4.

Foi observada, ainda, uma diminuição significativa na atividade da GST no grupo coletado na plantação de arroz, coleta de mai/2004, apenas em relação ao mesmo ponto, coleta de out/2003, conforme o Gráfico 4.

GRÁFICO 4 - Atividade específica (AE) da GST ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) no fígado de *Astyanax* sp, nos grupos controle, da RPPN e da plantação de arroz, em diferentes épocas do ano.



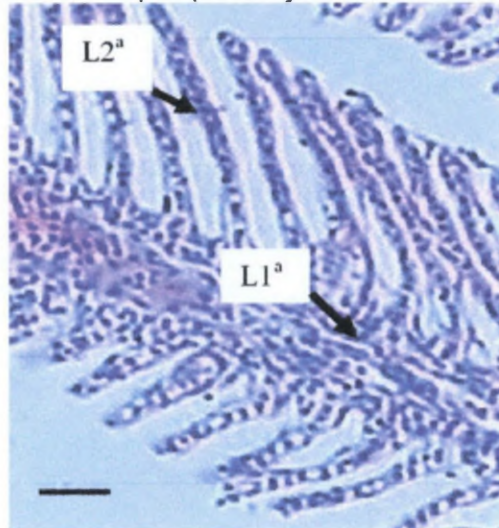
4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

4.3.1 Análise da estrutura branquial de *Astyanax* sp.

As imagens apresentadas a seguir são imagens de lâminas analisadas em microscopia de luz, coradas com hematoxilina e eosina.

Na estrutura das brânquias observaram-se as lamelas primárias e secundárias e estrutura das células epiteliais. A Figura 9 apresenta a estrutura de uma porção da brânquia de um indivíduo do grupo controle.

FIGURA 9 - Brânquia de *Astyanax* sp. Estrutura da lamela primária (L1^a) e secundária (L2^a) de um exemplar do grupo controle. Barra = 50µm (coloração: hematoxilina-eosina).



Foram observadas alterações morfológicas nas brânquias dos exemplares de dentro da RPPN (coleta de out/2003 e maio/2004) e do cultivo de arroz (coleta de out/2003 e maio/2004), quando comparados aos peixes do grupo controle.

O exame histopatológico permitiu observar hiperplasia do epitélio branquial acompanhadas de fusão das lamelas secundárias adjacentes. A Figura 10 exemplifica uma área de fusão. Observaram-se ainda desenvolvimento de aneurismas nas regiões de fusão e na extremidade distal das lamelas (Fig. 11 e Fig. 12). Essas lesões foram verificadas em exemplares coletados no interior da RPPN e do cultivo de arroz, nas coletas de outubro/2003 e maio/2004.

FIGURA 10 - Fusão das lamelas branquiais observadas em *Astyanax* sp. coletado na RPPN. Barra = 50 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).

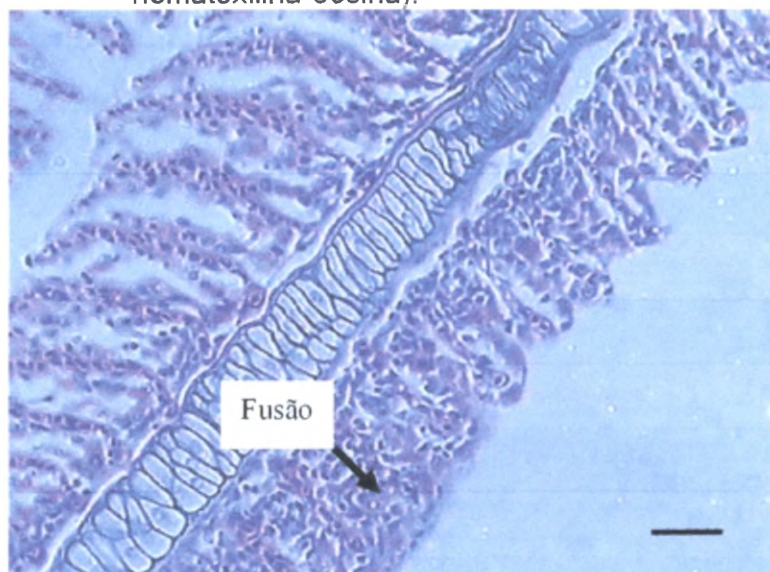


FIGURA 11 - Aneurisma na região de fusão de lamelas observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz. Barra = 25 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).

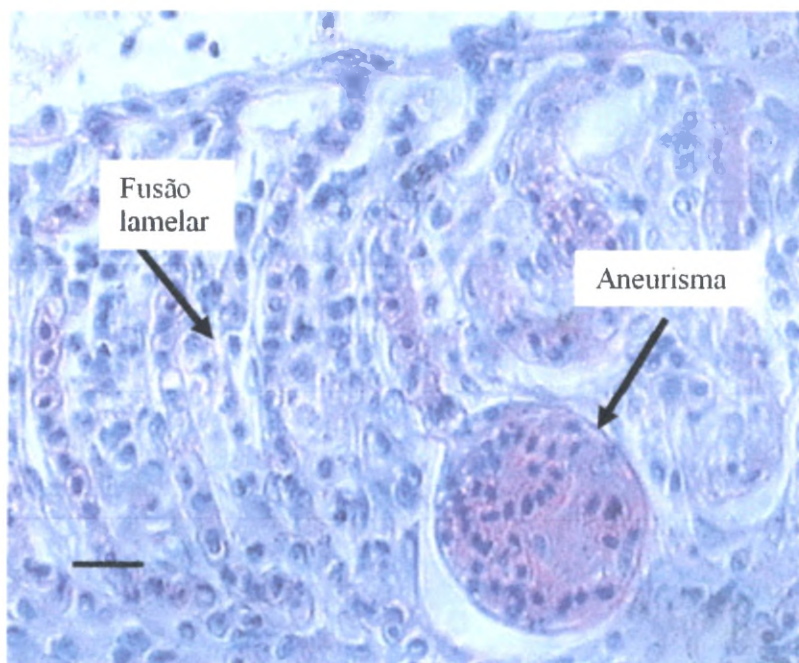
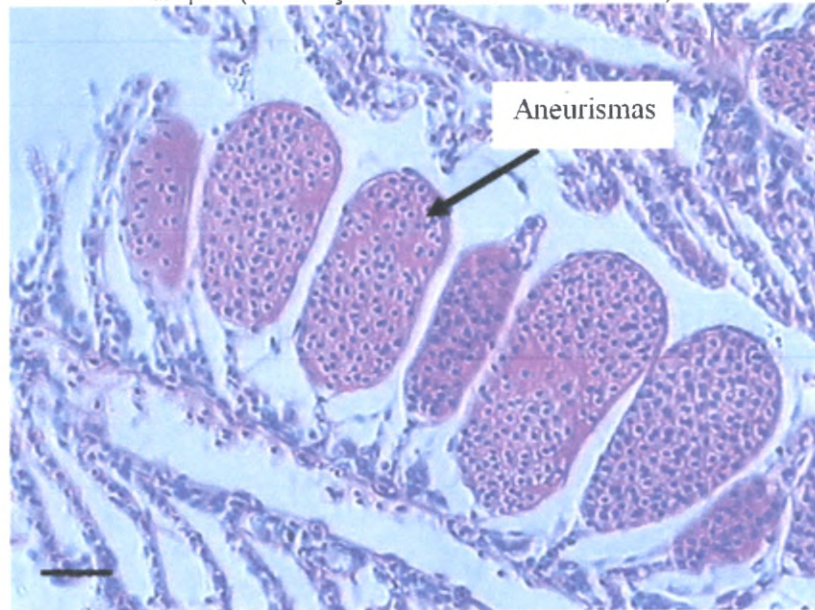


