

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO**

**FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO TUBARÃO ATRAVÉS DE  
BIOMARCADORES EM *Geophagus brasiliensis* (QUOY e GAIMARD, 1824).**

CURITIBA

2011

FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO TUBARÃO ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM *Geophagus brasiliensis* (QUOY e GAIMARD, 1824).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Osório, Flávio Henrique Tincani

Avaliação da qualidade da água do rio Tubarão através de biomarcadores em *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824). / Flávio Henrique Tincani Osório. – Curitiba, 2011.

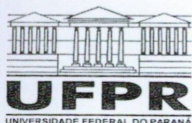
62 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Água - Qualidade 2. Marcadores biológicos I. Título II. Ribeiro, Flávio Henrique Tincani III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 628.161



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Flávio Henrique Tincani Osório** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 29 de março de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Danião Wilhelm Filho  
Membro

Prof.ª Dra. Marta Margarete Cestari  
Membro

Visto:

Prof.ª Dra. Lucélia Donatti  
Coordenadora do PPG-ECO

***“When ignorance reigns, life is lost.”***

Rage Against the Machine

## AGRADECIMENTOS

Dedico essas palavras a todos que contribuíram de alguma forma para a minha vida acadêmica e pessoal tornando possível a realização desse projeto e fazendo com que esta caminhada fosse muito mais compensadora.

Aos meus pais que, apesar das distâncias que nos separam, são as principais razões por eu estar aqui, me apoiando, me incentivando ou simplesmente torcendo por mim ao longo desses anos.

À minha irmã e à minha sobrinha que são as pessoas mais presentes da minha família e provavelmente as mais importantes, que estão e estarão no meu coração para sempre.

A toda minha família, avós, padrinhos, primos e tios que apesar de longe torceram e torcem pelas minhas lutas e conquistas, que são papel importante na minha motivação.

Ao Ciro, meu orientador, pela oportunidade, orientação e paciência que tornaram este trabalho possível.

Ao Luis e ao Marcos Oliveira que foram os principais responsáveis pela oportunidade da realização deste trabalho, tanto na questão financeira quanto na intelectual.

Ao pessoal das coletas Laercio, Ana Carol, Padre, Samuel, Flavinha, Gabi e especialmente à Vivi que proporcionou a infraestrutura das coletas, cedendo apartamento em Laguna.

E a todos os meus professores, colegas de mestrado e da universidade o meu sincero obrigado.

Com carinho,  
Flávio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO - BACIA DO RIO TUBARÃO .....	2
1.1.1 Braço do Norte.....	3
1.1.2 Tubarão .....	4
1.1.3 Capivari de Baixo .....	4
1.1.4 Laguna .....	5
1.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL .....	5
1.3 BIOMARCADORES .....	9
1.3.1 Glutaciona Reduzida .....	9
1.3.2 Lipoperoxidação.....	10
1.3.3 Carbonilação Proteíca .....	10
1.3.4 Ensaio Cometa .....	11
1.3.5 Glutaciona S-transferase .....	11
1.3.6 Acetilcolinesterase .....	12
1.3.7 Histopatologia .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	16
3.1 BIOINDICADORES.....	16
3.2 COLETA DOS EXEMPLARES.....	16
3.2.1 Armadilha.....	16
3.2.2 Vara de pesca.....	16
3.2.3 Arremessos de tarrafa .....	16
3.3 BIOMARCADORES .....	17
3.3.1 Glutaciona Reduzida .....	17
3.3.2 Lipoperoxidação.....	18
3.3.3 Carbonilação Proteíca .....	18

3.3.4 Ensaio Cometa .....	19
3.3.5 Glutathione S-transferase .....	19
3.3.6 Acetilcolinesterase .....	20
3.3.7 Histopatologia .....	20
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Índividuos Coletados .....	22
4.2 Parâmetros Físico-Químicos da Água .....	22
4.3 Biomarcadores.....	23
4.3.1 Glutathione Reduzida .....	23
4.3.2 Lipoperoxidação.....	24
4.3.3 Carbonilação Proteica .....	25
4.3.4 Ensaio Cometa .....	26
4.3.5 Glutathione S-transferase .....	27
4.3.6 Acetilcolinesterase Cerebral .....	28
4.3.7 Acetilcolinesterase Muscular.....	29
4.3.8 Histopatologia .....	30
4.3.8.1 Microscopia de Luz .....	30
4.3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	34
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

## RESUMO

O rio Tubarão nasce na encosta da Serra Geral Catarinense pela confluência dos rios Rocinha e Bonito no município de Lauro Muller. Sua bacia hidrográfica é a maior do estado de Santa Catarina e apresenta uma área de drenagem de 5.923 km<sup>2</sup>. Apesar de sua grande extensão e importância, a qualidade de suas águas superficiais apresenta-se afetada principalmente pela mineração do carvão mineral, pela atividade agropecuária e pela falta de coleta e tratamento de efluentes urbanos e industriais ao longo do trajeto do rio. Para avaliar estas condições, o uso de biomarcadores de contaminação ambiental revela-se uma ferramenta importante de monitoramento, pois mostra os efeitos de contaminantes sobre os organismos vivos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade da água em quatro localidades do rio Tubarão, Braço do Norte (B.N), Tubarão (T), Capivari de Baixo (C.B) e Laguna (L), através de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*. Para isto foram realizadas duas coletas, a primeira em dezembro/09, referente à época de seca do rio, e a segunda em junho/10, referente à época de cheia. Foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido amostras de fígado para a análise da atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e para a quantificação da Glutathione Reduzida (GSH), Lipoperoxidação (LPO) e Carbonilação Proteica (PCO), e de músculo e cérebro para a análise da atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE). O sangue dos animais foi coletado e mantido em soro bovino fetal para a realização do Ensaio Cometa. Quanto a histopatologia, parte do fígado foi fixado em ALFAC para análise em microscopia de luz e o segundo arco branquial esquerdo foi fixado em tampão glutaraldeído-cacodilato para avaliação em microscopia eletrônica de varredura. Os danos referente aos processos oxidativos foram identificados na segunda coleta (jun/10). No ponto B.N verificou-se um aumento da PCO e Ensaio Cometa. T apresentou um aumento da atividade da GST. Em C.B houve aumento da LPO e L também apresentou elevação do Ensaio Cometa. As análises de neurotoxicidade indicaram inibição da AChE muscular para todos os pontos da primeira coleta (dez/09) e também para o ponto C.B na segunda coleta (jun/10). Referente à histopatologia não foi possível identificar diferenças significativas entre as coletas, contudo diversas lesões importantes foram descritas e relacionadas à fontes impactantes. As respostas obtidas pelos biomarcadores poderão contribuir para gerar um conjunto de dados que venham a auxiliar no monitoramento da qualidade da água do rio Tubarão.

**Palavras chave:** Rio Tubarão, Carvão mineral, Biomarcadores, Qualidade da água

## ABSTRACT

The Tubarão river rises on the slopes of the Serra Geral Catarinense by the confluence of the rivers Rocinha and Bonito in Lauro Muller. Its basin is the largest in the state of Santa Catarina and has a drainage area of 5,923 km<sup>2</sup>. Despite its large size and importance, the quality of surface waters has been affected mainly by coal mining, agricultural activities and the lack of collection and treatment of municipal and industrial effluents along the river path. To assess these conditions, the use of biomarkers of environmental contamination are important tools, since they show the effects of contaminants on living organisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the water quality in four locations of the Tubarão River, Braço do Norte (B.N), Tubarão (T), Capivari de Baixo (C.B) and Laguna (L), through biomarkers of environmental contamination in fish of the species *Geophagus brasiliensis*. For this, there were two collections, the first in december/09, referring to the dry season, and the second in june/10, referring to the flood season. Liver samples were collected and frozen in liquid nitrogen for the analysis of enzymatic activity of Glutathione S-transferase (GST) and for the quantification of Reduced Glutathione (GSH), Lipid Peroxidation (LPO) and Protein Carbonylation (PCO), and muscle and brain were collected for the analysis of enzymatic activity of Acetylcholinesterase (AChE). The blood of the animals was kept in fetal calf serum to perform the Comet Assay. For the Histopathology, the liver was fixed in ALFAC to be analysed in light microscopy and the second left gill arch was fixed in glutaraldehyde-cacodylate buffer for evaluation in scanning electron microscopy. The damage related to oxidative processes were identified in the second collection (jun/10). In B.N there was an increase in PCO and comet assay. T showed an increase in GST activity. In C.B there was an increase of LPO and L also showed elevation of the comet assay. The analysis indicated neurotoxicity through muscle AChE for all points of the first collection (dec/09) and to C.B (jun/10). The histopathology didn't show significant differences between conditions, however many serious injuries have been described and related to impactant sources. The responses obtained by the biomarkers may help to generate a data set that will assist in monitoring the water quality of the Tubarão river.

**Keywords:** Tubarão river, Coal, Biomarkers, Water quality.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Bacia Hidrográfica do rio Tubarão com destaque para os pontos de coleta.....	2
FIGURA 2 – Exemplar da espécie <i>Geophagus brasiliensis</i> .....	7
FIGURA 3 – Pontos de coleta.....	8
FIGURA 4 – GSH em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	23
FIGURA 5 – LPO em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	24
FIGURA 6 - PCO em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	25
FIGURA 7 - Escore dos danos do Ensaio Cometa encontrados em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	26
FIGURA 8 - GST em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	27
FIGURA 9 - AChE Cerebral em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	28
FIGURA 10 - AChE Muscular em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	39
FIGURA 11 - Corte histológico de fígado de indivíduos de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados em dezembro de 2009 exemplificando os tipos de lesões (setas) consideradas para o estabelecimento do índice de Bernet.....	31
FIGURA 12 - Corte histológico de fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> identificando a presença de parasitas.....	32
FIGURA 13 - Escores dos indices de lesão considerando as alterações histopatológicas encontradas em <i>Geophagus brasiliensis</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas.....	33

FIGURA 14 - Eletromicrografias de brânquias de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados no ponto Braço do Norte.....	35
FIGURA 15 - Eletromicrografias de brânquias de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados no ponto Tubarão.....	36
FIGURA 16 - Eletromicrografias de brânquias de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados no ponto Capivari de Baixo.....	37
FIGURA 17 - Eletromicrografias de brânquias de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados no ponto Laguna.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número total de peixes coletados em dezembro de 2009 e junho de 2010 nos quatro pontos de coleta.....	22
Tabela 2 - Resultado das médias dos parâmetros físico-químicos amostrados nos pontos de coleta para as duas coletas.....	22
Tabela 3 – Número de indivíduos com ocorrência de lesões histopatológicas no fígado para o total de exemplares analisados (n) em dezembro de 2009 e junho de 2010 nos quatro pontos de coleta.....	30
Tabela 4 - Tipo e ocorrência dos parasitas encontrados no fígado em dezembro de 2009 nos quatro pontos de coleta.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACHÉ – Acetilcolinesterase  
ATC – Iodeto de acetilcolina  
BChE – Butirilcolinesterase  
BHT – Butilato de hidroxitolueno  
BSA - Soro de albumina bovina  
CAT – Catalase  
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ERO – Espécie reativa de oxigênio  
FOX – do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*  
GSH – Glutathiona reduzida  
GPx – Glutathiona peroxidase  
GR – Glutathiona redutase  
GST – Glutathiona S-transferase  
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático  
IAP – Instituto Ambiental do Paraná  
L• - Radical lipídico  
LH - Ácido graxo insaturado  
LOO• - Radical peroxila  
LOOH - Hidroperóxido lipídico  
LPO – Peroxidação lipídica  
PCB – Bifenil policlorado  
OH• - Radical hidroxila  
PA – Proporção absoluta  
POP – Poluente organo persistente  
RO• - Radical alcoxil  
ROO• – Radical peroxil

## 1 INTRODUÇÃO

Pelo fato do homem não ser capaz de criar fontes de fora do sistema ecológico que satisfaçam suas necessidades, a relação dualista que a sociedade possui com o recurso água torna-se inegável. É necessário universalizar o seu acesso e ao mesmo tempo promover a sustentabilidade dos recursos hídricos, contudo a pressão gerada sobre o ambiente resulta em impactos de principalmente dois tipos: o consumo de recursos naturais em ritmo maior ao qual os sistemas ecológicos podem renovar e a geração de produtos residuais em quantidades superiores às que podem ser integradas aos ciclos naturais.

Desta forma, pode-se citar a extensa produção de efluentes urbanos e industriais, a agropecuária, o desmatamento de matas ciliares, a alteração de canais de rios através de canalizações e drenagens para inundação de áreas alagáveis, a dragagem para navegação, dentre outras atividades que atingem e impactam os corpos hídricos, todas relacionadas diretamente com o adensamento populacional das regiões.

Segundo o IAP (2005), é possível obter-se um aprofundamento do estudo das conseqüências da urbanização sobre os rios quando se analisa a influência da densidade populacional bruta sobre variáveis da qualidade das águas superficiais em bacias hidrográficas urbanas. Assim, estudos que levam em conta o papel do adensamento populacional sobre a qualidade dos recursos hídricos e sua variabilidade em razão dos vários padrões de uso e ocupação do solo são importantes, uma vez que relacionam diretamente as fontes impactantes aos locais impactados.

Devido à intensificação das ações antrópicas consideradas impactantes e de modo a compreender estas ações, diversos estudos de diagnóstico e de biomonitoramento capazes de fornecer novas abordagens e informações sobre a situação atual de nossas águas têm sido desenvolvidos, dentre eles grande parte enfocam as nossas bacias hidrográficas, uma vez que os corpos hídricos são os receptores finais dessas atividades, seja pelo escoamento superficial, pela lixiviação ou mesmo pelo aporte direto de poluentes.

## 1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO - BACIA DO RIO TUBARÃO

Entende-se por bacia hidrográfica uma área na qual a precipitação é coletada e conduzida para um sistema inter-relacionado de drenagem natural, onde o movimento da água superficial relaciona todos os usos dela e do solo existentes na localidade (MAGALHÃES, 1989).

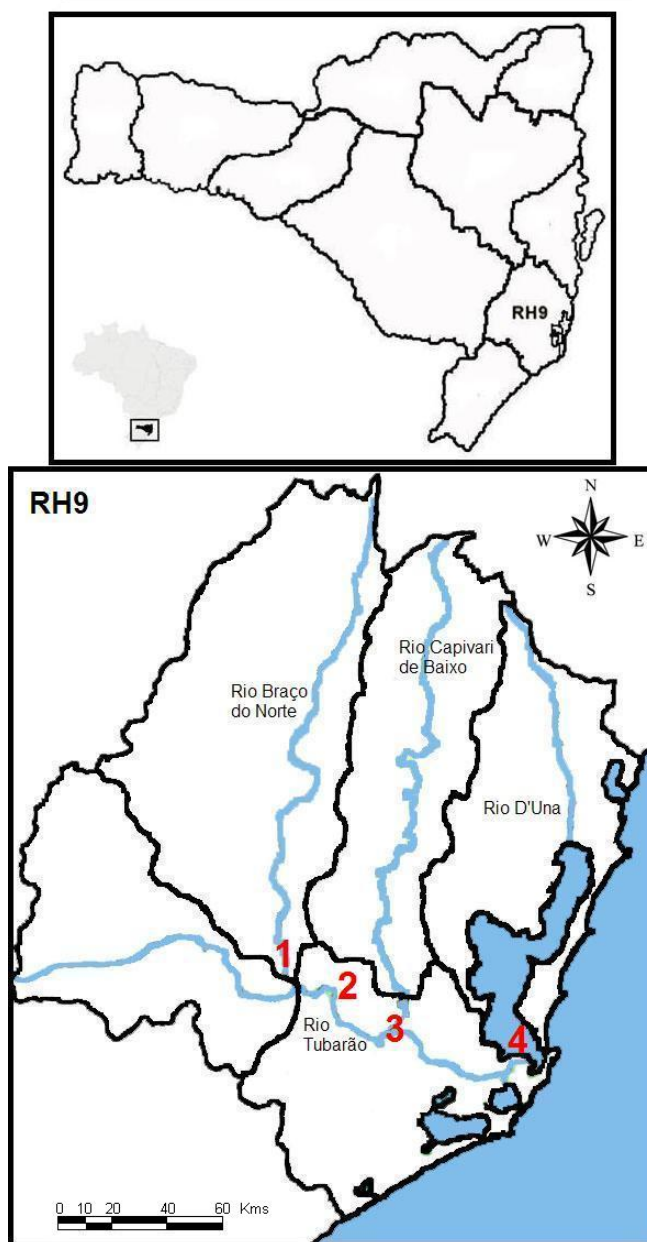


FIGURA 1 – Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão com destaque para os pontos de coleta: 1- Braço do Norte (BN); 2- Tubarão (T); 3- Capivari de Baixo (CB); 4- Laguna (L).  
Fonte: Autor.

