

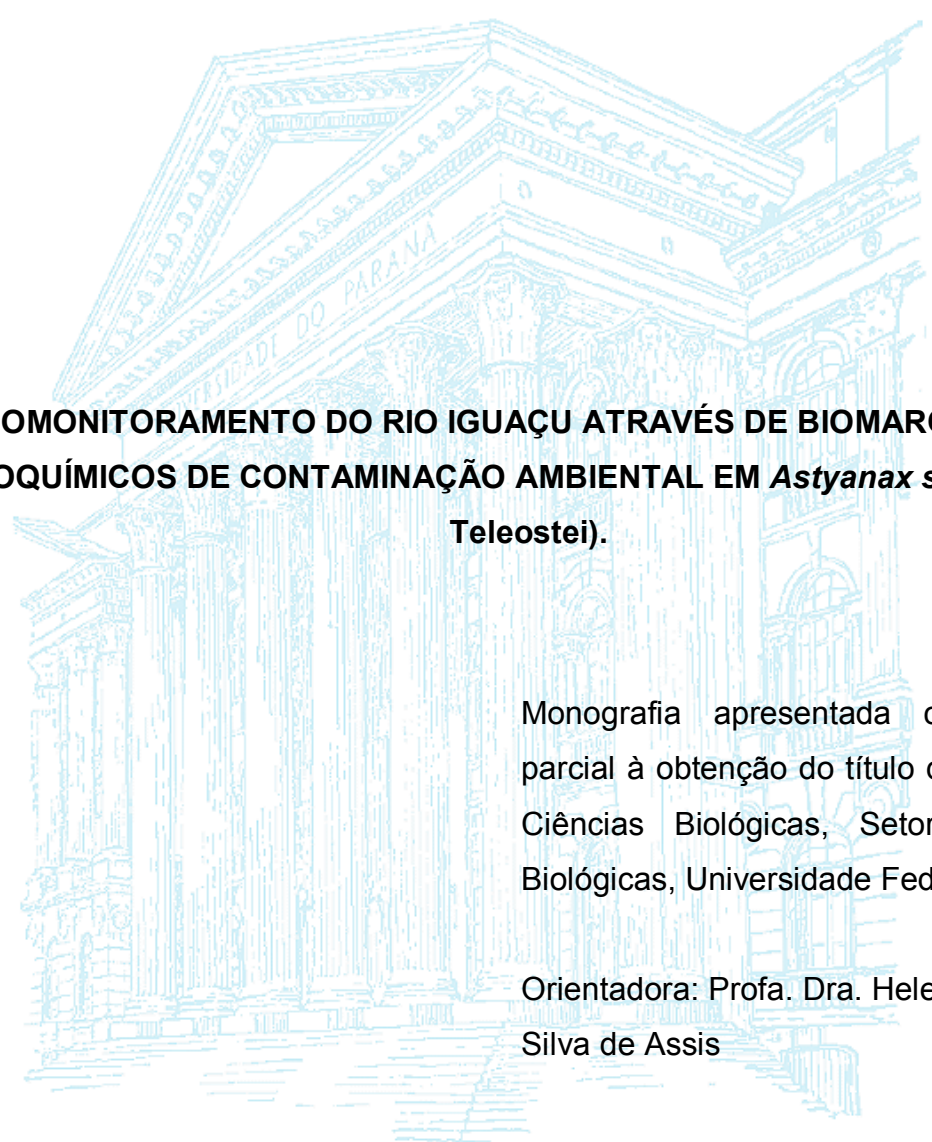
FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO

**BIOMONITORAMENTO DO RIO IGUAÇU ATRAVÉS DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM *Astyanax sp.* (Pisces,
Teleostei).**

CURITIBA

2008

FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO



**BIOMONITORAMENTO DO RIO IGUAÇU ATRAVÉS DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM *Astyanax* sp. (Pisces,
Teleostei).**

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

Orientadora: Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2008

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 mesmo sem haver um relacionamento “excepcional” 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. Um agradecimento especial ao meu primo Tiago que com suas conquistas e conselhos é a grande parte da minha inspiração para seguir nesse caminho.

À Helena, minha orientadora, pela oportunidade, orientação e paciência que tornaram este trabalho possível.

Ao pessoal das coletas Vinícius, Margarete, Laercio, Ju, Lu, Leo, Jean, Viviane e Gi que fizeram as coletas além de produtivas, muito prazerosas e divertidas.