FIGURA 12 - Aneurismas nas extremidades distais das lamelas observados em *Astyanax* sp coletado na RPPN. Barra = 25µm (coloração: hematoxilina-eosina).



A ocorrência de hiperplasia e o desenvolvimento de aneurismas foram considerados em cada organismo, sendo calculada uma porcentagem total de cada grupo (cada coleta), considerando-se ausência ou presença dessas alterações, conforme indicado nos Gráficos 5 e 6.

GRÁFICO 5 – Porcentagem de hiperplasia observada nas brânquias de *Astyanax* sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano.

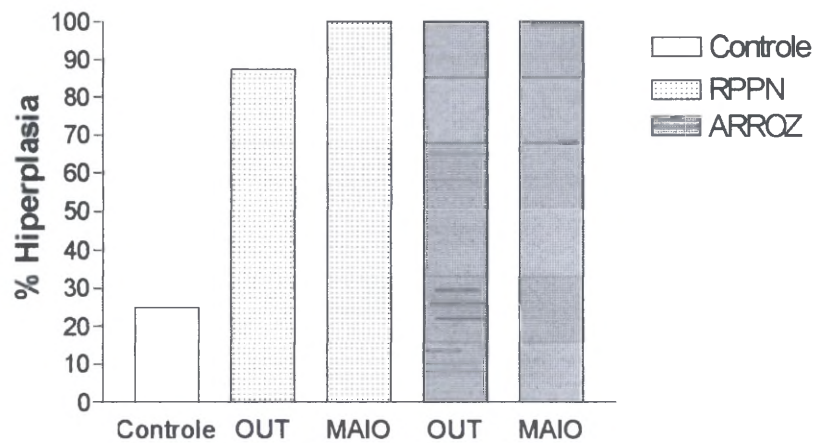
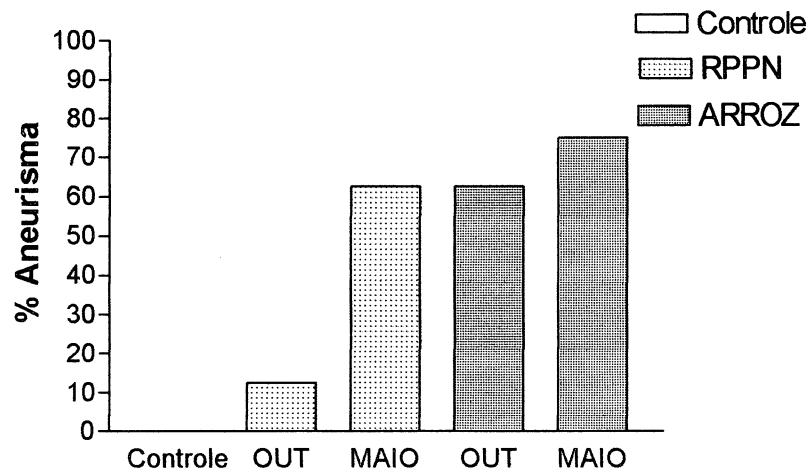


GRÁFICO 6 – Porcentagem de aneurisma observada nas brânquias de *Astyanax* sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano.



O grupo controle apresentou 25% dos organismos com hiperplasia, mas a aparência geral do tecido era mais saudável se comparada às brânquias dos indivíduos do ponto P2 e P3. Nos animais controle não observada a presença de aneurismas.

Na coleta de out/2003, no ponto P2 (RPPN), foram verificados 87,5% dos indivíduos com hiperplasia das células epiteliais e apenas 12,5% com aneurisma. Em contrapartida, a coleta de maio/2004, no mesmo ponto, apresentou 100% dos indivíduos com hiperplasia e 62,5% com aneurisma.

Na coleta de out/2003, no ponto P3 (Arroz), foram verificados 100% dos indivíduos com hiperplasia das células epiteliais e 62,5% com aneurisma. Na coleta de maio/2004, no mesmo ponto, a ocorrência continuou alta, havendo 100% dos indivíduos com hiperplasia e 75% com aneurisma.

Para a fusão lamelar, todavia, foi realizada uma abordagem diferenciada, quantificando em cada organismo o percentual de fusão, conforme mostra a Tabela 1.

TABELA 1 – Metodologia de quantificação utilizada na análise da fusão de lamelas secundárias nas brânquias de *Astyanax* sp.

Classe	Severidade	Extensão
-	Ausência	Ausência
+	Poucas alterações	0% a 25% das lamelas primárias com fusão de lamelas secundárias
++	Suave a moderada	26% a 50% das lamelas primárias com fusão de lamelas secundárias
+++	Moderada a severa	51% a 75% das lamelas primárias com fusão de lamelas secundárias
++++	Severa	76% a 100% das lamelas primárias com fusão de lamelas secundárias

Os resultados encontrados seguem na Tabela 2 abaixo ilustrada.