A bacia hidrográfica do rio Tubarão localiza-se na região sul do estado de Santa Catarina e faz parte da vertente de drenagem atlântica RH9, sendo formada pelos rios Rocinha, Bonito, Oratório, Capivaras e Hipólito. A bacia faz limite com a vertente hidrográfica do interior através da Serra Geral, tendo as seguintes coordenadas geográficas como limites: 27° 48' 00 de latitude norte, 28° 48' 08 de latitude sul, 48° 38' 18 de longitude leste e 48° 31' 48 de longitude oeste; possui um conjunto lagunar composto pelas lagoas de Santo Antônio dos Anjos, Imaruí e Mirim, e é a maior bacia hidrográfica de Santa Catarina, com uma área de 5923 km<sup>2</sup> (LUNARDI, 2005; BORTOLUZZI, 2009)

O rio Tubarão, por sua vez, nasce na encosta da serra geral pela confluência dos rios Rocinha e Bonito no município de Lauro Müller. Seus principais afluentes são os rios Braço do Norte e Capivari, e possui uma área de drenagem de 4.728 km<sup>2</sup>, percorrendo 120 km desde suas nascentes, até desembocar na Lagoa de Santo Antônio. A bacia drena regiões comprometidas por mais de 50 anos de exploração e beneficiamento de carvão, uso de agrotóxicos nas lavouras, dejetos de intensa criação de suínos, resíduos de efluentes industriais além de efluentes urbanos (ESPINOSA, 2001; LUNARDI, 2005; BORTOLUZZI, 2009). Com o objetivo de realizar um diagnóstico da qualidade das águas do rio Tubarão, quatro pontos de coleta em locais afetados pela atividade antrópica foram escolhidos. O primeiro situa-se na confluência do rio Tubarão com o rio Braço do Norte, o segundo ao longo da cidade de Tubarão, o terceiro na confluência com o rio Capivari de baixo e o quarto na foz do rio em Laguna.

#### 1.1.1 Braço do Norte

Braço do Norte está localizado na latitude de 28° 16" 45" S e longitude de 49° 11" 00" O a uma altitude de 27 metros acima do nível do mar. Possui uma população de aproximadamente 29.000 habitantes, com uma área territorial de 224 km<sup>2</sup> dos quais 12 km<sup>2</sup> correspondem a área urbana e 212 km<sup>2</sup> correspondem à área rural. A temperatura máxima é de 35°C no verão e mínima de 0°C no inverno. Na economia destacam-se o setor moldureiro e a suinocultura que representam 60% da economia de Braço do Norte. O setor industrial caracteriza-se por fábricas de molduras, utensílios domésticos (esmaltados), produtos alimentícios, produtos de limpeza, bebidas, peças e máquinas,

peças de ferro e alumínio e produtos cerâmicos. A agricultura de Braço do Norte é forte, predominando o cultivo do fumo, além de batata-inglesa, batata-doce, feijão, cana de açúcar, mandioca, melancia, milho, laranja, repolho e tomate. A suinocultura possui um destaque nacional pela produção de suínos e uma das melhores carcaças do país (Prefeitura Municipal de Braço do Norte, 2011).

### 1.1.2 Tubarão

Localiza-se a uma latitude 28° 28' 00" S e longitude 49° 00' 25" O, estando a uma altitude média de 9 metros. A área do município é de 300 km<sup>2</sup> com aproximadamente 97.000 habitantes. A temperatura média máxima de 23,6°C e média mínima de 15,5°C. A temperatura máxima registrada na cidade foi de 40°C e a mínima -2°C. Tubarão destaca-se por ser o segundo centro comercial do sul do estado, principalmente na área de cerâmica. A cidade é um polo comercial com mais de 1.700 lojas, a cidade possui um amplo comércio que atendem vários municípios da região, totalizando uma população de 350 mil pessoas, destaque também para o turismo, centrado em suas estâncias hidrominerais. Tubarão foi durante muitos anos sede da estrada de ferro Dona Teresa Cristina, com a extensão de 112 km, tendo por objetivo transportar o carvão de pedra das minas para o porto de Imbituba. Atualmente, a ferrovia não conta mais com a importância do passado, mas apresenta grande valor na cultura local (Prefeitura Municipal de Tubarão, 2011).

### 1.1.3 Capivari de Baixo

A cidade localiza-se a uma latitude 28° 26' 41" S e longitude 48° 57' 28" O, estando a uma altitude de 12 metros. Sua população estimada é de aproximadamente 20.000 habitantes, com uma extensão territorial de 46,9 km<sup>2</sup>. A temperatura varia de 38°C a 0°C, com média anual de 19°C. O município sedia o complexo termelétrico Jorge Lacerda, a maior usina a carvão da América Latina e principal fonte econômica da região. O complexo termoelétrico pode ser visto às margens da rodovia BR-101. Capivari de Baixo também é conhecida como a capital termoelétrica da América Latina. Baseado em tecnologias italiana, alemã e tcheca, o complexo termoelétrico também contribui em outros ramos da atividade industrial, como o desenvolvimento da região

carbonífera do estado e o incremento da estrada-de-ferro Dona Teresa Cristina. O complexo é formado por três usinas térmicas, com potência total de 853 MW. Fazia parte do parque gerador da estatal Eletrosul, juntamente com outras duas usinas térmicas, três usinas hidrelétricas e duas usinas em construção. Todo o parque foi privatizado no segundo mandato da gestão do presidente Fernando Henrique Cardoso. O rio Tubarão constitui-se juntamente com o rio Capivari nos dois cursos de água do município, sendo que o rio Capivari, que recebe efluentes da termelétrica, corta parte da cidade com uma secção média de 50m de largura (Prefeitura Municipal de Capivari de Baixo, 2011).

#### 1.1.4 Laguna

A cidade está localizada na região sul de Santa Catarina a uma latitude de 28° 28' 54" S e longitude 48° 46' 56" O, possui uma altitude média de 4 metros e sua população é de aproximadamente 51.000 habitantes. Sua área é de 353km<sup>2</sup> com temperatura média anual de 19,7°C variando em torno de 36,3°C a 5,0°C. Possui um complexo de lagoas (Mirim, Imaruí, Santo Antônio, Santa Marta, Camacho, Garopaba do Sul, Manteiga e Ribeirão Grande) que se ligam ao Oceano Atlântico através da lagoa de Santo Antônio, pelo molhes da barra e pela lagoa do Camacho conferindo uma característica variável de sanilidade devido à interligação e à proximidade do mar. A economia do município baseia-se principalmente na pesca, com alta produção de camarão e siri em suas lagoas e de pescados na costa do Atlântico Sul. A pecuária e a agricultura são desenvolvidas principalmente no interior, onde há para todas as áreas inúmeros canais de irrigação e drenagem dessas atividades. O turismo e o comércio são outros fatores econômicos relevantes (Prefeitura Municipal de Laguna, 2011).

## 1.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

A água desempenha um papel fundamental na produção de bens indispensáveis à vida e ao bem estar da população mundial que, em grande ritmo de crescimento demográfico, mais que quadruplicou ao longo dos últimos dois séculos. A explosão demográfica aliada à falta de planejamento urbano e ao desenvolvimento econômico traz problemas como fome, miséria, doenças, violência, crimes, falta de saneamento

básico e a degradação dos ambientes naturais, sendo de particular importância, o comprometimento das bacias hidrográficas, que são os primeiros ambientes a sofrerem as conseqüências do aumento populacional, principalmente as situadas nos perímetros urbanos. Estas bacias foram transformadas em receptoras e diluidoras de poluentes oriundos das atividades humanas desenvolvidas em suas áreas de drenagem. Grande parte dessas cargas poluidoras tem sido lançada sem nenhum tipo de tratamento prévio, representando riscos potenciais à saúde humana e animal, deteriorando a qualidade de vida dos organismos e desequilibrando os ecossistemas (LIMA e LIBOS, 2002).

Para compreender o que ocorre nestes ecossistemas e de modo a dar suporte às políticas ambientais, é importante que haja um constante monitoramento da qualidade das águas dessas bacias, de modo que dados e informações básicas sobre a presença de possíveis contaminantes sejam gerados visando associar fatores bióticos e abióticos que forneçam respostas mais precisas sobre o ambiente monitorado (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Desta forma, para que ambos os fatores sejam correlacionados, é necessário a utilização de organismos, ou bioindicadores, já que constituem os principais alvos afetados por desequilíbrios nos ambientes.

Bioindicadores podem ser organismos, populações ou comunidades, cujas funções vitais se correlacionam estreitamente com determinados fatores ambientais, podendo ser empregados como indicadores na avaliação de determinado ecossistema. Portanto, de modo a identificar possíveis problemas sobre o ambiente monitorado é importante que os bioindicadores apresentem baixos limites de tolerância (sejam sensíveis a pequenas mudanças ambientais), tenham boa abundância no local e pouca mobilidade, sejam de fácil identificação e possuam sua ecologia bem conhecida.

O *Geophagus brasiliensis* (Figura 2) é uma espécie de peixe pertencente à família Cichlidae. Esta é uma das famílias de vertebrados com maior número de espécies conhecidas, cerca de 1300, com distribuição natural restrita à América do Sul e Central, África e Índia (KULLANDER, 2003, LOWE-MCCONNELL, 1999). Os ciclídeos são representados por peixes muito versáteis, territorialistas, com predileção por ambientes lênticos, principalmente lagos e lagoas. Quanto à alimentação, são onívoros e possuem hábitos muito diversificados, podendo se alimentar de detritos, sedimentos,

frutos/sementes, peixes, gastrópodos, microcrustáceos e larvas de insetos (ANDREATA e TENÓRIO, 1997, ABELHA e GOULART, 2004). O acará, *G. brasiliensis*, é uma das espécies mais comuns no Brasil, com elevada capacidade de adaptação a ambientes lênticos e elevada abundância em lagos e reservatórios, desempenhando funções ecológicas e econômicas importantes, destacando-se como uma das espécies autóctones mais freqüentes (ARAÚJO e SANTOS, 2001; SANTOS *et al.*, 2002).

A sua área de distribuição situa-se principalmente no sudeste e sul do Brasil, na região de São Paulo, nos estados do leste e nordeste do Brasil, ao longo da zona costeira do estado de Pernambuco até ao Rio Grande do Sul e nas zonas fronteiriças com o Uruguai. Possui boa tolerância à variação de temperatura (15-30 °C), pH (5.5-8.0) e hipóxia. É uma espécie onívora, no seu meio natural captura principalmente pequenos invertebrados à medida que vai remexendo a areia. Apresenta dimorfismo sexual, no macho a barbatana caudal é arredondada e as barbatanas dorsais bastante longas acabando em bico. Atingem de 25 a 30 cm no seu habitat natural, sendo que as fêmeas são menores que os machos, muitas das vezes têm pouco mais que a metade do tamanho dos machos com a mesma idade (PARAGUASSU *et al.*, 2005; MADI e UETA, 2009) .



FIGURA 2 – Exemplar da espécie *Geophagus brasiliensis*.  
Fonte: FUNDAVAP (2011)



FIGURA 3 - Pontos de coleta, apenas letras referem-se à primeira coleta (dezembro/2009), letras e números referem-se à segunda coleta (junho/2010). A/A1 Ponto de Braço do Norte; B/B1 Ponto de Tubarão; C/C1 Ponto de Capivari de Baixo; D/D1 Ponto de Laguna.  
Fonte: Autor.

### 1.3 BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas moleculares, celulares ou sistêmicas mensuráveis utilizadas para indicar a exposição ou efeito de alguma substância sobre o organismo estudado. Eles podem ser definidos como as alterações biológicas que expressam a exposição e/ou efeito tóxicos de poluentes presentes no ambiente (WALKER *et al.*, 1996), refletindo o *status* saudável ou não dos organismos em níveis baixos de organização biológica e apresentando rápida resposta ao estresse químico e, por consequência, alta importância ecotoxicológica. Por este motivo, podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações ambientais, antes da ocorrência de danos irreversíveis nos ecossistemas (SILVA DE ASSIS, 1998).

#### 1.3.1 Glutathiona Reduzida

A glutathiona é um tripeptídeo linear constituído pelo ácido glutâmico, cisteína e glicina que atua como um antioxidante hidrossolúvel, tendo o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas no grupo tiol da cisteína. É encontrada nas formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) sendo que esta age de forma significativa na manutenção celular, visto que é empregado para estimar o estado redox de um sistema biológico. A glutathiona atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, bem como na defesa a xenobióticos por três maneiras distintas (KIDD, 1997). Atua como substrato da glutathiona peroxidase na eliminação de peróxidos, reduz a forma oxidada da vitamina C, podendo assim manter a vitamina E na sua forma reduzida e funcional, e ainda atua como substrato da glutathiona S-transferase na biotransformação de fase II de certos xenobióticos como, por exemplo, aldeídos reativos, produtos da peroxidação lipídica (JESWINDER *et al.*, 2004). Em quadros de estresse oxidativo muito intenso, a GSH pode ser perdida de modo irreversível, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida, podendo afetar diretamente a síntese de proteínas e DNA (LOMAESTRO e MALONE, 1995).

### 1.3.2 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. Através da retirada de prótons ( $H^+$ ) do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, são produzidos dienos conjugados e formam-se hidroperóxidos lipídicos que continuarão a reação em cascata (SILVA, 2007). Na presença de metais catalíticos como o ferro e o cobre, pode ocorrer decomposição dos hidroperóxidos e formação de outras espécies reativas ainda mais deletérias à célula, como os radicais alcoxil ( $RO\cdot$ ) e peroxil ( $ROO\cdot$ ) (OLIVEIRA, 1999). Em consequência da lipoperoxidação, pode haver perda de integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de  $Na^+/K^+$ , influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (OLIVEIRA, 1999; MEAGHER e FITZGERALD, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Carbonilação Proteíca

Espécies reativas de oxigênio podem agir como importantes defensores extra e intercelulares bem como moléculas capazes de, direta ou indiretamente, causar alterações químicas em macromoléculas como as proteínas. A principal modificação proteíca originada pelo acréscimo de ERO relaciona-se diretamente à oxidação de aminoácidos contendo um grupo tiol, como as cisteínas. Neste contexto, os tipos mais frequentes de carbonilação proteíca oxidativa parecem ser irreversíveis e destinadas apenas a induzir degradação proteíca de maneira não específica (CATTARUZZA e HECKER, 2008). Quimicamente, a carbonilação oxidativa ocorre preferencialmente nos aminoácidos prolina, treonina, lisina e arginina, sendo um tipo de oxidação proteíca que pode ser promovida por ERO, estando ligada a processos que formam cetonas e/ou aldeídos que reagem com o DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina), para formar hidrazonas detectáveis através de processos de espectrometria. Ainda, recentes avanços em espectrometria de massa e proteômica indentificaram proteínas carboniladas em vários quadros relativos a patogenicidades como a doença de Alzheimer devido a processos de sinalização redox (WONG *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2010).

#### 1.3.4 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, ou SCGE (*Single-cell gel eletrophoresis*) estabeleceu-se como uma técnica muito útil para estudos envolvendo quebras e reparo de DNA. Nessa técnica de eletroforese em microgel, um pequeno número de células suspensas em um fino gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia são lisadas, submetidas a eletroforese e marcadas com corante fluorescente DNA ligante. Nas células que apresentam mais quebras no DNA, ocorre migração do DNA cromossômico a partir do núcleo em direção ao cátodo, fazendo lembrar a forma de um cometa (SPEIT e HARTMANN, 1999).

O atual consenso científico é de que o ensaio é simples, rápido, de baixo custo e sensível. No entanto uma das principais críticas à técnica, é a de que as quebras ao DNA podem não estar relacionadas a uma exposição específicas, diferentemente do que ocorre com a formação de aductos de DNA, que estão diretamente relacionados à presença de poluentes específicos. Porém, a relativa simplicidade do ensaio cometa, quando comparado as sofisticadas técnicas de determinação de aductos de DNA, fazem com que o teste seja uma ferramenta interessante para avaliar danos globais à molécula de DNA. Eritrócitos do sangue são mais comumente utilizados para a realização do teste porque são de fácil obtenção, não sendo necessário realizar dissociação celular. No entanto, outros tecidos, como fígado, brônquias e rins podem também ser utilizados (BELPAEME, 1998).

Algumas outras lesões ao DNA, como ligações cruzadas de DNA e danos oxidativos à molécula podem ser avaliadas no ensaio cometa através de anticorpos lesões-específicos ou enzimas específicas de reparo do DNA. Ele ganhou ampla aceitação como uma valiosa ferramenta em estudos de genotoxicidade, reparo e biomonitoramento humano (DHAWAN, 2008).