TABELA 2 - Análise da fusão das lamelas secundárias nas brânquias de *Astyanax* sp., nos ponto Controle, RPPN e arroz, em diferentes épocas do ano.

Indivíduo	Controle	RPPN Out/2003	RPPN Maio/2004	ARROZ Out/2003	ARROZ Maio/2004
1	-	+	++++	+	++++
2	-	+++	++++	++	+
3	+	+	++	++	+
4	-	+++	++++	++++	++++
5	-	++	++	++	+
6	-	++	+++	++++	++
7	-	++	++++	++	++
8	+	++	++++	++	+++

A Tabela 2 mostra que do mês de outubro de 2003 para maio de 2004, na região da RPPN, a severidade da alteração aumentou, sendo que na segunda coleta, 62,5% dos indivíduos apresentaram lesão do tipo severa, ou seja, mais de 75% das lamelas com fusão.

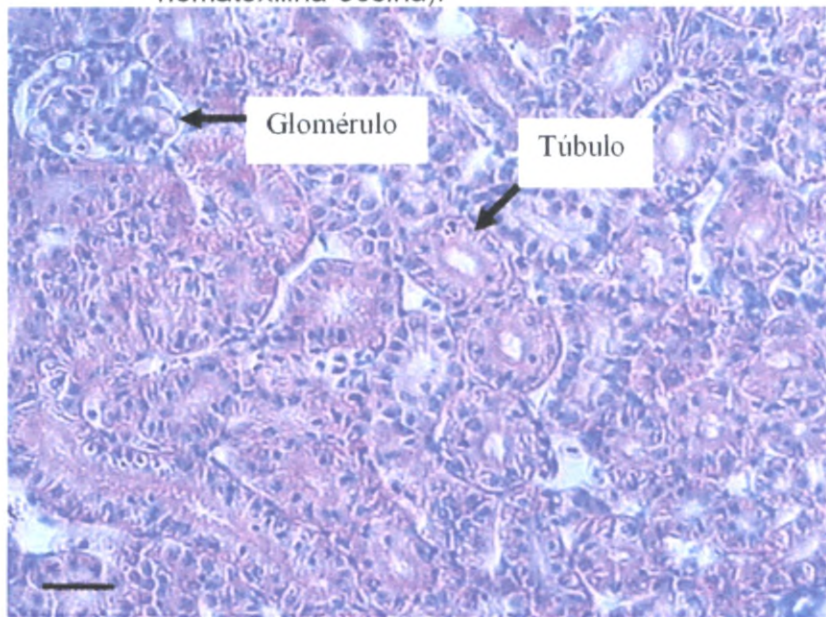
Já nos peixes coletados no interior do cultivo de arroz, pode-se dizer que o grau das alterações foi muito semelhante entre as duas coletas realizadas, com apenas 25% dos indivíduos com lesão do tipo severa.

Vale salientar, entretanto, que 100% dos indivíduos, na RPPN e na plantação de arroz, em ambas as coletas, apresentaram fusão lamelar, mesmo que com diferentes graus de severidade.

4.3.2 Análise da estrutura renal de *Astyanax* sp.

O rim posterior do lambari é composto de túbulos e ductos coletores, possui glomérulos bem desenvolvidos distribuídos no parênquima renal e apresenta vasos contendo eritrócitos (Fig. 13). No tecido observaram-se, ainda, células sanguíneas, porém estas não foram identificadas.

FIGURA 13 – Rim posterior de *Astyanax* sp. Glomérulo e túbulo de um exemplar do grupo controle. Barra = 50 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).



Foram observadas alterações morfológicas nos rins dos exemplares de dentro da RPPN (coleta de out/2003 e maio/2004) e do cultivo de arroz (coleta de out/2003 e maio/2004), quando comparados aos peixes do grupo controle.

O exame histopatológico permitiu observar alterações degenerativas como necrose do parênquima renal (Fig. 14), além da presença de grande quantidade de sangue neste parênquima (Fig. 15). Foram observadas, ainda, inclusões citoplasmáticas nos ductos, como indica a Figura 16.

FIGURA 14 – Necroses e extravasamento de sangue no rim posterior: observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz. Barra = 50 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).

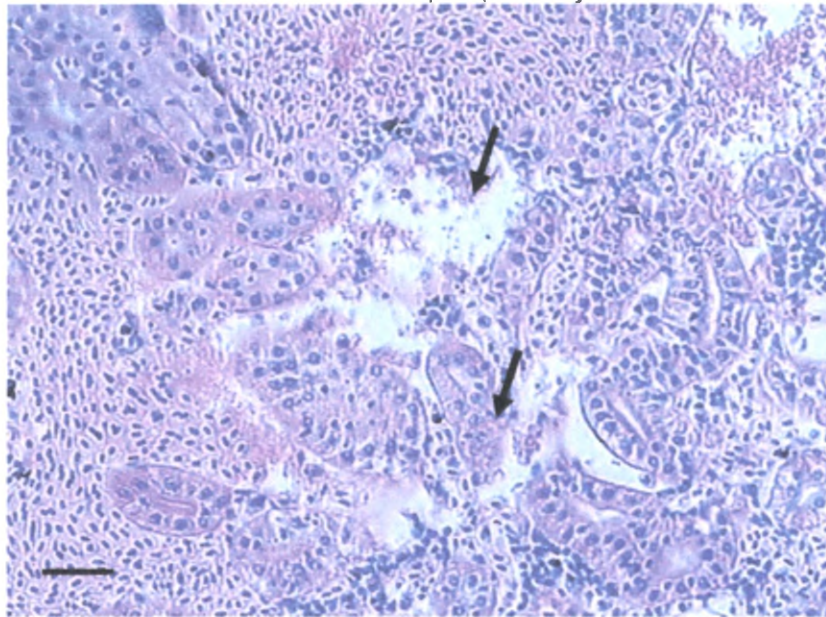


FIGURA 15 - Extravasamento de sangue no tecido do rim posterior observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 50 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).

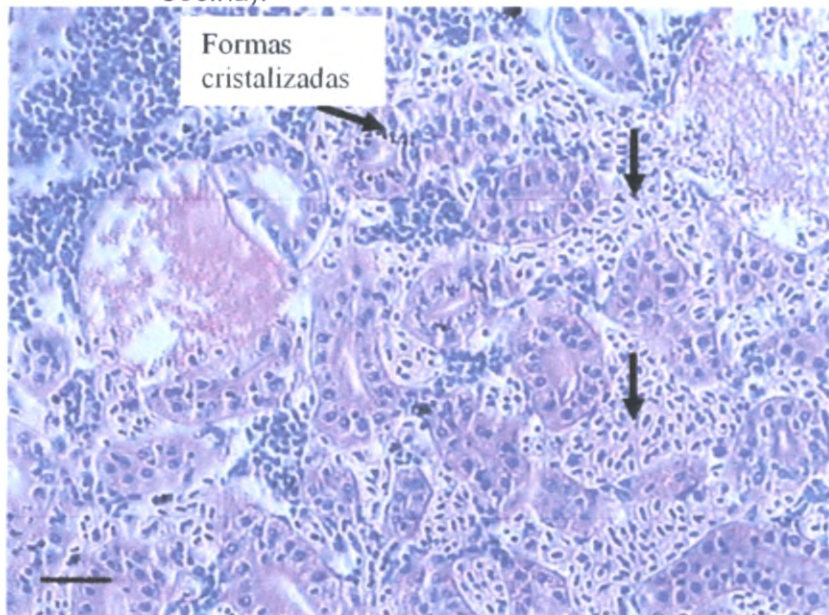
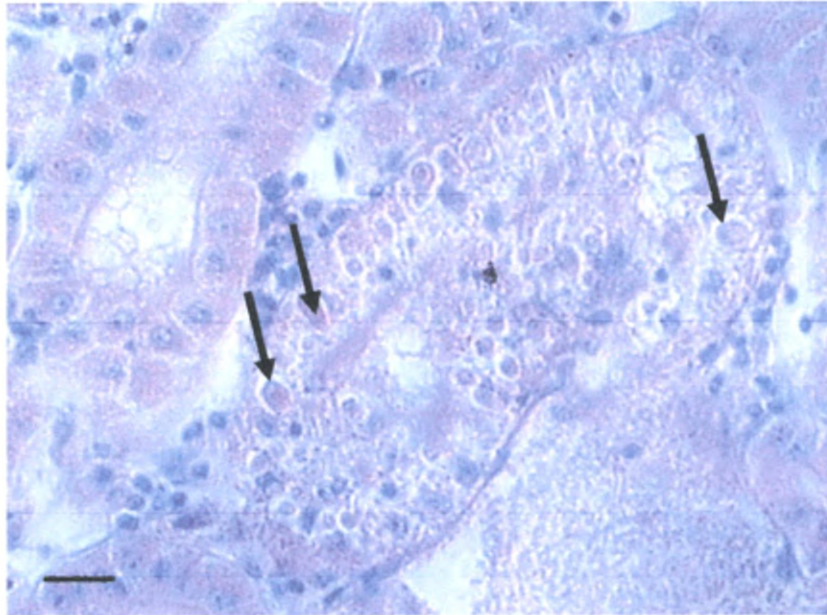
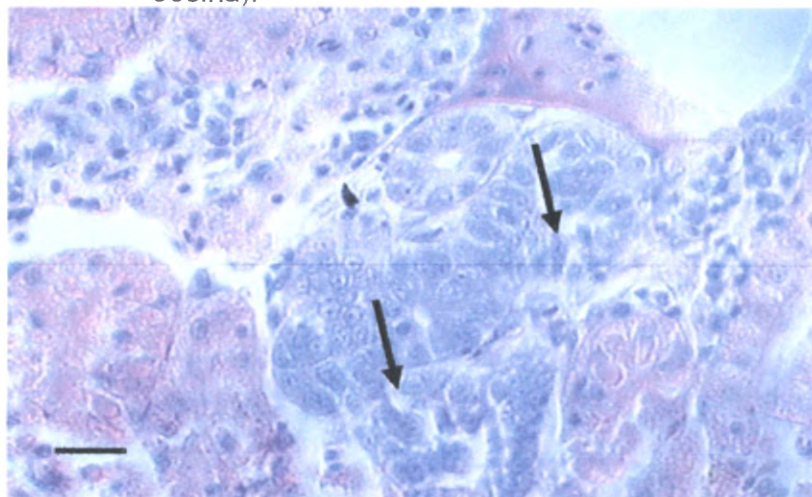


FIGURA 16 - Inclusões citoplasmáticas nos ductos do rim posterior: observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 25 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).



Em alguns indivíduos os ductos apresentaram formas cristalizadas, como representado na Figura 15, que podem não estar relacionadas a alterações causadas por xenobióticos, mas sim com a própria formação da urina. Foram observados, também, ductos com colorações diferenciadas, que podem estar relacionados à formação de novos néfrons, como indica a Figura 17.

FIGURA 17 - Ductos com coloração diferenciada no rim posterior: observado em *Astyanax* sp. coletado no interior do cultivo de arroz (setas). Barra = 25 μ m (coloração: hematoxilina-eosina).



Os indivíduos do grupo controle não apresentaram necrose e nem presença de sangue extravasado no tecido.

Os Gráficos 7 e 8 indicam que na coleta de out/2003, na RPPN, foram verificados 62,5% dos indivíduos com necrose das células renais e 62,5% com presença de sangue no tecido. Em contrapartida, a coleta de maio/2004, no mesmo ponto, apresentou 100% dos indivíduos com necrose e 87,5% com sangue no tecido. Na coleta de out/2003, no cultivo de arroz, foram verificados 100% dos indivíduos com necrose das células renais e 50% com presença de sangue no tecido. Na coleta de maio/2004, no mesmo ponto, a ocorrência continuou alta, havendo 100% dos indivíduos com necrose e 75% com sangue no tecido.

GRÁFICO 7 – Porcentagem de necrose observada no rim posterior de *Astyanax* sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano.