#### 1.3.5 Glutathione S-transferase

A transformação metabólica de compostos é fundamental para que a atividade biológica do composto seja alterada, de modo a cessar a interação entre o elemento químico e a célula. Este metabolismo, ou biotransformação possui diversos sistemas enzimáticos que atuam em inúmeros tipos de substratos, grande parte destas enzimas

têm em comum a função de converter substâncias tóxicas em menos tóxicas e converter químicos lipofílicos em hidrofílicos, de modo a facilitar sua excreção (ROSSI, 2008).

O processo de biotransformação é dividido em duas partes, as reações de fase I e II, que freqüentemente ocorrem seqüencialmente. As primeiras são reações catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), que podem tornar os compostos originais ainda mais tóxicos. Nesta fase pode ser inserido um grupo hidroxila que servirá como ponto de ataque para a reação de conjugação da fase II. A fase II consiste em reações anabólicas que envolvem a conjugação de alguns grupos de moléculas resultando em compostos inativos na maioria dos casos. A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima essencial na proteção contra danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo, e pertencente à fase II do metabolismo (MARIONNET *et al.*, 2006).

A GST é responsável pela conjugação da glutathione em uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos durante a fase II da biotransformação. Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutathione reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários como na estabilização de flavonóides, atuando com peroxidases na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool no processo de estresse oxidativo (DIXON e LAPTHORN, 2002).

A família das GST caracteriza-se por sua ampla especificidade a substratos com pouca afinidade. É por esta baixa eficiência catalítica que as GST possuem papel importante como agente desintoxicante de amplo espectro de compostos, tanto endógenos quanto exógenos (TEW e RONAI, 1999). A atividade desta enzima possui relação direta com o estresse oxidativo, já que utiliza a GSH como cofator e que também participa da degradação do  $H_2O_2$  através da enzima GPx, sendo um importante biomarcador (ROSSI, 2008).

### 1.3.6 Acetilcolinesterase

O termo colinesterase (ChE) refere-se à atividade das “pseudocolinesterases” ou butirilcolinesterase (BChE), e da acetilcolinesterase (AChE) ou “colinesterase

verdadeira”. Estas enzimas diferem na afinidade e na velocidade de degradação do substrato bem como em sua localização e concentração nas espécies (NICARETA, 2004). Em peixes, a acetilcolinesterase é encontrada em músculo, cérebro, brânquias e eritrócitos e é responsável por hidrolisar a acetilcolina, um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (KLEMZ, 2002).

A inibição da AChE por poluentes é amplamente estudada, sendo um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados, porém sabe-se que substâncias como metais pesados, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também podem vir a inibi-la (PAYNE *et al.*, 1996; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; AKAISHI *et al.*, 2004). Esta inibição pode ser reversível ou irreversível. No caso dos organofosforados, ocorre uma ligação muito estável e que dificilmente sofre dissociação espontânea, deixando a enzima permanentemente fosforilada e incapaz de realizar sua atividade metabólica (ADAMS, 1992).

A AChE é muito importante na manutenção e no equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos, por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolina é transformada em colina e acetato que, por sua vez, reage com uma molécula de água, produzindo ácido acético. Com a inibição da atividade da AChE pode ocorrer um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, paralisando algumas funções vitais do organismo afetado (ADAMS, 1992; KLEMZ, 2002).

### 1.3.7 Histopatologia

A histopatologia permite a identificação eficiente dos efeitos subletais agudos e crônicos dos contaminantes de modo relativamente rápido e de baixo custo. As alterações histopatológicas respondem a baixas concentrações de agentes tóxicos, indicando contaminações ou situações de estresse precocemente (BERNET *et al.*, 1999). Os órgãos-alvo dependem do tipo de exposição, no entanto considerando-se os estudos de biomonitoramento onde o mais convencional é a exposição hídrica e trófica, os mais utilizados são as brânquias, fígado e o rim.

O fígado é fundamental para o metabolismo, armazenando compostos energéticos (lipídeos e glicogênio), produzindo vitelogenina e agindo no processo de detoxificação e bioativação de compostos tóxicos. A biotransformação consiste de um

importante mecanismo bioquímico essencial nos processos metabólicos celulares, mas atuam também na transformação de alguns contaminantes lipofílicos com o intuito de facilitar sua eliminação via sistema renal (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Este processo muitas vezes gera moléculas que agem como agentes mais tóxicos que a molécula de origem. Dentre as lesões mais comuns estão áreas de necrose, inclusões citoplasmáticas, lipidoses, neoplasias além de respostas inflamatórias como focos de infiltração leucocitária, centros de melanomacrófagos e parasitas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

As brânquias são órgãos de vital importância para os peixes, visto que estão envolvidos na manutenção da saúde e metabolização de nutrientes, parâmetros-chave para um bom desenvolvimento animal. Responsáveis pelas trocas gasosas, processos de osmorregulação, equilíbrio ácido básico, excreção de compostos nitrogenados e ainda função sensorial na degustação. Qualquer alteração nestas estruturas pode ocasionar um desequilíbrio orgânico que compromete a sobrevivência e desempenho do organismo. Alterações estruturais e celulares tais como edemas, hiperplasias das lamelas secundárias, infiltrações de células epiteliais, fusões lamelares, morte de células mucosas e infecções parasitárias e bacterianas, associam-se aguda e cronicamente à presença de agentes químicos estressores (CAVICHIOLO *et al.*, 2005).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação da qualidade da água do rio Tubarão através de biomarcadores de contaminação ambiental em *Geophagus brasiliensis*, coletados em quatro localidades durante períodos de seca e cheia do rio.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Consolidar a espécie *Geophagus brasiliensis* como uma espécie sentinela;
- Avaliar os níveis de estresse oxidativo no fígado de *Geophagus brasiliensis* expostos cronicamente às águas do rio Tubarão através da quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e dos danos em macromoléculas através da análise da lipoperoxidação (LPO), carbonilação proteica (PCO) e do ensaio cometa;
- Avaliar aspectos neurotóxicos e de metabolização de xenobióticos em *Geophagus brasiliensis*, através da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular e da glutathiona S-transferase (GST), respectivamente;
- Avaliar os danos teciduais em fígado através da microscopia de luz;
- Avaliar os danos teciduais em brânquias através da microscopia eletrônica de varredura;
- Verificar a presença de um possível gradiente de contaminação ao longo do rio e da influência sazonal sobre este gradiente;
- Gerar dados que possam servir de alerta para as autoridades, auxiliando nas tomadas de decisões, objetivando a proteção da qualidade da água e do ecossistema e minimizando os riscos de exposição à contaminantes.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 BIOINDICADORES

Os animais utilizados como bioindicadores foram peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, pertencentes à família Cichlidae. Estes são peixes de água doce, possuem grande tolerância à salinidade, temperatura, pH e hipóxia. São de pequeno porte, com coloração bastante variável e dimorfismo sexual. Forrageiam em todos os níveis tróficos e exibem ampla habilidade para mudar de presa como resposta à mudanças ambientais.

#### 3.2 COLETA DOS EXEMPLARES

Foram realizadas duas coletas (dezembro/09 e junho/10) durante 24 meses de projeto em quatro pontos ao longo do rio Tubarão. A escolha dos pontos e datas de coleta ocorreu de modo a verificar o gradiente de contaminação ao longo do rio e a influência sazonal sobre este gradiente.

##### 3.2.1 Armadilha

A armadilha utilizada foi a do tipo covô, com construção de linha e de madeira. Os covos permaneceram na água por doze horas, com revisões periódicas de três horas.

##### 3.2.2 Vara de pesca

Foram realizadas diversas capturas com vara de pesca utilizando-se isca de miolo de pão.

##### 3.2.3 Arremessos de tarrafa

O método mais eficiente para a coleta dos exemplares foi o arremesso de tarrafa, tendo sido realizados vários arremessos em cada base e por fase de campo, com tarrafas de malhas de 5 e 7cm.

### 3.3 BIOMARCADORES

Os animais foram coletados, transportados ao local de processamento e anestesiados com benzocaína. Amostras de músculo, cérebro e fígado foram retiradas e mantidas em nitrogênio líquido para as análises da GSH, LPO, PCO, GST e AChE; sangue foi retirado e mantido em soro bovino fetal para a realização do Ensaio Cometa; a porção inferior do fígado foi mantida em alfac para análise em microscopia de luz; e o segundo arco branquial esquerdo foi mantido em tampão glutaraldeído-cacodilato para análise em microscopia eletrônica de varredura. No laboratório as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 para o cérebro e músculo e pH 6,5 para o fígado. Em seguida foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes do músculo e cérebro foram utilizados para a análise da AChE, enquanto que o sobrenadante do fígado foi utilizado para as análises da LPO, PCO, GSH e GST. Para a concentração proteica 10 µl de sobrenadante (fígado, cérebro e músculo) foram adicionados seguidos de 250 µl do reativo de *Bradford* (“*Coomassie brilliant blue*” BG-250), procedendo as leituras de absorbância na faixa de 595-620 nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de curva-padrão de BSA nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1.000 µg de BSA por ml de volume final de solução utilizando PBS como branco (BRADFORD, 1976).

#### 3.3.1 Glutationa Reduzida

Foram adicionados 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 48% em 250 µl de amostra para precipitação protéica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por 15 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50 µl do sobrenadante da amostra e 230 µl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, foi utilizado 230 µl do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 µl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados e as medidas de absorbância lidas a 415 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 µM GSH).

### 3.3.2 Lipoperoxidação

O sobrenadante das amostras de fígado foi ressuspendido em metanol PA na proporção 1:10 (volume/volume), centrifugado por 30 minutos a 9.000 x g em temperatura de 4°C. A análise da lipoperoxidação (LPO) foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos do ensaio FOX (JIANG *et al.*, 1992). Em microplaca foram pipetadas em quadruplicata sendo 30 µl da amostra seguido de 270 µl da solução reação composta de xilenol orange, ácido sulfúrico, hidroxitolueno butilado (BHT) e sulfato ferroso amoniacal, e metanol 90%. Após 30 min de incubação na própria microplaca, as amostras foram lidas a 560 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos mmol por min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

### 3.3.3 Carbonilação Proteica

O método consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm (LEVINE *et al.* 1990; QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). O método limita-se a grupos funcionais carbonilados como ácidos carboxílicos, amidas e ésteres que não reagem como o DNPH. 200 µl de proteína solúvel da fração S9 foi adicionada a um *ependorf*, posteriormente 500 µl de DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M, foi adicionado. O conteúdo do *ependorf* foi misturado através de *vortex* durante 5 min e incubados a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas foram precipitadas em 700 µl de TCA a 28% e centrifugados a 9.000 x g por 10 min. O *pellet* foi lavado três vezes por ressuspensão (etanol/acetato de etila 1:1), homogeneizado em *vortex* e centrifugado. As proteínas foram então solubilizadas em cloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 x g por 5 min para remover quaisquer resíduos de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro Sunrise-TECAN (□□= 360 nm) em microplacas utilizando o coeficiente de absorção molar de 2,1x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para hidrazonas. O branco recebeu o mesmo tratamento, contudo sem a adição do DNPH. Os resultados foram expressos µmol carbonilas por mg<sup>-1</sup> de proteína.

### 3.3.4 Ensaio Cometa

Aproximadamente 10 µl de sangue foram coletados de cada animal e misturados em 1 ml de soro bovino fetal. Desta solução, 10 µl foram coletados e misturados em 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e aquecida (37°C). A suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina com cobertura de agarose, coberta com uma lamínula e refrigerada por 15 min. Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram as lâminas foram acondicionadas em cubetas contendo solução de lise por 24 h para então serem transferidas à cuba de eletroforese. As lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal, mantida sob refrigeração e no escuro. A solução de eletroforese com pH > 13 foi adicionada de maneira a cobrir as lâminas permanecendo por 30 min para a desespiralização do DNA. Em seguida, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 min. Ao término, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 min, realizado em três seções. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 min e então guardadas para posterior coloração e visualização. Para a coloração, foram adicionados 15 µl de brometo de etídeo em cada lâmina, cobrindo-as com lamínula e levadas ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x. 100 núcleos em cada lâmina foram analisados em teste cego e classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. Os núcleos foram classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose). Foi realizada a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através do somatório após a multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

### 3.3.5 Glutathiona S-transferase

Baseado no trabalho de Keen *et al.* (1976), o sobrenadante das amostras de fígado foram diluídas na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. Após a diluição, 100 µl das amostras foram pipetados em 4 réplicas em microplaca seguidos pela adição da solução reação composta por 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2,5 mM e glutathiona reduzida (GSH) 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. As

GSTs catalisam a reação de conjugação do CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância através da leitura em espectrofotômetro (Sunrise-TECAN). O aumento linear da absorbância a 340nm foi monitorado e a atividade expressa em mm de conjugado GSH-CDNB produzido por  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

### 3.3.6 Acetilcolinesterase

O sobrenadante das amostras de cérebro e músculo foram diluídas 1:10 (v/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Após a diluição cada amostra foi pipetada em 4 réplicas de 50  $\mu\text{l}$  na microplaca, seguido de 200  $\mu\text{l}$  de DTNB (5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato) e 50  $\mu\text{l}$  de ATC (iodeto de acetilticolina). O princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre o ATC e o DTNB na presença da AChE. A leitura foi feita em espectrofotômetro Sunrise-TECAN em comprimento de onda de 415 nm, seguindo o método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  por minuto<sup>-1</sup>  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

### 3.3.7 Histopatologia

O fígado foi coletado e fixado em ALFAC, desidratado e incluído em Paraplast (Sigma). Os blocos foram então cortados (3 a 5  $\mu\text{m}$ ), corados com hematoxilina-eosina e montados em lâminas para posterior análise ao microscópio de luz. O índice de lesões utilizado na avaliação do material foi descrito por Bernet *et al.* (1999). As alterações consideradas foram necroses, respostas inflamatórias, vacuolizações, inclusões citoplasmáticas, ocorrência de melanomacrófagos livres e centros de melanomacrófagos, diferenciações teciduais e presença de parasitas.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, o segundo arco branquial esquerdo foram fixadas em tampão glutaraldeído (3%)-cacodilato (0,1M, pH 7,4). Posteriormente foram desidratadas em séries graduais de etanol (Merck) e processadas até a completa desidratação no ponto crítico utilizando  $\text{CO}_2$  líquido. Os filamentos foram então colados em suportes de alumínio através de fita dupla face de carbono e metalizados com ouro para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da GSH, LPO, PCO, GST e AchE cerebral e muscular foram avaliados através de ANOVA paramétrica, seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 0,05, comparando-se os quatro pontos diferentes de coleta (caracteres latinos), e entre os mesmo pontos de coleta (caracteres gregos).

Para os resultados da microscopia de luz (índice de Bennett) e do Ensaio Cometa, foi aplicado análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns com nível de significância de 0,05, comparando-se os quatro pontos diferentes de coleta (caracteres latinos), e entre os mesmo pontos de coleta (caracteres gregos).

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura foram apenas descritivos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Índividuos Coletados

Foi coletado um total de 133 exemplares entre machos e fêmeas ao longo das duas coletas, sendo 81 na primeira e 52 na segunda, distribuídos conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Número total de peixes coletados em dezembro de 2009 e junho de 2010 nos quatro pontos de coleta.

Mês/Ano	Dezembro/09				Junho/10			
	Laguna	C.B	Tubarão	B.N	Laguna	C.B	Tubarão	B.N
	15	20	21	25	16	15	9	12

### 4.2 Parâmetros Físico-Químicos da Água

Foram obtidos dados de Temperatura (°C) e pH da água dos quatro pontos de coleta durante as duas coletas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado das médias dos parâmetros físico-químicos amostrados nos pontos de coleta para as duas coletas.

Mês/Ano	Dezembro/09				Junho/10			
	Laguna	C.B	Tubarão	B.N	Laguna	C.B	Tubarão	B.N
Temperatura	25,4°C	28,3°C	26,4°C	24,7°C	24,1°C	28,0°C	25,6°C	25,3°C
pH	5,8	6,5	7,2	6,9	6,2	6,9	7,3	7,2

### 4.3 Biomarcadores

De acordo com as metodologias anteriormente descritas, foram medidas as concentrações de GSH, LPO, PCO, os danos genéticos através do Ensaio Cometa, as atividades enzimáticas da GST, AChE cerebral e muscular, e os danos teciduais através de microscopia de luz em fígado, e eletrônica de varredura em brânquias para exemplares das duas coletas realizadas (dez/09 e jun/10), nos quatro pontos do rio.

#### 4.3.1 Glutaciona Reduzida

Não houve diferenças significativas para a mensuração da GSH em nenhuma das comparações realizadas (Figura 4).