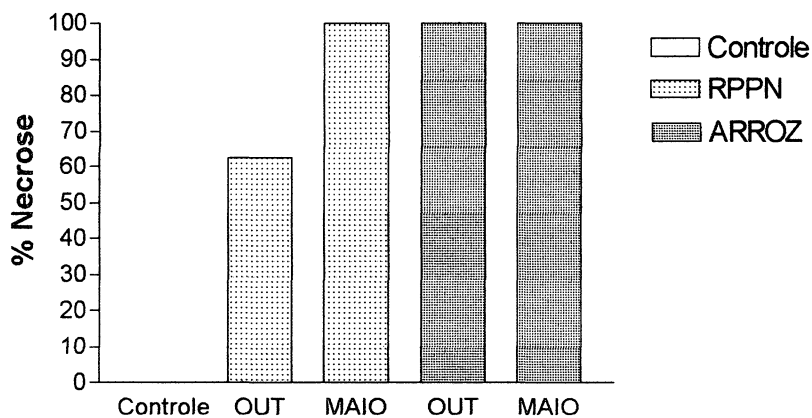
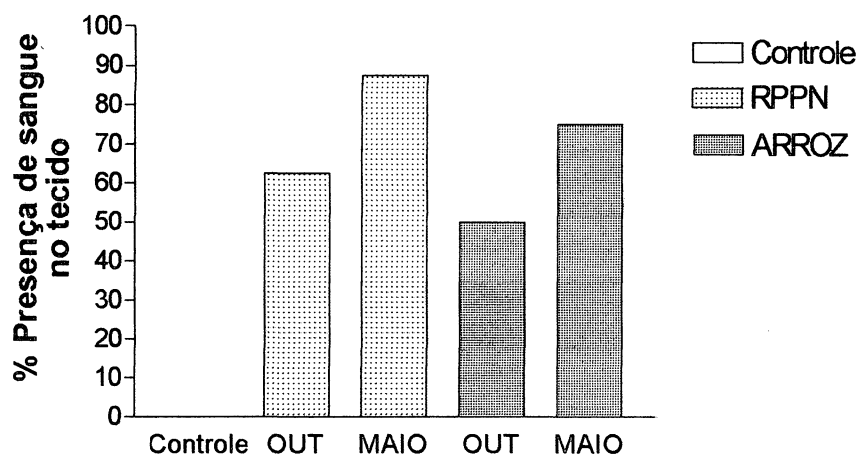


GRÁFICO 8 – Porcentagem da presença de sangue no rim posterior de *Astyanax* sp. nos grupos controle, da RPPN e do cultivo de arroz, em diferentes épocas do ano.



As inclusões citoplasmáticas nos ductos, indicadas na Figura 16, foram visualizadas nos organismos coletados na RPPN e no interior do cultivo de arroz, na coleta de maio/2004, não ocorrendo nos pontos amostrados em out/2003.

Os ductos com colorações diferenciadas foram visualizados apenas nos organismos coletados no interior do cultivo de arroz, na coleta de maio/2004.

5 DISCUSSÃO

Os danos causados por efluentes nos ecossistemas aquáticos vêm sendo estudados mais intensamente ao longo dos últimos 20 anos (WESTER *et al.*, 1994), especialmente pela intensificação das ações antrópicas consideradas impactantes. Para isso, vêm se desenvolvendo estudos de biomonitoramento.

Entretanto, ainda a maior parte da bibliografia disponível detecta a presença dos organoclorados nos tecidos dos peixes através de exames químicos, havendo, comparativamente, poucas referências sobre análises com biomarcadores (bioquímicos, morfológicos, genéticos, entre outros). Além disso, poucos estudos analisam mais de um biomarcador em monitoramento de campo, que representa, geralmente, exposição a diversos tipos de pesticidas.

Ultimamente, porém, tantos os biomarcadores morfológicos quanto os bioquímicos vêm sendo empregados com maior frequência, utilizando peixes como bioindicador ou como modelo biológico (COUILLARD *et al.*, 1999; AALTONEN *et al.*, 2000; STEPANOVA *et al.*, 2000; COSTA, 2001; NICARETA, L., 2004).

Nesse contexto, diversos trabalhos que objetivam a busca de biomarcadores e bioindicadores sensíveis e específicos a cada classe de contaminantes têm sido desenvolvidos (SCHAWAIGER *et al.*, 1997). No presente estudo, três biomarcadores diferentes foram testados na espécie *Astyanax* sp.

Em áreas contaminadas, a exposição de organismos a xenobiontes indica interações entre essas substâncias químicas e os sistemas biológicos, interações essas, que podem resultar em distúrbios bioquímicos e/ou respostas adaptativas dos organismos (MASFARAUD *et al.*, 1992).

Na maioria das vezes, os processos metabólicos de biotransformação de fase I e fase II são necessários para detoxificação e excreção desses xenobiontes em animais aquáticos (GOKSOYR e FÖURLIN, 1992). Em alguns casos, dependendo da concentração e tipo dos xenobióticos, essas biotransformações podem envolver reações de oxidação, produzindo espécies ativas de oxigênio (EAO) (KARUZINA e ARCHAKOV, 1994). Essas espécies

reativas podem reagir com ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e proteínas, danificando a célula. As EAO ativam os sistemas de defesa antioxidante, como o complexo enzimático glutathione S-transferase (GST). Considerando os riscos que as espécies reativas trazem aos organismos, incluindo os aquáticos, a medida de tais parâmetros enzimáticos pode ser utilizada como biomarcador de exposição a poluentes.

Seguindo esse contexto, a medida da atividade da GST realizada nesse projeto visou utilizar um biomarcador do sistema de estresse oxidativo, na tentativa de demonstrar ou verificar possíveis alterações na espécie de lambari *Astyanax* sp, exposto a organoclorados utilizados no cultivo de arroz.

A indução da atividade da GST verificada na coleta de maio/2004, no interior da RPPN, sugere um aumento do metabolismo dos animais, no intuito de detoxificação, consequência da exposição a xenobióticos. A indução da GST em relação à exposição a xenobióticos de origem agrícola já foi citada diversas vezes na literatura, como mostram os trabalhos de EGAAS *et al.* (1999); CHO *et al.* (1999) e JONSSON *et al.* (2001).

Todavia, não foi verificada alteração significativa da GST nos animais coletados no cultivo de arroz, em nenhuma das coletas realizadas, em relação ao ponto controle. O que se observou em relação à área do cultivo de arroz foi uma inibição da atividade da GST no período de outubro/2003 a maio/2004. Essas observações poderiam ser explicadas pelo fato dos peixes situados na área de plantação do arroz terem permanecido em contato direto com os organoclorados utilizados (por sua persistência no ambiente), o que poderia ter ocasionado uma adaptação metabólica. A habilidade de biotransformação de pesticidas por peixes tem sido reportada por diversos estudos, como BAKER (1963), CREANEN *et al.* (1965) e LUDEK *et al.* (1972), o que sustenta tal argumentação.