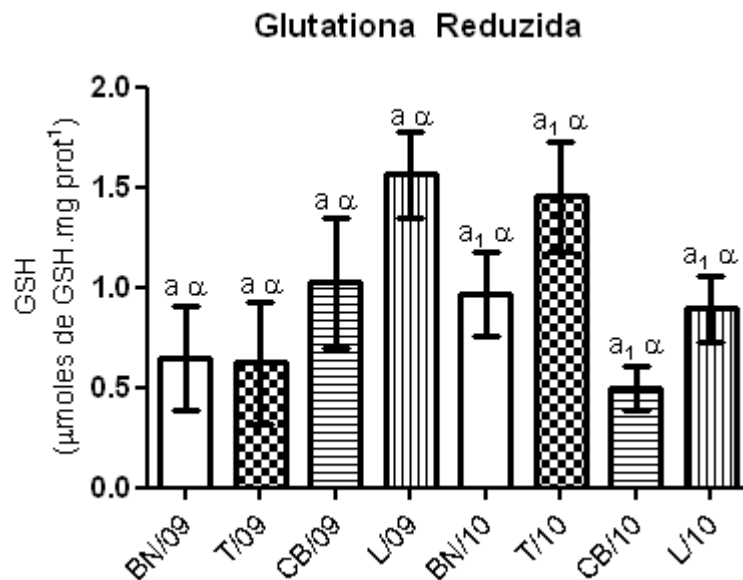


FIGURA 4 – Conteúdo de GSH hepático em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média ± erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,21$ ;  $F_{7;64} = 2,54$ ;  $p > 0,05$ ).

### 4.3.2 Lipoperoxidação

Pela análise da LPO foi possível notar que em indivíduos provenientes do ponto de Capivari de Baixo (jun/10), os danos em membranas foram mais evidenciados quando comparados com indivíduos provenientes dos outros pontos estudados no mesmo período. Mesmo quando comparados os mesmos pontos para os diferentes períodos de coleta, esta diferença ainda é observada (Figura 5).

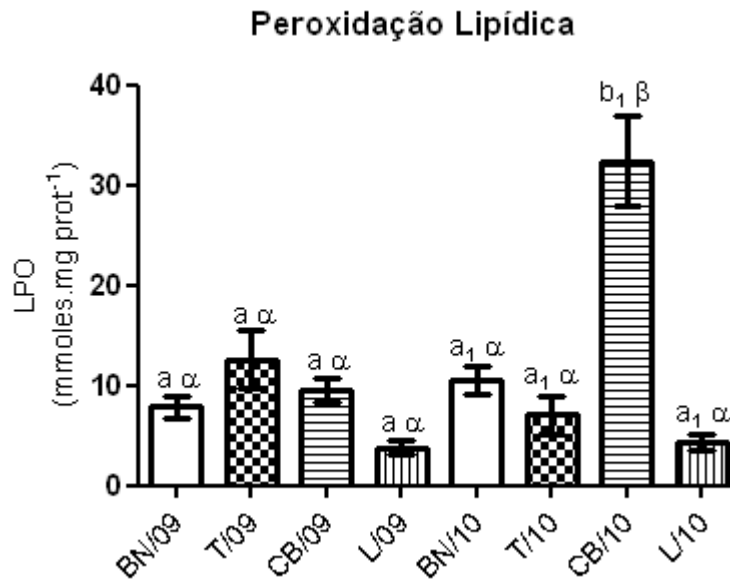


FIGURA 5 – LPO em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,65$ ;  $F_{7,64} = 17,43$ ;  $p < 0,001$ ).

### 4.3.3 Carbonilação Proteica

Em relação à medida da PCO observa-se que o ponto de Tubarão (dez/09) apresentou-se mais elevado em relação a Capivari de Baixo (dez/09). Ainda nota-se um aumento deste biomarcador no ponto de Braço do Norte (jun/10) quando comparado com indivíduos provenientes dos outros pontos desta mesma coleta, bem como do mesmo ponto da coleta anterior (Figura 6).

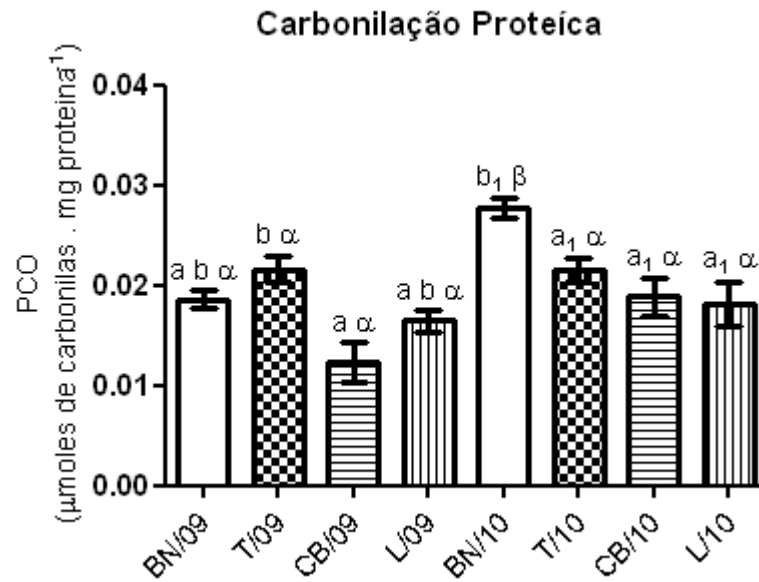


FIGURA 6 - PCO em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média ± erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,49$ ;  $F_{7,64} = 8,86$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.4 Ensaio Cometa

Quanto às análises de genotoxicidade, pode-se observar um aumento no escore do Ensaio Cometa de Braço do Norte e Laguna (jun/10) quando comparados a Braço do Norte e Laguna (dez/09) (Figura 7).

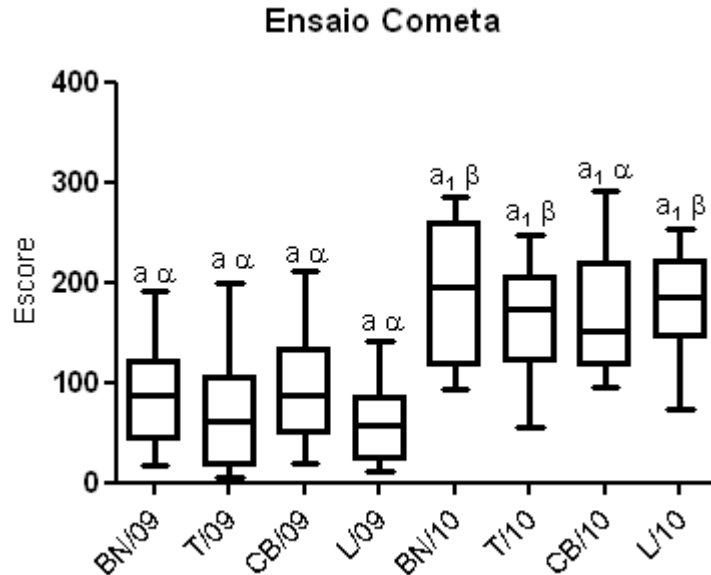


FIGURA 7 – Escore dos danos do Ensaio Cometa encontrados em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam mediana  $\pm$  quartis. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (Kruskal-Wallis = 50,83; GL = 7;  $p < 0,001$ ) (n para cada ponto = 13, 20, 21, 20, 14, 13, 9, 11).

#### 4.3.5 Glutathione S-transferase

A atividade específica da GST não apresentou diferenças para a primeira coleta (dez/09), contudo houve uma indução dessa enzima para o ponto de Tubarão (jun/10), em relação ao mesmo ponto da primeira coleta, bem como aos outros pontos da mesma coleta (Figura 8).

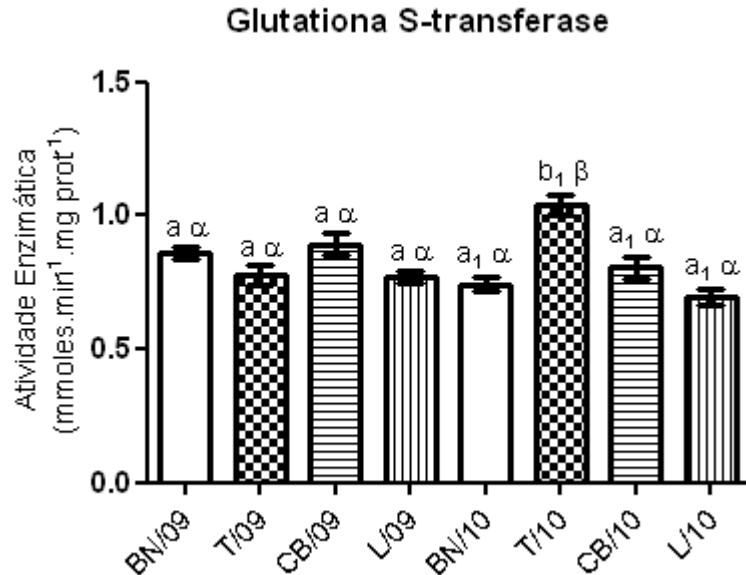


FIGURA 8 – GST em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,53$ ;  $F_{7,64} = 10,63$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.6 Acetilcolinesterase Cerebral

A atividade específica da AChE cerebral não apresentou diferenças significativas para nenhuma das comparações realizadas (Figura 9).

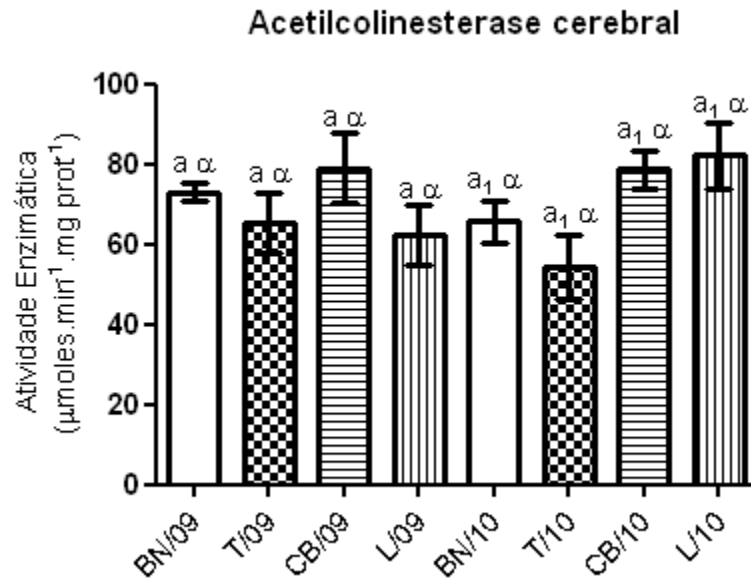


FIGURA 9 - AChE Cerebral em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,64$ ;  $F_{7;64} = 16,27$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.7 Acetilcolinesterase Muscular

A atividade específica da AChE muscular nos mostrou que esta enzima apresenta-se inibida nas coletas de dezembro/09 em relação às coletas de junho/10 para todos os pontos, exceto Capivari de Baixo, o qual continuou inibido nesta última (Figura 10).

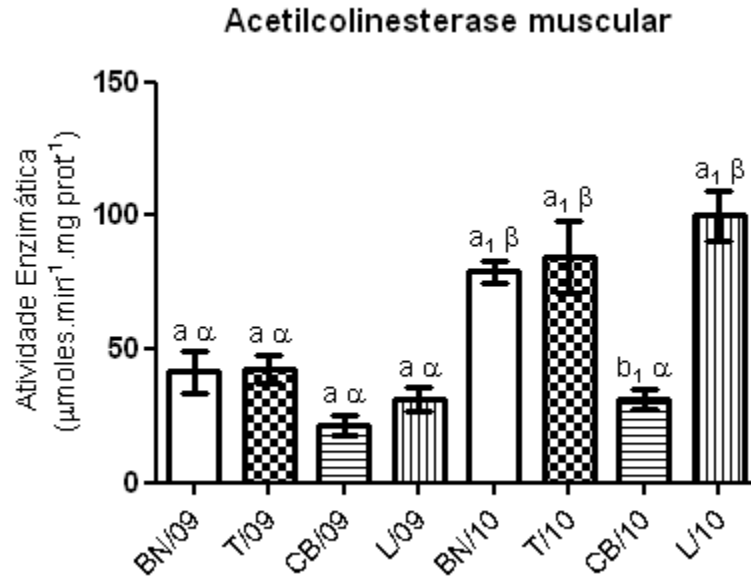


FIGURA 10 - AChE Muscular em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (ANOVA  $r^2 = 0,18$ ;  $F_{7,64} = 2,01$ ;  $p > 0,05$ ).

### 4.3.8 Histopatologia

#### 4.3.8.1 Microscopia de Luz

Para as análises histopatológicas foi utilizado o índice de Bernet *et al.* (1999) a partir das lesões consideradas, como mostra a Tabela 3. Na Figura 11 podem ser observadas imagens referentes às lesões encontradas e consideradas para a aplicação do índice de lesão de Bernet.

Tabela 3 - Número de indivíduos com ocorrência de lesões histopatológicas no fígado para o total de exemplares analisados (n) em dezembro de 2009 e junho de 2010 nos quatro pontos de coleta.

Mês/Ano	Local	Necrose	Neoplasia Invasiva	Neoplasia Não-Invasiva	Infiltração Leucocitária	Melanomacrófagos	CMM	Vacuolização	Inclusão citoplasmática*
Dezembro/09	B.N (17)	5	0	1	15	7	15	4	1
	Tubarão (21)	14	0	0	11	9	16	2	2
	C.B (14)	7	1	0	11	4	13	4	0
	Laguna (11)	3	0	1	8	9	11	1	0
Junho/10	B.N (6)	1	0	0	0	4	6	0	0
	Tubarão (6)	0	0	0	3	3	6	0	0
	C.B (6)	1	0	1	1	2	6	0	0
	Laguna (6)	1	0	0	4	2	6	0	0

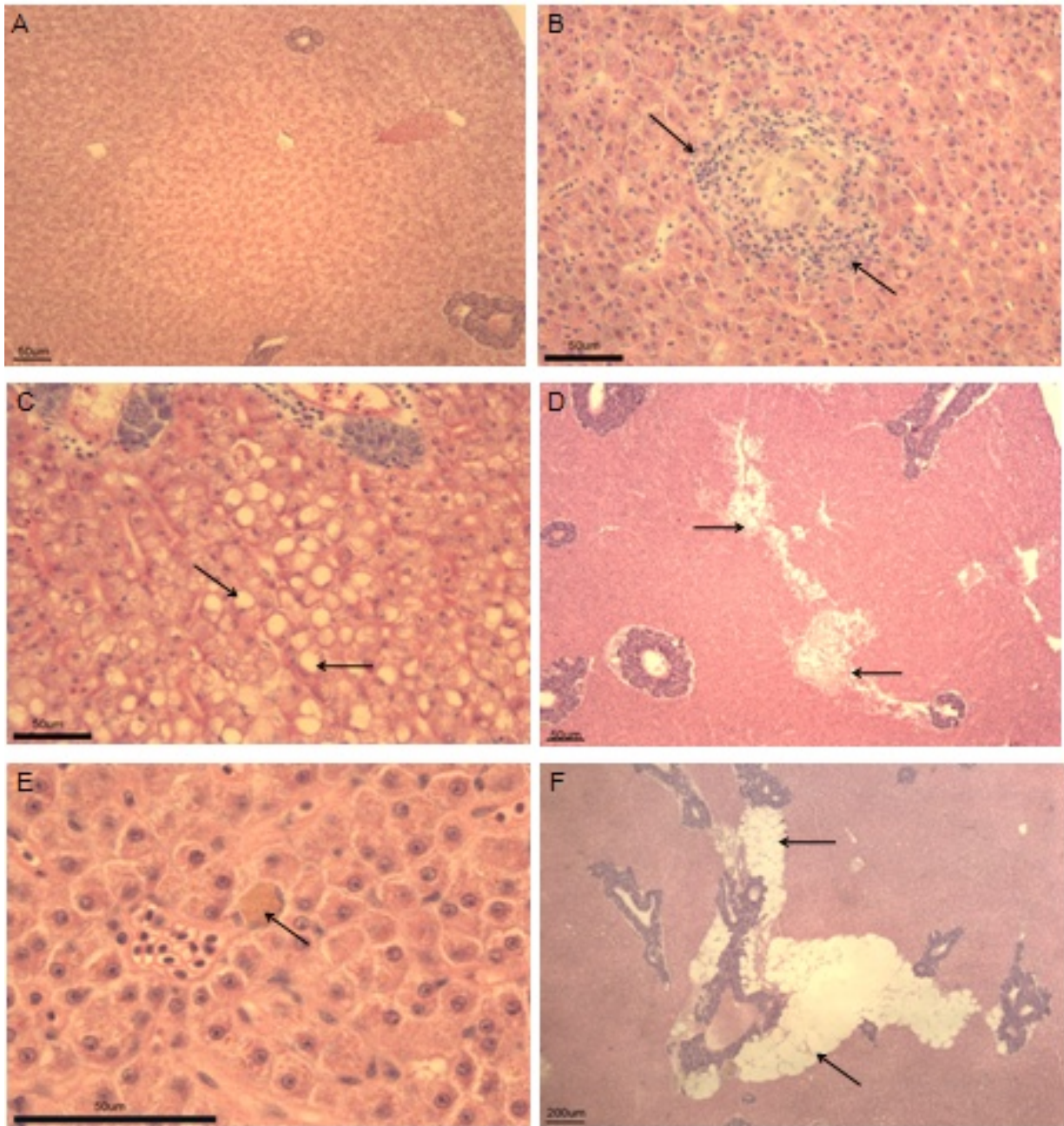


FIGURA 11 - Corte histológico de fígado de indivíduos de *Geophagus brasiliensis* coletados em dezembro de 2009 exemplificando os tipos de lesões (setas) consideradas para o estabelecimento do índice de Bernet. A – Parênquima hepático normal sem apresentação de alterações (escala = 50µm). B – Infiltração leucocitária (escala = 50µm). C– Vacuolização citoplasmática ou esteatose hepática (escala = 50µm). D- Extensa área de necrose (escala = 50µm). E- Inclusões citoplasmáticas (escala = 50µm). F- Acúmulo de tecido gorduroso no parênquima hepático (escala = 200µm).

Foi observada a presença de parasitos no fígado e brânquias de *G. brasiliensis*. A ocorrência no fígado está relacionada na Tabela 4 e os tipos identificados na Figura 12, através da Microscopia de Luz. Nas brânquias foram identificados também diferentes tipos de parasitos observáveis na Figura 15D e d, através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Tabela 4 - Tipo e ocorrência dos parasitos encontrados no fígado em dezembro de 2009 nos quatro pontos de coleta.

Mês/Ano	Local	Parasitas		
		1	2	3
Dezembro/09	B.N (17)	11	8	7
	Tubarão (21)	11	2	2
	C.B (14)	15	4	5
	Laguna (11)	8	0	1
Junho/10	B.N (6)	0	1	1
	Tubarão (6)	0	3	1
	C.B (6)	0	1	0
	Laguna (6)	0	1	1

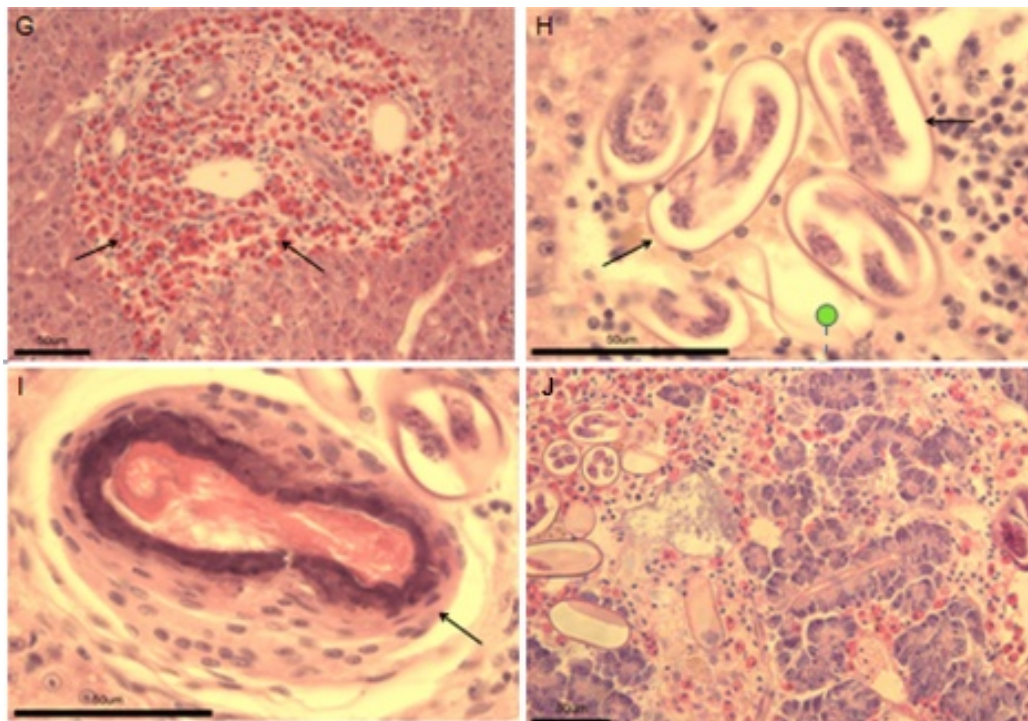


FIGURA 12 – Corte histológico de fígado de *Geophagus brasiliensis* identificando a presença de parasitos (setas) (escalas = 50µm). G- Presença de parasitos do tipo 1. H- Presença de parasitos do tipo 2. I- Presença de parasitos do tipo 3. J- Fígado com os três tipos de parasitos.

Após o estabelecimento dos índice de lesão da microscopia de luz, foram realizados testes estatísticos, os quais não indicaram diferenças significativas em nenhum ponto para nenhuma das coletas (Figura 13).

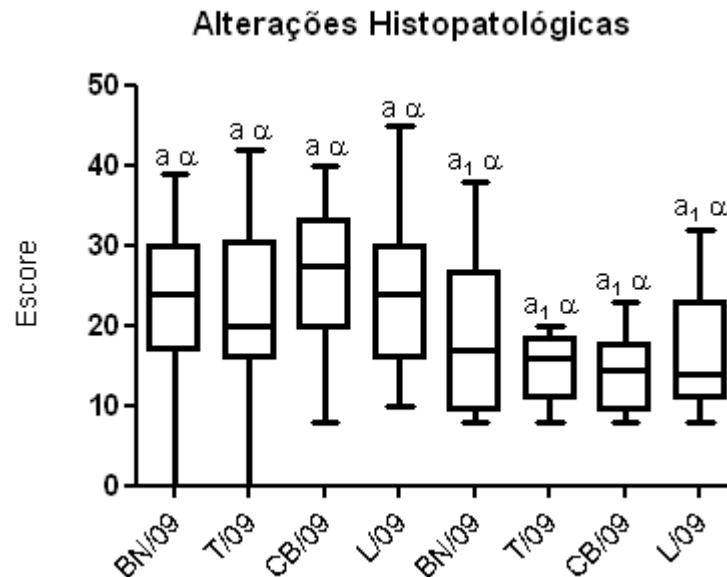


FIGURA 13 – Escores dos índices de lesão considerando as alterações histopatológicas encontradas em *Geophagus brasiliensis*. comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam mediana  $\pm$  quartis. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a mesma coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos mesmo pontos para coletas diferentes; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (Kruskal-Wallis = 16,35; GL = 7;  $p > 0,05$ ) (n para cada ponto = 11, 14, 21, 17, 6, 6, 6, 6).

#### 4.3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura foram analisadas as brânquias dos exemplares provenientes de todos os pontos estudados e os resultados são descritos ponto a ponto. Foram observadas lesões relacionadas com a exposição aguda e crônica em todos os pontos amostrados. As brânquias de *G. brasiliensis* apresentaram a mesma estrutura encontrada para outros teleósteos, ou seja a partir das lamelas primárias surgem as lamelas secundárias, onde ocorre a troca de gases (Figuras 14A e B).

##### a) Braço do Norte

Neste ponto foi observada uma maior diversidade de lesões e alterações. Nas lamelas secundárias foi identificado uma grande incidência de células epiteliais hiperplásicas que podem evoluir para a morte da célula (Figura 14A). Ainda nas lamelas secundárias, foi observada a presença de hiperplasia tecidual com aparência de neoplasia (Figura 14B). Também como em outros pontos, foi observada a ocorrência de hiperplasia tecidual em lamela primária em indivíduos coletados neste ponto (Figura 14C). No entanto, outras lesões nas lamelas primárias mostraram uma incidência maior que nos outros pontos como a presença de células hiperplásicas (Figura 14D e E) e o desaparecimento das digitações epiteliais, comum neste epitélio associado à hiperplasia celular e morte destas células (Figura 14F).

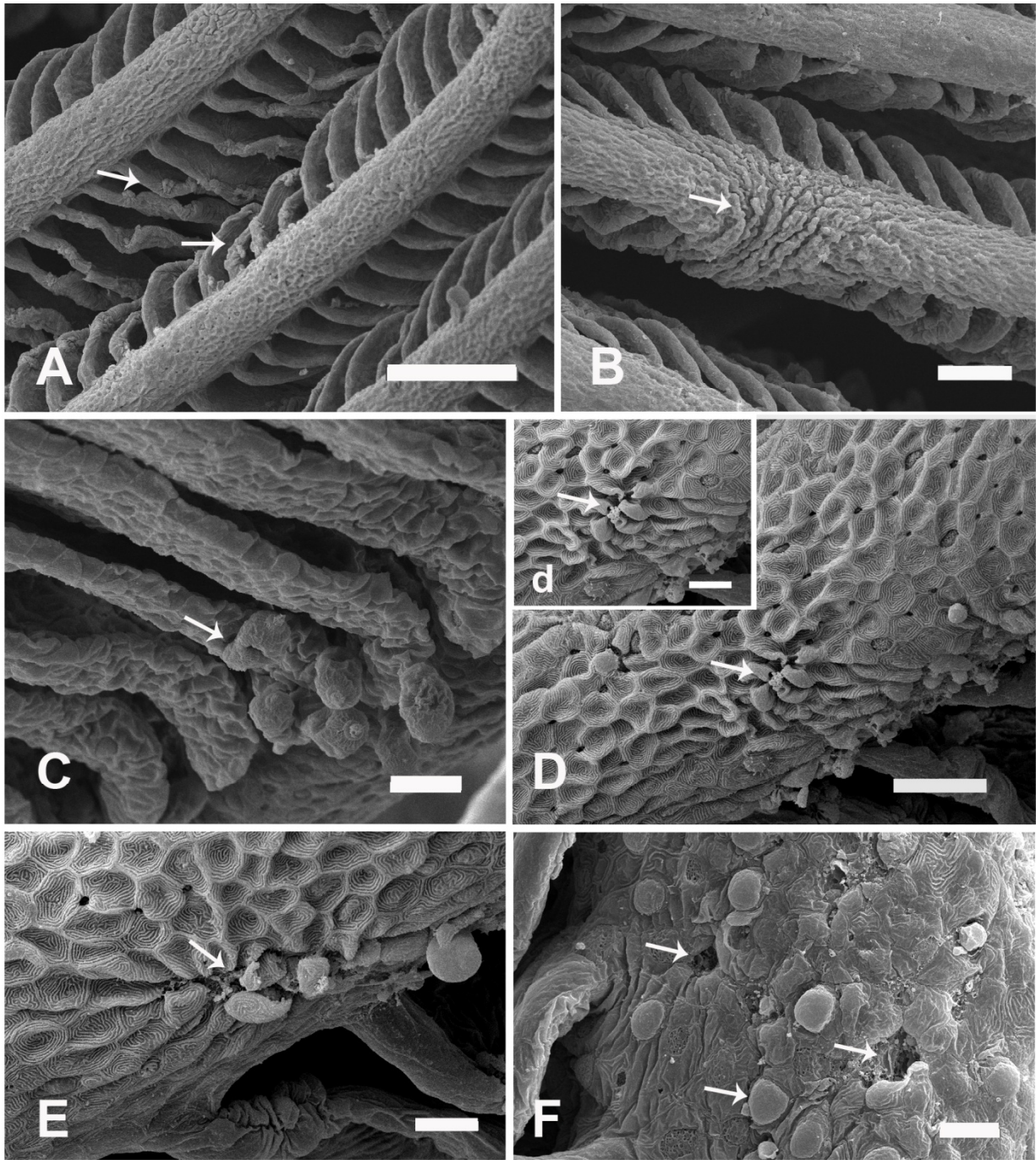


FIGURA 14 – Eletromicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados no ponto Braço do Norte. A- Presença de células hiperplásicas no tecido epitelial (seta) (escala = 100 $\mu$ m). B– A seta mostra uma região de hiperplasia tecidual na lamela primária (escala = 50 $\mu$ m). C– Presença de neoplasia nas lamelas secundárias (seta) (escala = 20 $\mu$ m). D e d– Ocorrência de células hiperplásicas no epitélio (seta D) e a presença de uma grande quantidade de células mucosas (seta d) (escalas = 20 $\mu$ m e 10 $\mu$ m, respectivamente). E- Células hiperplásicas e descamação das mesmas (seta) (escala = 10 $\mu$ m). F – Ocorrência de células hiperplásicas e descamação do epitélio (setas) (escala = 10 $\mu$ m).

b) Tubarão

As alterações encontradas neste ponto estão mais associadas com uma grande proliferação de células de cloreto (Figura 15A) e os danos de hiperplasia tecidual nas lamelas primárias, como demonstrado nas Figuras 15B e b.

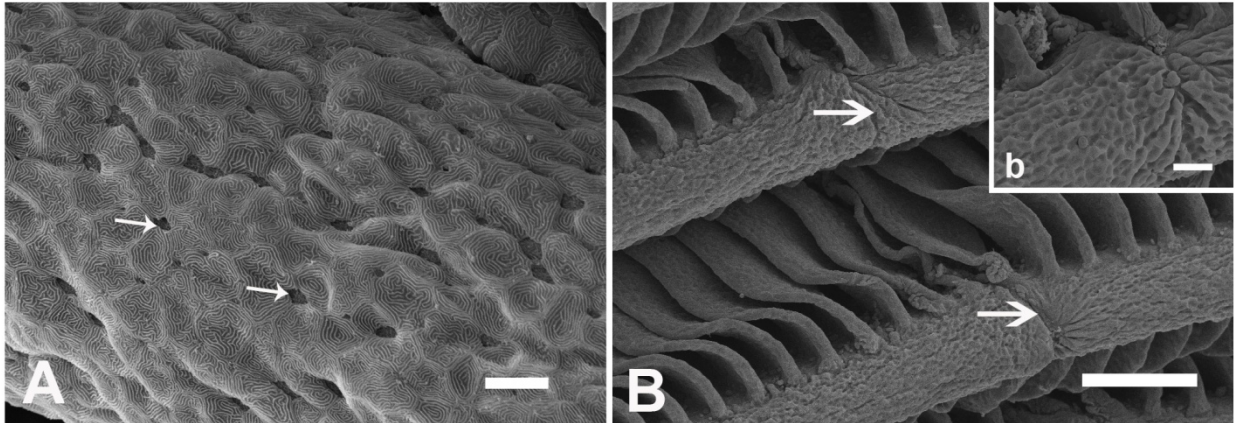


FIGURA 15 – Eletromicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados no ponto Tubarão. A– Grande número de células de cloreto (setas) (escala = 20 $\mu$ m). B- Lesões hiperplásicas nas lamelas primárias (setas) (escala = 100 $\mu$ m). b– Detalhe de uma lesão hiperplásica (escala = 20 $\mu$ c).

c) Capivari de Baixo

Neste ponto destacaram-se as lesões nas lamelas primárias (Figuras 16A e B) e a ocorrência de hiperplasia tecidual com características de neoplasia (Figura 16C). Houve também uma grande incidência de parasitas (Figura 16D). Na Figura 16d observa-se em detalhe o local de fixação do parasita na lamela secundária.