Em contrapartida, os peixes da RPPN ainda se comportam de maneira a detoxificar possíveis contaminantes. Essa situação também pode ser explicada pelo fato desses peixes se situarem num rio (Rio Saudade) que desemboca nas águas do Rio Ivaí. Como o Rio Ivaí é um rio de grandes proporções e recebe efluentes de diversas origens antrópicas, há possibilidade de um impacto nas áreas ribeirinhas, como na RPPN Fazenda Duas Barras. Essa

conjuntura não seria viável para o cultivo do arroz, pois a área está isolada, sendo irrigada artificialmente.

Portanto, não há como descartar a idéia de impacto na área protegida, seja ele provindo de efluentes do Rio Ivaí ou dos organoclorados utilizados na plantação vizinha. Os peixes amostrados na área de cultivo de arroz, por outro lado, não apresentaram alterações enzimáticas, mas apresentaram alterações morfológicas, o que reforça a possibilidade de impactos causados por xenobióticos como os organoclorados.

Em relação a EROD, NICARETA, L. (2004) mostrou que é possível quantificar a atividade tanto na fração S₉, quanto na microsomal, já que nas duas verificou-se a possível indução da EROD. A utilização da fração S₉ em programas de biomonitoramento ambiental facilita a medida do CYP1A, por dispensar ultracentrifugação e diminuir a quantidade de reagentes e etapas técnicas, desde que a amostra esteja padronizada. Esses argumentos justificam a escolha da fração S₉ no presente estudo.

As análises da enzima EROD realizadas não demonstraram alteração significativa nas áreas da RPPN e do cultivo de arroz, quando comparadas ao controle. As mudanças enzimáticas de cada ponto, porém, seguiram um padrão semelhante àquelas observadas a partir da GST, mesmo que não significativas.

Esse fato sugere que a atividade da EROD poderia ter sofrido uma adaptação mais rápida se comparada à atividade da GST, sendo que a GST estaria respondendo a um efeito mais crônico, enquanto que a EROD a um efeito mais agudo de possível contaminação, por estar relacionada ao metabolismo de fase I. Portanto, em maio/2004 o metabolismo poderia já ter voltado a um nível considerado normal, comparando-se ao controle, adaptação esta já encontrada em casos citados pela literatura (BAKER, 1963; CREANEN *et al.*, 1965 e LUDEK *et al.*, 1972).

Outro argumento viável poderia ser a utilização de um número amostral relativamente pequeno. Para confirmar as hipóteses levantadas, entretanto, seria necessária a realização de um novo estudo que considerasse essas questões, não descartando a utilização do biomarcador EROD no biomonitoramento de áreas possivelmente impactadas com organoclorados.

Quanto ao sexo dos animais, não houve possibilidade de correlação com as atividades enzimáticas, pois houve dificuldade de coleta de número amostral grande nos meses estudados, o que possibilitaria a manipulação dessa variável. Os *pools*, portanto, foram confeccionados sem considerar esse fato, o que pode também ter influenciado os resultados obtidos.

Nesse contexto, vale citar a dificuldade encontrada nas coletas de outubro/2003 e maio/2004, quando comparado à coleta piloto realizada anteriormente. O fato de não se encontrar muitos indivíduos nos pontos de coleta poderia ser também um indicio de hostilidade ambiental, consequência possível da administração de agrotóxicos na região. Pescadores que trabalham no trecho do Rio Ivaí próximo à RPPN, chegaram a comentar a dificuldade de pegar lambaris nas duas épocas em que foram realizadas as coletas para esse trabalho.

Foram observadas alterações morfológicas em todos os pontos amostrados, nas diferentes épocas, não havendo, portanto, dentro das áreas investigadas nenhuma que estivesse completamente livre de algum tipo de impacto antropogênico.

Como as alterações morfológicas foram visualizadas tanto dentro da RPPN, quanto na área de cultivo de arroz, os organoclorados utilizados podem estar alterando a integridade dos órgãos e tecidos estudados.

Foi possível verificar, ainda, que as percentagens das lesões aumentaram da coleta de outubro/2003 para maio/2004, fato este que corrobora a característica de persistência dos organoclorados no ambiente e o caráter crônico deste tipo de resposta, que possivelmente continuou ocasionado alterações morfológicas, mesmo sem novas aplicações nesse intervalo de tempo.

As modificações encontradas nas brânquias do lambari *Astyanax* sp. sofreram o mesmo padrão de resposta das lesões quando se compara a coleta de outubro/2003 com a de maio/2004.

Alterações nas brânquias podem indicar tanto situações de estresse crônico quanto agudo, pois este órgão responde prontamente a alterações ambientais (OLIVEIRA RIBEIRO, 2000).

Os peixes estudados apresentaram hiperplasia e fusão de lamelas secundárias, o que pode estar relacionado à exposição a xenobiontes, como os

organoclorados. Este tipo de alteração representa uma resposta à exposição a diversas classes de xenobiontes (OLIVEIRA RIBEIRO, 2000). KHAN *et al.* (1994) observou hipertrofia e hiperplasia celular, além de fusão lamelar em *P. americanus* expostos a contaminantes químicos.

A alteração do tipo aneurisma visualizada em muitos exemplares estudados poderia estar associada à forma como esses indivíduos foram sacrificados (secção cervical). Porém, essa hipótese foi descartada a partir do momento que o estudo dos peixes do grupo controle não demonstraram tal alteração. Os aneurismas foram visualizados apenas nos peixes da RPPN e do cultivo de arroz, fato este que corrobora com a possibilidade de impacto dessas áreas.

Em relação ao rim, houve registro de necrose, tanto na RPPN, quanto no cultivo de arroz, em ambas as coletas. Esse tipo de lesão já foi visualizada em alguns outros estudos, nos quais diferentes espécies de peixes foram expostos a organoclorados (ZAPATA *et al.*, 2000). Os ductos com coloração diferenciada, como os visualizados nos peixes do cultivo de arroz da coleta de maio/2003, podem sugerir áreas de produção de novas estruturas renais (formação de novos néfrons), no intuito de provável reposição do tecido lesado.