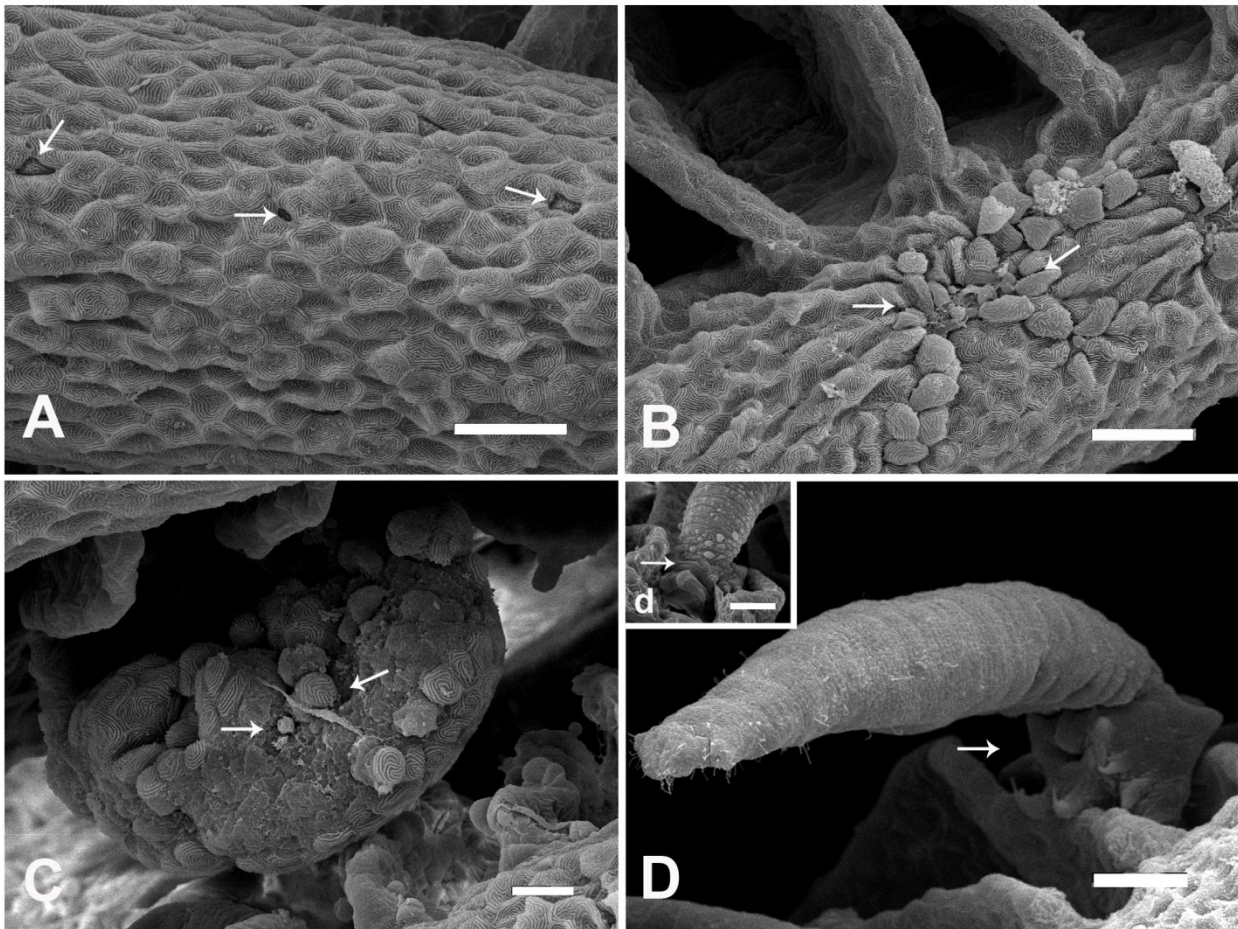


FIGURA 16 – Eletromicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados no ponto Capivari de Baixo. A- Presença de células de cloro (setas) (escala = 20µm). B- Células danificadas da lamela primária com o aparecimento de regiões com grande incidência de células hiperplásicas (setas) (escala = 20µm). C- Hiperplasia com característica de evento neoplásico (setas) (escala = 10µm). D - Ocorrência de ectoparasita fixando-se nas lamelas secundárias (seta). d – Detalhe mostrando a fixação do parasito na lamela (seta) (escalas = 20µm em ambas as fotos).

d) Laguna

Neste ponto foram observadas alterações tanto em lamelas primárias, como em secundárias. As lamelas secundárias apresentaram bastante alterações em alguns exemplares mostrando uma total desorganização das células epiteliais e na estrutura

da lamela (Figuras 17C e D). Nas lamelas primárias foram observadas hiperplasia celular, tecidual e descamação com perda de células epiteliais (Figuras 17E, F e G).

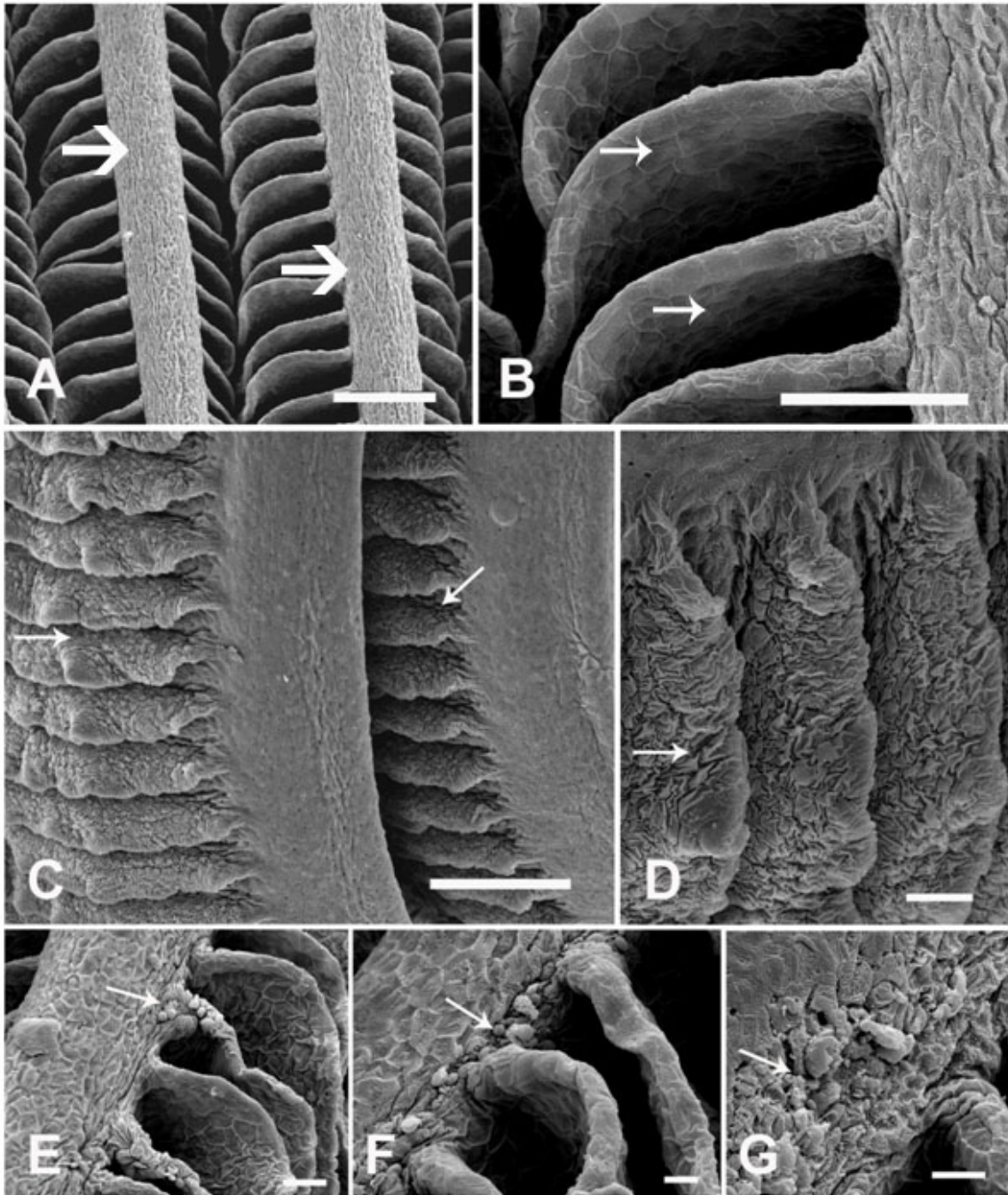


FIGURA 17 – Eletromicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados no ponto Laguna. A e B– Tecido normal onde são observadas as lamelas primária (setas maiores) e secundárias (setas menores) (escalas = 100 $\mu$ m, 50 $\mu$ m respectivamente). C e D- Alterações observadas nas lamelas secundárias como a desorganização das células epiteliais e eventos hiperplásicos (setas) (escalas = 100 $\mu$ m e 20 $\mu$ m respectivamente). E, F e G– Alterações encontradas nas lamelas primárias como hiperplasia celular (seta E), morte celular (seta F) e perda de células epiteliais (seta G) (escalas = 20 $\mu$ m, 10 $\mu$ m e 10 $\mu$ m respectivamente).

## 5 DISCUSSÃO

As questões ligadas ao meio ambiente vêm sendo polarizadas em duas vertentes principais: os problemas das grandes cidades, advindos da crescente concentração populacional, da falta de saneamento básico, da poluição industrial, da circulação de veículos, da disposição de lixo e do uso desordenado do solo urbano, e os problemas típicos do interior, relacionados com a exaustão e degradação dos recursos naturais através da expansão do extrativismo mineral e vegetal e da fronteira agropecuária (MENDES, 1994).

Apesar da grande quantidade de trabalhos que mostram o impacto sobre o rio Tubarão através das mais diversas análises (ESPINOSA, 2001; LUNARDI, 2005; HIGASHI e DIAS, 2004; BORTOLUZZI, 2009), ainda é pequeno o número que as correlaciona com biomarcadores de toxicidade, a fim de se obter uma ampla visão sobre suas reais condições (BENINCÁ, 2006).

O rio Tubarão apresenta uma vazão que aumenta no sentido montante - jusante. Desta forma, sabe-se que, além das suas propriedades hidrogeológicas, a vazão dos rios se relaciona diretamente com a capacidade de autodepuração e de diluição desses corpos d'água, ou seja, quanto maior a vazão, maior será esta capacidade (GONTIJO JÚNIOR e KOIDE, 2007).

Ao longo do seu trajeto, o rio Tubarão recebe uma significativa quantidade de substâncias poluidoras de origens domésticas, industriais e da agropecuária, sendo a maioria sem tratamento. Ainda, a extensa história de mineração do carvão mineral na região contribuiu de maneira significativa na contaminação do rio, tendo passado por períodos críticos, uma vez que, em Santa Catarina, a exploração do carvão data de 1885 e abrange áreas das bacias hidrográficas dos rios Tubarão, Urussanga e Araranguá, sendo principalmente impactadas pela lavra, beneficiamento, depósitos de rejeitos e resíduos de drenagem (AMARAL, 1998).

O principal problema de poluição hídrica decorrente da atividade carbonífera, seja nos locais de lavra ou de beneficiamento, dá-se principalmente devido à oxidação da pirita (sulfeto de ferro) que se encontra associada ao carvão. Exposta ao tempo, a

pirita é oxidada gerando ácido sulfúrico e compostos de ferro que são carregados até os cursos d'água. Estas águas ácidas são responsáveis por solubilizarem grande parte dos metais tóxicos como o cobre, ferro, manganês e zinco (LIMA, et al, 1998). Assim, a acidificação dos cursos de água é responsável pelo início da cadeia de impactos causados pelas atividades de mineração e beneficiamento do carvão sobre os recursos hídricos.

Na passagem por Braço do Norte, o rio recebe grande influência da região mineradora na sua cabeceira, especialmente do município de Lauro Müller, além do grande aporte de contaminantes decorrentes da suinocultura e de atividades industriais. Para este ponto foi possível observar um aumento significativo dos danos ao DNA e da PCO na segunda coleta, quando comparada e ao mesmo ponto da primeira coleta. Tal resultado indica que os peixes nesta área estão submetidos a algum nível de estresse oxidativo, uma vez que ambas as análises são sensíveis a tal tipo de alteração. Um estudo em conjunto realizado com amostras de sedimentos das quatro localidades considerando a segunda coleta, revelou uma grande presença de Cr e Cu neste ponto, provavelmente decorrente das atividades mineradoras e da suinocultura, a qual utiliza medicamentos e suplementos alimentares a base desses e outros metais (NUTRIENT REQUIREMENTS OF SWINE, 1998), o que poderia explicar a resposta obtida por tais biomarcadores.

Sabe-se que as macromoléculas, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e açúcares, são grandes complexos de átomos que fazem parte da maquinaria celular. Algumas delas possuem uma  $\frac{1}{2}$  vida curta e são rapidamente recicladas, porém muitas não, sendo vulneráveis a danos, de maneira que podem alterar significativamente sua funcionabilidade, em especial quando reagem com ERO's ou em processos de glicolização (TRUSCOTT, 2011). Grande parte dos tecidos e órgãos possui, além do seu material genético, proteínas perenes ou de longa durabilidade ou mesmo estabilidade na célula. Assim sendo, o acúmulo de modificações nessas moléculas podem alterar a propriedade das mesmas com conseqüências diretas ou indiretas para as células, tecidos ou mesmo órgãos. Tais processos podem afetar a saúde, adaptabilidade e qualidade de vida de um sistema biológico. Desta forma, efeitos agudos sobre estas moléculas podem levar a prejuízos crônicos posteriores aos

animais afetados (GRUNDY e STOREY, 1998). A PCO e os danos genéticos observados para este ponto poderiam relacionar-se diretamente a estes fatores.

Os metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico maior que  $5 \text{ g/cm}^3$  ou número atômico maior do que 20, correspondendo ao grupo de elementos químicos com massa atômica variando de 63,54 a 200,59, entretanto, o termo “metal pesado” é utilizado para elementos químicos que podem ser metais, semi-metais e mesmo não metais como o selênio. Os principais elementos químicos enquadrados neste conceito são: alumínio, antimônio, arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cobalto, cromo, ferro, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, selênio e zinco (TSUTIYA, 2000). Em pequenas quantidades alguns destes elementos são essenciais para a manutenção da vida, no entanto, a poluição por estes compostos tornou-se um sério problema ambiental e de saúde pública, uma vez que as concentrações que atingem os corpos hídricos geralmente excedem àquelas permitidas na legislação. Devido à sua grande persistência, estes metais constituem um grupo-chave de poluentes, visto que podem produzir efeitos deletérios mesmo em baixas concentrações, além de vários deles serem bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica (BURGERA e GOCHFELDB, 2005, SALAMI *et al.*, 2008). Especificamente, em relação ao cromo e ao cobre, apesar de possuírem propriedades químicas distintas, podem em alguns casos apresentar efeitos tóxicos semelhantes (KHANSARIA *et al.*, 2005; WANGA *et al.*, 2000, FAROMBI *et al.*, 2007).

O Cromo é um elemento natural encontrado principalmente na sua forma trivalente  $[\text{Cr}(\text{OH})^3]$  em rochas, animais, plantas e solo. No entanto, processos industriais e outras atividades antropogênicas levaram a um aumento da ocorrência de cromo hexavalente ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) no ambiente o qual é responsável por apresentar a maior parte dos efeitos tóxicos no sistemas biológicos (CHENG *et al.* 1998). Estes efeitos deletérios são dependentes do estado oxidado do cromo, partindo da baixa toxicidade da forma elementar à alta toxicidade da forma hexavalente. Estas espécies podem potencialmente afetar o material genético de diversas formas, dentre elas através de ligações cruzadas entre as duplas fitas, ligações cruzadas entre aminoácidos de proteínas do DNA, quebra de fitas do DNA, adutos Cr-DNA e adutos radical-DNA (VELMA *et al.*, 2009).

O cobre, por sua vez, é uma substância que ocorre naturalmente no ambiente, sendo amplamente utilizado pelo homem na indústria e agricultura. A produção de cobre cresceu nas últimas décadas, aumentando também a sua ocorrência nos ambientes naturais e ocupados pelo homem. Apesar disso, é importante na manutenção da vida através de processos bioquímicos servindo de co-fator de várias proteínas em processos redox e como componente alostérico de coprozimas como a citocromo c-oxidase, superóxido dismutase, dentre outras (ARUOMA *et al.* 1991). Contudo, o excesso de cobre pode ser letal, agindo predominantemente na formação de radicais reativos que danificam DNA e outras macromoléculas. O cobre, em conjunto com o  $H_2O_2$ , leva à fragmentação do DNA através da ativação de endonucleases ou ataque direto às fitas, podendo agir inclusive na desestabilização da cromatina.

Portanto, sabendo que alterações na estrutura do DNA e de proteínas tem sido encontradas associadas com a exposição a um grande número de contaminantes, dentre eles os metais pesados (PANDRANGI *et al.*, 1995; STEINERT, 2003), e que muitas dessas moléculas são altamente reativas e possuem uma alta afinidade com proteínas e mesmo com a molécula de DNA (PISONI *et al.*, 2004), pode-se concluir que os exemplares de *G. brasiliensis* coletados neste ponto estão sujeitos a alterações nas moléculas proteicas bem como nas cadeias de DNA, que podem causar mutações, gerando uma cascata de eventos subseqüentes que levam a disfunções na replicação e reparação das fitas, processos descontrolados de divisões celulares, e que podem gerar neoplasias nos tecidos e até mesmo a morte celular (VERNIER, 2001).

Os processos metabólicos de biotransformação de fase I e II em animais aquáticos são de fundamental importância para a detoxificação e excreção de xenobiontes desses organismos (GOKSOYR e FOURLIN, 1992). Em alguns casos, estes processos de biotransformação podem resultar na formação de ERO's, dependendo do tipo e da concentração dos compostos metabolizados (KARUZINA e ARCHAKOV, 1994). Como descrito anteriormente, estas espécies reativas podem reagir com ácidos nucléicos, lipídios, carboidratos e proteínas danificando as células. A fim de combater estes efeitos, sistemas de defesa antioxidantes como o complexo enzimático glutathione S-transferase são utilizados, apresentando padrões enzimáticos

que podem ser considerados como biomarcadores de exposição a poluentes (SILVA *et al.*, 2004).

As repercussões dos danos causados pelas ERO's ocorrem quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO's e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes, sendo estabelecido assim o estresse oxidativo. Este pode ser mensurado através da interferência sobre as funções celulares dos animais expostos, assim como pela determinação indireta de seus efeitos sobre as membranas celulares avaliados, por exemplo, através da lipoperoxidação ou danos em outras macromoléculas celulares (LIMA e ABDALLA, 2001).

No ponto de Tubarão observou-se uma resposta semelhante ao ponto de Braço do Norte para a enzima GST. Esta resposta poderia estar relacionada ao fato do ponto situar-se no interior da cidade, onde o rio recebe grande aporte de efluentes urbanos que se caracterizam por apresentar diversas classes de contaminantes, de fármacos a poluentes organopersistentes (NÓVOA-VALIÑAS *et al.*, 2003). Isto poderia explicar o aumento da atividade desta enzima para a segunda coleta, visto que estas classes de contaminantes são metabolizadas no fígado pelas enzimas de fase I e fase II, de modo a serem excretadas pelo organismo, e a GST como participante da fase II passa a ser um marcador de metabolismo e de atividade deste sistema de detoxificação.

Pérez-López *et al.* (2002) observou uma relação dose-dependente de contaminante para a ativação da GST, em trutas expostas a PCB's corroborando o achado neste trabalho, uma vez que estes compostos organoclorados estão diretamente envolvidos com os processos de industrialização. Além disso, a ativação da GST neste ponto indicaria também que está havendo uma maior atividade do sistema de bioativação também (correspondente à fase I) e, com isso, poderia estar relacionada com a produção de metabólitos secundários dos compostos que foram metabolizados, os quais muitas vezes apresentam efeitos mais tóxicos que as moléculas originais. Nesta classe encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que constituem uma importante classe de contaminantes que apresentam origem urbana também. Tal atividade poderia também levar a célula a apresentar um posterior quadro de estresse oxidativo, uma vez que a própria atividade do sistema P450 é gerador destas moléculas reativas, e se associado a isso houver um quadro de inativação do sistema antioxidante

da célula, os danos podem ser bastante diversificados. Contudo, esta suposição não pode ser afirmada visto que os biomarcadores específicos para o estresse oxidativo não se mostraram reativos para estas análises.

Seguindo o curso do rio chegamos ao ponto de Capivari de Baixo, local onde se encontra a termelétrica Jorge Lacerda e notou-se um aumento da LPO, similar às outras análises bioquímicas para os pontos anteriores. Além da atividade específica de enzimas e de dados de outras macromoléculas, os efeitos do estresse oxidativo podem ser notado através da interferência sobre a função celular dos animais, assim como pela determinação indireta de seus efeitos sobre as membranas celulares avaliados através da lipoperoxidação (GUTTERIDGE, 1995). A LPO é um dos eventos citotóxicos primários que desencadeiam seqüências de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade que alteram o fluxo iônico e de outras substâncias, resultando na perda de seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula. Isso pode dar seqüência a alterações do material genético bem como no comprometimento de proteínas como as dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA e ABDALLA, 2001, POPOVA e POPOV, 2001).

Desta forma, é possível dizer que nesta área os exemplares de *G. brasiliensis* coletados encontram-se em um processo de estresse oxidativo, visto que apresentam altos níveis de hidroperóxidos. Algumas classes de poluentes, provavelmente provenientes das áreas de entorno poderia agir de forma a induzir este biomarcador, dentre eles os metais pesados, já discutidos anteriormente, e os HPA's, mesmo que de forma indireta, como discutido acima (GUTTERIDGE, 1995; KOH *et al.*, 1996).

Esta classe de poluente constitui-se de compostos orgânicos que se caracterizam por apresentarem dois ou mais anéis carbônicos condensados. Eles são formados durante a combustão incompleta de materiais contendo carbono e hidrogênio, podendo ser originados por atividades antropogênicas (queima de florestas, atividades industriais e residenciais) ou naturais (vulcões, biosíntese) (VASCONCELLOS *et al.*, 1998). Os HPAs são emitidos principalmente na forma gasosa, entretanto uma porção significativa está associada às partículas finas carbonadas.

Até o começo do século XX havia um equilíbrio natural entre a produção e a degradação de HPAs de modo a manter sua concentração no ambiente baixa e constante (NICOLAS, 1999). No entanto, com o aumento do desenvolvimento industrial, esse balanço natural foi perturbado, aumentando constantemente a razão entre a produção e a degradação de HPAs. Estes compostos podem atingir os ambientes aquáticos, tanto por aporte direto quanto indireto e sua presença pode ser detectada nos componentes bióticos ou abióticos dos sistemas (DOMINGOS, 2006). É sabido que os HPAs possuem diversos efeitos tóxicos que vão desde efeitos carcinogênicos a efeitos neurotóxicos, sendo, portanto, de grande importância ecotoxicológica (AL-HASSAN *et al.*, 2000; JOHNSON-RESTREPOA *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2007) encontrou elevados teores de PAH's e PCB's nos solos de áreas de entorno de termelétricas comparados a um ponto referência, portanto seria de se esperar que, devido a proximidade deste ponto com a usina, haja um aporte significativo de PAH's bem como de metais, provenientes da queima e beneficiamento do carvão neste local, que justifiquem o aumento desta análise para este ponto. Contudo, maiores investigações sobre as possíveis causas da resposta deste biomarcador devem ser realizadas de modo a elucidar neste caso sua principal fonte. Por fim, o ponto de Laguna foi o que apresentou menor resposta perante aos biomarcadores bioquímicos, contudo, houve uma variação similar ao ponto de Braço do Norte referente à genotoxicidade entre os períodos amostrais. De maneira semelhante, foi encontrado um alto teor de cobre no sedimento deste ponto, o que pode ter ocasionado um maior dano na estrutura do DNA para este ponto nesta coleta. Mesmo assim, é importante ressaltar que a falta de outros resultados para este ponto não indica uma não contaminação do ambiente, mas sim que esta pode estar sendo neutralizada, não expressa ou ainda adaptada à condição de vida dos organismos neste local. Por outro lado, a espécie considerada neste trabalho pode também não ser a mais indicada para este tipo de avaliação.

Talvez pela grande influência marinha neste local de coleta haja uma maior diluição de poluentes, diminuindo sua biodisponibilidade aos peixes e fazendo com que seus efeitos sejam menos visíveis, uma vez que fatores como salinidade, variação térmica, dureza e outros fatores físicos da água têm consequência direta sobre a

biodisponibilidade de xenobióticos presentes no corpo hídrico (LONGE e ENEKWECHI, 2006; MIKITA e VYBÍRAL, 2007). Ainda, seguindo esta linha de raciocínio, a baixa concentração de poluentes à qual estes peixes estariam expostos, seria suficiente para que adaptassem suas respostas metabólicas ao longo do seu ciclo de vida de modo a conter os efeitos de um possível dano irreversível.

Apesar desta possibilidade, não podemos ignorar que boa parte dos contaminantes presentes na água são bioacumulados pelos peixes e, portanto, biomagnificados ao longo da cadeia. Assim sendo, a preocupação com relação à contaminação local não pode ser subestimada devido a uma falta de expressão dos biomarcadores.

A análise da enzima acetilcolinesterase tem sido utilizada como biomarcador de efeito e exposição a compostos persistentes no ambiente natural, como os poluentes organopersistentes, alguns metais, e em especial os pesticidas organofosforados e os carbamatos (STURM *et al.*, 2000). Ao ser observada uma diminuição na atividade da AChE muscular dos peixes da primeira coleta, pode-se supor uma possível contaminação do local por compostos como metais, organofosforados e/ou carbamatos, oriundos das diversas culturas do entorno, visto que são as principais fontes de origem de tais compostos.

A atividade da acetilcolinesterase é conhecida por ser inibida por estas classes de pesticidas (STURM *et al.*, 2000). Outros estudos ainda comprovam que esta enzima pode ser inibida por poluentes como metais pesados e hidrocarbonetos, no entanto sendo necessárias concentrações altas de tais poluentes (PAYNE *et al.*, 1996), o que poderia explicar a inibição desta enzima para o ponto de Capivari de Baixo para as duas coletas, lembrando que este ponto encontra-se ao lado da termelétrica.

Ainda a respeito da AChE muscular, a atividade dessa enzima apresentou-se aumentada na coleta de junho/10. Este aumento de atividade poderia estar relacionado com o período de cheia do rio. Ou seja, mesmo de maneira a apresentar um aumento da lixiviação dos poluentes para o rio, essas condições podem ser responsáveis pela diluição dos compostos presentes no corpo hídrico, tornando-os menos biodisponíveis para os peixes, fazendo com que seus efeitos não sejam sentidos nestes organismos.

Contudo, afirmativas concretas sobre essas causas são difíceis de serem feitas, uma vez que diversos fatores influenciam na dinâmica dos poluentes nos corpos hídricos.

Quanto à atividade da AChE cerebral, pode ser que os poluentes responsáveis pela resposta da AChE muscular não sejam capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica dos organismos avaliados, fazendo com que seus efeitos não se reproduzam neste órgão (CABAÑERO *et al.*, 2004).

Entre os diversos biomarcadores utilizados em estudos de monitoramento ambiental, a histopatologia é considerada uma eficiente ferramenta ecotoxicológica para determinar os efeitos tóxicos causados por agentes estressores em nível de organismo, representando uma integração cumulativa de efeitos bioquímicos e celulares. Estas alterações aparecem como uma resposta para avaliar o estresse após períodos de exposição aguda ou crônica.

O fígado é o principal órgão responsável pelos mecanismos de biotransformação e bioativação de poluentes e, portanto, apresenta-se como um excelente órgão-alvo para estudos de danos resultantes da exposição a diferentes contaminantes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; BENICÁ, 2005; AKAISHI *et al.*, 2004; RABITTO *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2009; KATSUMITI *et al.*, 2009; RABIOTTO *et al.*, 2011). Ainda, a sensibilidade aos poluentes, bem com as lesões induzidas por estes, podem variar de acordo com a suscetibilidade da espécie, a idade dos animais, o sexo e o estágio de maturidade sexual, a sazonalidade e a capacidade de migração (BERNET *et al.*, 1999). Apesar de não ter sido observada nenhuma diferença entre os pontos para nenhuma das coletas, é importante considerar, mesmo descritivamente, alguns tipos de lesões. No tecido hepático algumas alterações podem ser consideradas irreversíveis, levando à perda parcial ou total da função do órgão, como as necroses presentes em boa parte dos espécimes amostrados. Este dado por si já corrobora alguns biomarcadores bioquímicos onde danos em membrana e no DNA podem levar à morte celular por necrose ou mesmo apoptose, o que possibilitaria o aparecimento das necroses. Alguns poluentes destacados acima são também capazes de induzir este tipo de lesão, como os metais e os HPA's.

As respostas inflamatórias, também muito observadas neste estudo através da infiltração de leucócitos, representam eventos de células capazes de penetrar nas

paredes dos vasos sanguíneos e atingir o tecido. Estas células migram para o tecido por dois motivos, ou para combater organismos invasores, ou estimuladas pela presença de morte celular, principalmente se o tipo de morte for a necrose.

A lipidose celular ou esteatose diz respeito ao acúmulo de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos, alterando o metabolismo destas células comprometendo sua função, e podem estar relacionadas ao acúmulo fisiológico de contaminantes lipossolúveis (BIAGIANTI-RISBOURG *et al.*, 1997). Lesões neoplásicas identificadas no tecido hepático são consideradas mais específicas para detecção de exposição a substâncias contaminantes como HPA's, metais pesados e POP's. Este tipo de lesão comprova a presença em baixas concentrações de poluentes como os relatados acima, e constituem lesões permanentes que apresentam um grande potencial de evoluírem para doenças mais graves como o câncer. O surgimento deste tipo de lesão é altamente preocupante e significa um risco iminente, tanto para os animais de vida selvagem, comprometendo significativamente a biodiversidade local, como para as populações humanas que fazem uso da água ou utilizam peixes na sua dieta.

As brânquias dos peixes são os principais sítios de trocas gasosas além de estarem envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-base, excreção de compostos nitrogenados e gustação, exercendo desta forma, papel fundamental na vida desses organismos. O epitélio branquial é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloro, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas. Assim, alterações neste órgão podem representar tanto exposição aguda como crônica, dependendo do tipo de xenobiótico. Um aspecto importante no uso deste tipo de tecido na avaliação da qualidade da água é o fato deste estar em contato direto com a água, e por isso, servir como um biomarcador morfológico direto da ação dos contaminantes dispersos no corpo d'água (MACHADO, 1999; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007).

Necroses, morte celular com perda do epitélio branquial e processos neoplásicos, também observados neste estudo, referem-se às lesões que refletem o efeito direto de poluentes que ocorrem em condições de maior toxicidade, tanto no que se diz respeito à concentração, quanto ao tempo de exposição. A degeneração por necrose e apoptose das células branquiais, essencialmente células de cloro e

pavimentosas, foi mencionada em estudos de natureza ultraestrutural realizados em teleósteos submetidos a diferentes poluentes (MAZON *et al.*, 2002). Estas lesões podem resultar da acumulação de contaminantes, induzindo o dano celular e tendo como resposta posterior um aumento da substituição celular e da regeneração epitelial em organismos adaptados ou resistentes à contaminação local (PELGROM *et al.*, 1995).

No que se diz respeito às células de cloro, estas são grandes, encontram-se esparsas na superfície lamelar, sendo ricas em mitocôndrias e atuando em processos de transporte ativo de íons em peixes marinhos e de água doce (EVANS, 2008; PERRY, 1997). Segundo Perry (1997), em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células de cloro nos filamentos e na superfície lamelar da brânquia, o que seria condizente com os resultados encontrados neste trabalho.

As células produtoras de muco desempenham um papel importante na tolerância às doenças, patógenos, substâncias tóxicas, além de exercerem outras funções relacionadas às trocas gasosas e a boa funcionabilidade das brânquias (SHEPHARD, 1994). O aumento do número dessas células bem como da atividade secretora de muco pode associar-se a uma resposta ao estresse causado pela presença de contaminantes na água (DOMINGOS, 2006).

Outro dado interessante do trabalho foi a presença de diferentes parasitas no tecido hepático e branquial. A presença de parasitas pode ser um indicativo de estresse ambiental, sendo utilizado como um parâmetro morfológico (GALLI *et al.*, 2001). Em estudos de biomonitoramento, a presença de parasitas pode ser considerada um importante indicador de toxicidade, visto que o aumento da sua incidência indica diminuição na resistência imunológica, e a sua diminuição pode indicar um desequilíbrio nas relações hospedeiro-parasita do ecossistema (AKAISH *et al.*, 2004). O registro dessa incidência fica obscuro quando se fala em exposição crônica e debilidade imune. Portanto, da mesma forma que a presença de parasitas na ocasião, pode ser considerada um aspecto ecológico normal, é possível que alguma interferência ambiental esteja atuando de modo a tornar os peixes mais suscetíveis ao parasitismo, uma vez que parasitas do tipo 1 não foram identificados em nenhum indivíduo da coleta

de junho/10. Porém, maiores estudos seriam necessários para se obter dados conclusivos sobre alterações nos padrões de parasitismo desta espécie.

Desta forma, observou-se que todos os pontos de coleta apresentaram-se impactados, com respostas diferentes para alguns biomarcadores, mas culminando em alguns tipos semelhantes de alterações. Desta forma, podemos concluir que o uso de biomarcadores é uma ferramenta importante para compreender as fontes impactantes dos ambientes e tentar relacioná-las à saúde dos animais expostos, bem como avaliar os riscos para a exposição dos animais que dependem destes cursos d'água ou mesmo para a populações humanas que fazem uso desta água.

Apesar de muitas perguntas continuarem sem respostas precisas, é preciso dizer que o diagnóstico ambiental proporciona mais um dado às análises de qualidade já existentes, gerando resultados que contribuam num monitoramento mais fidedigno dos ambientes pelos órgãos ambientais responsáveis, uma vez que em muitos destes apenas os aspectos físico-químicos são considerados.

## 6 CONCLUSÕES

Apesar de alguns biomarcadores terem mostrado efeitos distintos, os resultados sugerem que ocorre diferença sazonal no que diz respeito aos efeitos dos poluentes na espécie *Geophagus brasiliensis*.

No ponto de Braço do Norte, observa-se a maior dano em macromoléculas, através do ensaio cometa e da carbonilação proteica, alguns fatores como a atividade mineradora e a suinocultura no entorno, poderiam estar relacionada com este fato.

Para o ponto de Tubarão observou-se um aumento da atividade da glutathione S-transferase, o que poderia estar relacionado com o grande aporte de contaminantes por parte dos efluentes urbanos.