Áreas de rica vascularização foram encontradas em muitos exemplares examinados. JENSEN *et al.* (1993), em análises de fígado, relaciona esse aumento da vascularização com um aumento da demanda metabólica dos indivíduos. Embora o presente estudo tenha sido realizado em rim, pode estar ocorrendo uma reação semelhante à proposta por JENSEN *et al.* (1993), pois o estudo enzimático apresentado verificou alteração da atividade metabólica nos mesmos indivíduos.

KUSMA, J. (2003) verificou em suas análises a presença de cristalizações nos túbulos renais de *Geophagos brasiliensis*, semelhantes às encontradas nos peixes do arroz, coleta de maio/2004. A autora atribuiu como causa pela formação dessas estruturas a contaminação do local estudado (excesso de matéria orgânica). Entretanto, seria necessário um estudo complementar para explicar a existência dessas estruturas. Não se descarta a possibilidade de se tratar de cristalizações formadas por produtos que o organismo pretende excretar (não necessariamente provindos de contaminantes sintéticos), considerando a localização nos túbulos renais.

Diversos trabalhos, como os já citados, observaram lesões em brânquias e/ou rins de peixes expostos a xenobiontes. Como essas alterações foram encontradas no presente estudo, há possibilidade de confirmar que os dados de histopatologia são bons biomarcadores de contaminação ambiental.

Apesar da importância desses estudos, existem poucos dados sobre os efeitos de tóxicos na morfologia de peixes tropicais e subtropicais, principalmente quando se trata de espécies brasileiras (COSTA, 2001). Há escassez, também, de trabalhos que relacionam a atividade de enzimas em peixes tropicais a efeitos de contaminantes, em especial de estudos que sugerem o uso de diferentes biomarcadores em conjunto. Entretanto, vale salientar a importância de tais estudos como uma potente ferramenta para o monitoramento de impactos de contaminantes sobre os sistemas naturais (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Nesse contexto, o presente estudo espera corroborar com estudos de biomonitoramento que utilizem a associação de diferentes classes de biomarcadores em peixes, na identificação dos efeitos tóxicos de poluentes em ambientes protegidos. Há possibilidade, ainda, de contribuir na criação de subsídios para que os órgãos responsáveis pelo gerenciamento ambiental possam desenvolver estratégias para um efetivo controle das alterações em Unidades de Conservação, devido, principalmente, ao uso de pesticidas em campos agrícolas do entorno dessas áreas.

6 CONCLUSÕES

- A atividade da GST apresentou indução significativa no interior da RPPN na coleta de maio/2004, quando comparado aos demais grupos;
- A atividade da EROD não apresentou alteração significativa, mas houve uma tendência em acompanhar o comportamento da enzima GST;
- Houve alterações nas brânquias e nos rins do *Astyanx* sp., tanto nos indivíduos coletados na RPPN, quanto nos coletados no interior do cultivo de arroz, em ambas as coletas realizadas (outubro de 2003 e maio de 2004).

Os resultados permitem concluir que houve impacto em ambas as áreas, no cultivo de arroz e na Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Duas Barras. Os dados sugerem que o impacto pode ter sido causado pela administração de herbicidas organoclorados nessa plantação de arroz. Não se descarta, porém, a hipótese de haver exposição múltipla da RPPN a vários xenobiontes, provindos do cultivo vizinho e de efluentes do Rio Ivaí. Apesar do uso legal dos produtos utilizados na plantação de arroz estudada, da baixa frequência de pulverização e de uma disposição adequada das embalagens, o risco de contaminação no ambiente aquático se tornou evidente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, T. M.; JOKINEN, E. I.; LAPPIVAARA, J.; MARKKULA, H. M.; LEPPÄNEN, H. e LAMMI, R. 2000. Effects of primary and secondary treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. **Aquatic Toxicology**: v.51, p.55-67.
- BAKER, J. R. 1963. A comparative study of trimethylamine-N-oxide biosynthesis. **Biochem Biophys Acta**: v.71, p.58-64.
- BEYENBACH, K. W. 1995. Secretory eletrolyte transport in renal proximal tubules of fish. **Cellular and Molecular Approaches to fish Ionic Regulation**: v14.
- BLUS, L. J. 1995. Organochlorine pesticides. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: LEWIS. p.275-300.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**: v.72, p.248-254.
- BUCHELI, T. B.; FENT, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**: v.25, p.201-268.
- BURKE, M. D.; MAYER, R. T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug metabolism and Disposition**: v.2, p.583-588.
- CHO J.R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J.O.; AHN Y. J.; CHO J.R.; KIM Y.J.; HONG K.J.; YOO J.K.; LEE J.O.; AHN Y.J. 1999. Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea

- aphid, *Aphis citricola* Van der Goot. **Journal of Asian Pacific Entomology**: v.2, p.113-119.
- CREANEN, P. J.; DAVIS, W. H. 1965. A fluorometric study of hydroxylation of biphenyl in vitro by liver preparation of various species. **Biochemistry Journal**: v.96, p.879-885.
- COSTA, J. R. M. A. 2001. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudo de caso preliminar no rio Ribeira (SP/PR) (Dissertação de mestrado).
- COUILLARD, C. M.; WILLIAMS, P. J.; COURTENAY, S. C e RAWN, G. P. 1999. Histopathological evaluation of Atlantic Tomcod (*Micragadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. **Aquatic Toxicology**: v.4, p.263-278.
- DEVI, A. P.; RAO, D. M. R.; TILAK, K. S.; MURTY, A. S. 1981. Relative Toxicity of the Technical Grade Material, Isomers and Formulations of Endosulfan to the Fish *Channa punctata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**: v.27, p.239-243.
- EGAAS, E.; SANDVICK, M.; FJELD, E.; KALLQVIST, T.; GOKSOYR, A.; SVENSEN, A. 1999. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comparative Biochemistry and Physiology C; Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**: v.122, p.337-344.
- FAO – Food and Agriculture Organization. 1981. **Rome IT: FAO**.
- FENT, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**: v.26, n.1, p.3-10.