Em Capivari de Baixo observou-se um aumento da peroxidação lipídica. Neste ponto é de se esperar que a proximidade do rio com a termelétrica tenha influência no aporte direto de alguns contaminantes específicos e característicos por induzirem respostas deste tipo neste biomarcador.

Laguna apresentou uma elevação dos danos em material genético, mas necessitam maiores investigações para determinar as causas desta resposta. Ainda o fato da forte influência da água do mar sobre este ponto pode-se relacionar à capacidade depuradora da água sobre os contaminantes.

Os biomarcadores morfológicos mostraram que a espécie *Geophagus brasiliensis* é afetada por poluentes dispersos na água, principalmente se observados os danos encontrados nas brânquias, podendo estas lesões afetar significativamente a função do órgão e do organismo como um todo.

Desta forma, concluí-se que, apesar dos peixes dos diversos pontos exibirem algumas respostas biológicas semelhantes, deve haver uma influência local sobre cada um dos pontos, sendo necessárias algumas análises específicas para que se identifique concretamente estes contaminantes bem como suas fontes de origem.

*Geophagus brasiliensis* mostrou ser uma espécie resistente à presença de poluentes na água, apesar de alguns biomarcadores utilizados poderiam estar relacionados com aspectos referentes ao tipo de poluição naquele ponto estudado.

De maneira a corroborar as hipóteses sobre os aportes pontuais de contaminação, as análises químicas em sedimento e em tecidos alvo não podem ser descartadas, uma vez que elucidam boa parte das questões em aberto neste estudo.

Pelos resultados apresentados fica clara a necessidade urgente de ampliar os estudos na região, investigando outras espécies de peixes nestes mesmos pontos amostrados associando com análise química nos tecidos.

O rio Tubarão encontra-se impactado pela atividade antrópica e os dados deste trabalho, juntamente com dados fisico-químicos existentes, são suficientes para iniciar a elaboração de um plano de manejo para a bacia, assim como alertar as autoridades e população para este grave problema ambiental.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHA, M. C. F.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná. **Brasil. Acta Sci.** v. 26, n. 1, p. 37-45, 2004.

ADAMS, H. R. Drogas que atuam sobre os sistemas nervosos somático e autonômico. **Farmacol. Terap Vet.** Booth NH, McDonald LE (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1992.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. **Arch Environ Contam Toxicol.** 46: 244–253. 2004.

AL-HASSAN, J. M.; AFZAL, M.; RAO, C. V. N.; FAYAD, S. Petroleum hydrocarbon pollution in sharks in the arabian Gulf. **Environ Contam Tox.** v. 65, n. 3, p. 391-398. 2000.

AMARAL, E. 1998. **Estudo de viabilidade da recuperação das áreas mineradas na região sul de Santa Catarina.** Relatório JICA. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente-SDM. Florianópolis. 1998.

ANDREATA, J. V.; TENORIO, M. M. Aspectos da alimentação de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Act. Biol. Leopold.** v. 19, n. 2, p. 185-195, 1997.

ARAÚJO, F. G.; SANTOS, L. N. Distribution of fish assemblages in Lajes Reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Biol.** v. 61, n. 4, p. 563-576, 2001.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; GAKEWESKI, E.; DIZDAROGLU, M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** v. 273, p. 601–604. 1991.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** 29: 113-123. 2006.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v. 415, p. 167-184. 1998.

BENINCÁ, C. **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho - Jaguaruna (SC) e Santa Marta-Laguna (SC), utilizando *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE).**

Dissertação de Mestrado em Genética pelo Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARD-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution. **J. Fish Dis.** V.22, p. 25-34.1999.

BIAGIANTI-RISBOURG, S., PAIRAULT, C., VENET, G., BOULEKBACHE, H. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes. **Toxicology.** v. 145, p. 203-215, 1997.

BORTOLUZZI, I. P. **Projeto de proteção e recuperação de nascentes.** Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão e Complexo Lagunar. Relatório Técnico. Tubarão. 2009.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

BURGERA, J.; GOCHFELDB, M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. **Environ Res.** v. 99, i. 3, p. 403-412. 2005.

CATTARUZZA, M.; HECKER, M. Protein carbonylation and decarboxylation: a new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress. **Circ. Res.** v. 102, p. 273-274. 2008.

CAVICHIOLO, F. **Desempenho e morfologia de brânquias e fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis e fontes de proteínas.** Tese de Doutorado em Zootecnia pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 2005.

CHENG, L.; LIU, S.; DIXON, K. Analysis of repair and mutagenesis of chromium induced damage in yeast, mammalian cells and transgenic mice. **Environ. Health Perspect.** v. 106, p. 1027–1032. 1998.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA in different models. **Cell Biol Toxicol.** 2008.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biol.** 3: 1-10. 2002.

DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V.J.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** 7:88. 1961.

EVANS, D. H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **Am. J. Physiol.** v. 295, p. 704- 713. 2008.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJMOKE, Y. R. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Catfish (*Clarias gariepinus*) From Ogun, Nigeria. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v. 4, i. 2, p. 158-163. 2007.

Fundação Ecológica do Vale do Paraíba, 2011. Disponível em: <[http://www.fundevap.org.br/lctiofauna\\_especies.html](http://www.fundevap.org.br/lctiofauna_especies.html)>. Acesso em março de 2011.

GALLI, P.; CROSA, G.; MARINELLO, L.; ORTIS, M.; D'AMELIO, S. Water quality as a determinant of the composition of fish parasite communities. **Hydrobiologia.** v. 452, p. 173–179. 2001.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M. ; CARROLA, J. ; ONTAINHASFERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 59, n. 2, p. 376-381. 2007.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatotoxicology and environmental monitoring. **Aquat Toxicol.** 22: 287-312. 1992.

GONTIJO JUNIOR, W. C.; KOIDE, S. Análise das metodologias para avaliação e dimensionamento de redes fluviométricas. In: XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2007, São Paulo. **Anais do XVII Simpósio Brasileiro de recursos Hídricos.** Porto Alegre : ABRH, 2007. v. 1. p. 1-20. 2007.

GRUNDY, J. E.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. **J. Comp. Physiol.** v. 169, p. 132-142. 1998.

GUTTERIDGE, J. M. C.; Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.** v. 41, n.12, p.1819-1828. 1995.

HIGASHI, R. R.; DIAS, R. D. Erodibilidade dos solos residuais de granito do município de Tubarão. In: **Simpósio Brasileiro de Desastres Naturais.** Anais Florianópolis GEDN/UFSC. Florianópolis. v. 1, p. 144-158. 2004.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Monitoramento da qualidade das águas dos rios da região metropolitana de Curitiba, no período de 1992 a 2005.** 2005.

JESWINDER, S.; DEXTER, D. T.; LESS, A. J.; DANIEL, S.; AGID, YVES.; JAVOY-AGID, F.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's

disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann Neurol.** v. 36, i. 3, p. 348–355. 2004.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analyt Biochem.** 202: 384-389. 1992.

JOHNSON-RESTREPOA, B.; OLIVERO-VERBELB, J.; LUA, S.; GUETTE-FERNÁNDEZ, J.; BALDIRIS-AVILAB, R.; O'BYRNE-HOYOSB, I.; ALDOUSA, K. M.; ADDINKA, R.; KANNANA, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. **Environ Pollut.** v. 151, i. 3, p. 452-459. 2008.

KARUZINA, I. I.; ARCHAKOV, A. I. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monooxygenase reactions. **Free Rad Biol Med.** 16:73-97. 1994.

KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; DA SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FREIRE, C. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environ. Monit. Assess.** v. 152, p. 209–222. 2009.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **J Biol Chem.** 251: 6183-6188. 1976.

KHANSARI, E. F.; GHAZI-KHANSARI, M. ABDOLLAHI, M. Heavy metals content of canned tuna fish. **Food Chem.** v. 93, p. 293–296. 2005.

KIDD, P. M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern. Med. Rev.** v. 1, p.155-176. 1997.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2002.

KOH, J. Y.; SUH, S. W.; GWAG, B. J.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science.** v. 272, p. 1013–1016. 1996.

KULLANDER, S. O. Cichlidae (Cichlids). In: **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. p. 605-654. 2003.

LEE, R.F., STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.** v. 544, p. 43–64. 2003.

LEVNE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 464–478. 1990.

LIMA, E. B. N. R.; LIBOS, M. I. P. C. Impactos das Contribuições de Efluentes Domésticos e Industriais na Qualidade da Água na Bacia do Rio Cuiabá - Perímetro Urbano. In: VI Simpósio Italo- Brasileiro de engenharia Sanitária e Ambiental, 2002, Vitória -ES. **VI Simpósio Italo- Brasileiro de engenharia Sanitária e Ambiental.** Rio de Janeiro-RJ : ABES- Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2002.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 37, p. 294-303. 2001.

LIMA, M. C.; MICHELS, M. L.; BORTOLUZZI, I. P.; STÜPP, V.; ZÜGE, F. Estudo de sedimentos e águas do Rio Tubarão em termos de metais pesados. **Rev. Episteme.** v. 5, n. 14. Tubarão: UNISUL. 1998.

LOMAESTRO, B. M.; MALONE, M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. **Ann. Pharmacother.** v. 29, p. 1263-1273. 1995.

LOWE-McCONNELL, R. H. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo.** p. 534. 1999.

LUNARDI, G. M. **A bacia hidrográfica do Rio Tubarão e Complexo Lagunar: educação ambiental e sustentabilidade sob a ótica de alunos e professores do ensino médio.** Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina. Criciúma. 2005.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Unopar Científica.** v. 1, n. 1, p. 63-76. 1999.

MADI, R. R.; UETA, M. T. O papel de Ancyrocephalinae (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de *Geophagus brasiliensis* (Pisces: Cichlidae), como indicador ambiental. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** Jaboticabal, v. 18, n. 2, p. 38-41, 2009.

MAGALHÃES, P. C. Hidrologia Superficial em Engenharia Hidrológica. **UFRJ/ABRH.** 1989.

MARIONNET, D.; DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunol.** 21: 80-91. 2006.

MARTINEZ-TABCHE, L.; RAMÍREZ, B. M.; GERMÁN-FAZ, C.; GALAR, C. I.; MADRIGAL, O. M.; ULLOA, G. V.; OROZCO, F. M. Toxic effect of sodium dodecylbencensulphonate, lead, petroleum and their mixtures on the activity of

acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. **Environ Toxicol Water**. Qual 12: 1–5. 1997.

MASFARAUD, J. F. DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo(a)pyrene. **Toxic in vitro**. 6: 1715-1733. 1992.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res.** v. 88, p. 52-63. 2002.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Rad Biolo Med**. 26: 202-226. 2002.

MENDES, F. E. **Uma Avaliação dos Custos de Controle da Poluição Hídrica de Origem Industrial no Brasil**. Dissertação de Mestrado no Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós Graduação e Pesquisa de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1994.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ. Inter.** v. 34, p. 939 – 949. 2008.

MUÑOZ , H. R. Impactos e conflitos na gestão de recursos hídricos do sul da Santa Catarina, Brasil. In: **III Encuentro de las Aguas - Agua, Vida y Desarrollo**. Santiago. Instituto Interamericano de Capacitación Agrícola - IICA. v. I. p. 28-28. 2001.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis***. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2004.

NICOLAS, J. M. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. **Aquat Toxicol**. v. 45, i. 2-3, p. 77-90. 1999.

NÓVOA-VALIÑAS, M. C.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MELGAR, M. J. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic glutathione S-transferases from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** v. 131. 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol**. 74, 53–69. 2005.

OLIVEIRA, C. P. M. S. **Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo.**

Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mut.**, New York, v. 26, p. 345-356., 1995.

PARAGUASSU, A. R. ALVES, D. R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos do acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Osteichthyes: Cichlidae) do Reservatorio de Lajes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Seropedica**, v. 14, n. 1, p. 35-39, 2005.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollut Bull.** v. 32, p. 225-23. 1996.

PELGROM, S.; LAMERS, L.; LOCK, R. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicol.** v. 32, p. 303-320. 1995.

PÉREZ-LÓPEZ, M.; NÓVOA-VALIÑAS, C.; MELGAR-RIOL, M. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. **Toxicol. Lett.** v. 136, i. 2, p. 97-106. 2002.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Ann. Rev. of Physiol.** v. 59, p. 325-347. 1997.

PISONI, M.; COGOTZI, L.; FRIGERI, A. CORSI, L.; BONACCI, S.; LACCOCA, A.; LANCINI, L.; MASTROTOTARO, F.; FOCARDI, S.; SVETTO, M. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). **Environ. Res.** v. 96, i. 2, p. 63–175. 2004.

POPOVA, M. P.; POPOV, C. S. Damage to subcellular structures evoked by lipid peroxidation. **Zeitschrift für Naturforsch.** v. 57, p. 361–365. 2002.

Prefeitura Municipal de Braço do Norte, 2011. Disponível em: <<http://www.bracodonorte.sc.gov.br/home/index.php>>. Acesso em março de 2011.

Prefeitura Municipal de Capivari de Baixo, 2011. Disponível em: <<http://www.capivaridebaixo.sc.gov.br/home/index.php>>. Acesso em março de 2011.

Prefeitura Municipal de Laguna, 2011. Disponível em: <<http://www.laguna.sc.gov.br/>>. Acesso em março de 2011.

Prefeitura Municipal de Tubarão, 2010. Disponível em: <<http://www.tubarao.sc.gov.br/>>. Acesso em março de 2011.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. Oxford University Press. New York. p. 257–258. 2000.

RABITTO, I.; ALVES COSTA, J. R. M.; AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 60, p. 147–156. 2005.

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ADILSON, A.; HOLANDA, I. B. B.; GALVÃO, R. C. F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M. L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.** v. 37, p. 56 – 65. 2011.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

SALAMI, I. R. S.; RAHMAWATI, S.; SUTARTO, R. I. H.; JAYA, P. M. Accumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish in Cage Aquaculture at Cirata Reservoir, West Java, Indonesia. **Anna NY Acad Sci**. Blackwell Publishing. v. 1140, n. 1, p. 290-296(7). 2008.

SANTOS, A. F. G. N.; SANTOS, L. N.; ARAÚJO, F. G.; SANTOS, R. N.; ANDRADE, C. C.; SILVA, P. S.; ALVARENGA, R. J.; CAETANO, C. B. Relação peso-comprimento e fator de condição do acará; *Geophagus brasiliensis*, no Reservatório de Lajes, RJ. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, v. 22, n. 2, p. 115-121, 2002.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v. 25, p. 192–205. 1968.

SHEPHARD, K. Functions for fish mucus. **Fish Biol Fisher.** v. 4, p. 401–429. 1994.

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

SILVA, C. A. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná**. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007.

SILVA, M. D.; SILVA DE ASSIS, H. C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; DOMINGOS, F. X. V. Aplicação de biomarcadores em *Astyanax* sp. no biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN). In: **VIII Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2004, Florianópolis. Anais do VIII Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **Methods in Molecular Biology: DNA repair protocols – eukaryotic systems**. Totowa. v. 113, p. 203-212. 1999.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mar Environ Res**. v. 47, p. 389- 398. 2000.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 12, n. 3. 2010.

TEW, K. D.; RONAI, Z. E. GST function in drug and stress response. **Drug Res Up**. v. 2, p.143–147, 1999.

TRUSCOTT, R. J. Macromolecular deterioration as the ultimate constraint on human lifespan. **Ageing. Res. Rev**. 2011.

TSUTIYA, M. T. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgoto. In: 20<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999, Rio de Janeiro. **Anais do 20o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro : ABES, 1999.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**. 13: 57-149. 2003.

VASCONCELLOS, P. C.; ARTAXO, P.; CICCIOLO, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M. Determinação dos Hidrocarbonetos Saturados e Policíclicos Aromáticos Na Atmosfera Amazonica. **Quim Nova**. São Paulo- SP, v. 21, n. 4, p. 385-393. 1998.

VELMA, V.; VUTUKURU, S. S.; TCHOUNWOU, P. B. Ecotoxicology of hexavalentchromium in freshwater fish: a critical review. **Rev. Environ. Health**. v. 24, p. 129–145. 2009.

VERNIER, P. DNA aducts detection in mussels exposed to bulkyaromatic compounds in laboratory and field conditions. **Environ. Res**. v. 96, p. 163–175. 2001.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKAL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. Taylor and Francis. London. 1996.

WANGA, R.; PAIMIN, R. W.; CATTRALL, W.; SHENC, L.; KOLEVB, S. D. The extraction of cadmium(II) and copper(II) from hydrochloric acid solutions using an Aliquat 336/PVC membrane. **J. Membr. Sci**. v. 176, p. 105–111. 2000.

WESTER, P. W e VETHAAK, W. B. Fishs as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology**: v86, p.213-232. 1994.

WONG, C. M.; CHEEMA, A. K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y. J. Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling. **Circ. Res.** v. 102, p. 310-318. 2008.