- FILLMAN, G.; READMAN, J. W.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J. P.; CATTINI, C.; MEE, L. D. 2002. Persistent organochlorine residues in sediments from the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**: v.44, p.122-133.
- FUNATURA (FUNDAÇÃO PRÓ-NATUREZA). 1989. Sistema Nacional de áreas naturais protegidas – SISNANP (4º relatório parcial). Brasília, **FUNATURA**: 24p.
- FURTADO, R.; LUCA, S. J. 2003. Técnicas de cultivo de arroz irrigado: Relação com a qualidade de água, protozoários e diversidade fitoplanctônica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**: v.7, n.1, p.165-172.
- GOKSOYR, A. e FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**: v.22, p.287-312.
- GUENGERICH, F. P.; MACDONALD, T. L., 1990. Mechanisms of cytochrome P450 catalysis, **FASEB**: v.4, p.2453.
- HENTSCHEL, H. e ELGER, M. 1989. morphology of glomerular and aglomerular kidneys. **Comparative Physiology**: v.1, p.1-71.
- HICHMAN, C. P. Jr. e TRUMP, B. F. 2001. Regulação iônica e ultraestrutural branquial e renal em Baiacus do gênero Sphoeroides saubmetidos a diluição da água do mar (Dissertação de Mestrado).
- HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE, J. P. M.; BERGMAN, H. L. 1992. Biomarkes: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress. **Boca Raton**: Lewis Publishers.
- JENSEN, F. B.; NIKINMAA, M. e WEBER, R. E. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: RANKIN, J. C e JENSEN, F. B. **Fish Ecophysiology**.

- JONSSON, C. M.; TOLEDO, M. C. F. 1993. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish Yellow Tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**: v.50, p.572-577.
- JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S, R. 2001. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agrícola**: v.59, n.3, p.441-446.
- KARUZINA, I. I. e ARCHAKOV, A. I. 1994. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monooxygenase reactions. **Free Biological Medicine**: v.16, p.73-97.
- KHAN, R. A.; BARKER, D. E.; HOOPER, R.; LEE, E. M. RYAN, K. e NAG, K. Histopathology in wintern flounder living adjacent to a pulp and paper mill. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**: v26, p.95-102.
- KUSMA, J. 2003. Influência do ambiente aquático na higidez dos peixes. VII Seminário Científico – **Resumos**.
- LUDKE, J.L.; GIBSON, J. R. 1972. Mixed function oxidase activity in freshwater fishes. **Toxicology and Pharmacology**: v.21, p.89-97.
- MASFARAUD, J. F. 1992. DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo(a)pyrene. **Toxicology in vitro**: v.6, p.1715-1733.
- MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. 1990. Biological markers of environmental. **Boca Raton: Lewis Publishers**: p. 3-16.

- MENZER, R. E. 1991. Water and soil pollutants. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASEN, C.D. **Toxicology: the basic science of poisons**. New York : Casarett & Doull's, p.872-902.
- NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. 1993. Bioaccumulative Potential and Toxicity of Endosulfan Insecticide to Non-Target Animals. **Comparative Biochemical Physiology: 105C**, p.347-361.
- NICARETA, L. 2004. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis* (Dissertação de Mestrado).
- NIPPER, M. G. 1990. Problemas de poluição em organismos bentônicos. **Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira**: v.3, p.24-42.
- ODUM, E. P. 1988. **Ecologia**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 1ª Ed., 434p.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, É.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU, C. 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research Section A**: v.83, p.286-292.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H. E PELLETIER, G. A. 2002. Evaluation of Tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*). **Ecotoxicology Environmental**: v.51, p.161-167.
- OMURA, T.; SATO, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**: v.239, n.7, p.2370-2378.
- PEAKALL, D. B. 1999. The use of biomarkers in hazard assessment. *In*:

Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in eastern Europe. 1 ed. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**: Parte 1, cap. 9, p.123-133.

PLUTA, H.-J., HAHN, J. & HANSEN, P.-D. 1991. Fischkrankheiten im Wattenmeer, Teilvorhaben 3. Untersuchungen zur Biotransformation (Entgiftungsaktivität“ der Mischfunktionellen Oxidasen, MFO) in der *Fischleber*. *Forschungsvorhaben BGA Code Nr. 1342 118*, Abschlußbericht, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin.

POLAND, A.; GLOVER, E. 1987. Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. **Biochemical Physiology**: v. 146, p.1439.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W. e TRIEBSKORN, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**: v6, p.75-86.

SEMA – Secretaria de Estados e Meio Ambiente e Recursos Hídricos
http://www.pr.gov.br/sema/a_unconserv_rpn.shtml. Visita em 13/01/04.

SHUGART, L. R.; McCARTHY, J. F.; HALBROOK, R. S. 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk Anal**: v.12, p.353-360.

SILVA DE ASSIS, H. C. 1998. *Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung Von Gewässerverschmutzungen*. Tese de doutorado apresentada na Universidade Tecnica da Berlim, Alemanha, p. 99.

SILVA FILHO, M. V; OLIVEIRA M. M.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M. V. E. C.; e CUNHA BASTOS, J. 2000. Validação de espécies sentinelas para a Biomarcação com Colinesterase de Peixe. Instituto de Biologia

- Roberto Alcântara Gomes, UERJ. **Ecotoxicologia Perspectivas para o século XXI**, ed. RIMA, São Carlos, p.147-154.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. 1992 *Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect*. p. 235-335.
- STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. 1994. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- STOREY, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medicine**: v.29, p.1715-1733.
- STEPANOVA, L. I.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; HÄNNINEN, S. V.; KOTELEVTSSEV, V. M.; NOVIKOV, C. N. e BEIM, A. M. 2000. Lake baikal: biomonitoring of pulp and paper Mill waste water. **Aquatic Ecosystem Health and Management**: v3, p.259-269.
- TOMITA, R. Y. 2002. Toxicologia em ambientes aquáticos. **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142.
- UNEP – United Nations Environment Program. The State of the World Environment. 1997. **Nairob: UNEP**.
- WESTER, P. W e CANTON, J. H. 1991. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**: v.100C, p.115-117.
- WESTER, P. W e VETHAAK, W. B. 1994. Fishs as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology**: v.86, p.213-232.

WHITLOCK, J. P. 1990. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30.

ZAPATA, P. O.; SIMÁ-ALVAREZ, R.; NOREÑA-BARROSO, E.; GÜEMES, J.; GOLD-BOUCHOT, G.; ORTEGA, A.; ALBORES-MEDINA, A. 2000. Toxicity of sediments from Bahía de Chetumal, México, as assessed by hepatic EROD induction and histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Marine Environmental Research**: v.50, p.385–391.