À dona Salete Kotowski e à Marina que gentilmente cederam sua casa para que nós pudéssemos realizar os trabalhos em Irineópolis. Sem elas esta parte do trabalho não seria possível e nós só temos a agradecer pela gentileza com que nos trataram.

A Cris, Manu, Sté, Lu, Marcel, Zaíra, Ju, Eliane, César, Padre, Halina, o pessoal que estive e que está no laboratório lá, além do trabalho, a diversão é garantida.

Às pessoas da minha infância Tia Erna, Ana, Tia Rubia, Kléssio, Kissia, Tio Alcides, Elza pessoas que estiverem sempre presentes nessa época onde nossa maior preocupação era almoçar rápido pra ir jogar bola. Ótima época que eu guardo no coração.

Ao Erik, Iuri, TODD, Renato, Piva, Skuba, William e todo o pessoal da SDK, muito mais que amigos, verdadeiros irmãos a quem devo muito do que sou hoje.

Aos amigos do BJ, Daniel, Esmanha, Ká que desde o ensino médio estão ao meu lado, nas horas alegres e nas nem tão alegres, pessoas que fazem jus ao que um verdadeiro amigo e irmão é.

Aos lixões do Gustavo, Peter e Tigela que foram uns dos responsáveis por fazerem desses anos de universidade um dos melhores anos da minha vida, amigos de sala, companheiros de festas, irmãos de coração.

À Dé, Dessão, Dadi, Dani, Diegão, Gi, Lorão, Poli, Tim e toda a minha turma, afinal não poderia ter caído em uma turma melhor, engraçada, bem humorada, divertida sem muitas brigas nem problemas, onde todos se ajudam e fazem com que esse curso se torne melhor do que já é.

À Amanda, Baggio, Cami, Cidão, Endrio, Fer, Ju, Li, Marcelo, Mel, Puff e tantos outros amigos de outros períodos que nos fazem querer acordar cedo e vir para a universidade, amigos pra valer que merecem estar aqui.

Aos amigos de fora da facul, Danilo, Daniel, Pietro e tantos outros que merecem estar aqui pela grande amizade que nos aproxima.

Ao pessoal da farmaco que com seu futebol, festas e reuniões de primeiríssimo nível fazem este ser o departamento mais divertido de se fazer parte, não poderia estar em melhores mãos.

À Wane, Laércio, Ju, Dani, Lu, Gabi, Gi, Marga, Ciro, Marco, Chico, Carol e a todo o pessoal do Aquatoxi, professores e alunos, que fazem parte desse incrível grupo e tornam o trabalho e pesquisa uma paixão.

À Rô que como uma mãe e com uma paciência de Jó cuida de todos os aspirantes a biólogos dessa Universidade, a ela devemos muito mais do que um simples parágrafo em uma monografia afinal é ela quem nos aconselha e nos ajuda com a grande maioria dos pepinos que ocorrem ao longo do curso.

Ao Tião, Tia Marineide, Vini, Valdir e aos funcionários que trabalham na Universidade e fazem, cada um da sua maneira, este local se tornar uma verdadeira casa para nós.

Com carinho,

Flávio

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A BACIA DO IGUAÇU	3
1.2 PORTO AMAZONAS	6
1.3 IRINEÓPOLIS	7
1.4 CONTAMINANTES AMBIENTAIS	8
1.5 BIOMONITORAMENTO	10
1.6 BIOMARCADORES	11
1.6.1 Biomarcadores Bioquímicos.....	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 ANIMAIS	18
3.2 COLETA DOS PEIXES.....	18
3.2.1 Armadilha	18
3.2.2 Arremessos de tarrafa.....	19
3.2.3 Redes de espera	19
3.2.3 Vara de pesca	19
3.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	19
3.3.1 Extração enzimática	19
3.3.2 Lipoperoxidação	20
3.3.3 Catalase	20
3.3.4 Glutathiona S-transferase	20
3.3.5 Acetilcolinesterase	21

3.3.6 Concentração Protéica.....	21
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4 RESULTADOS.....	23
4.1.5 Lipoperoxidação.....	23
4.1.3 Catalase.....	24
4.1.4 Glutathione S-transferase.....	25
4.1.1 Acetilcolinesterase Cerebral.....	26
4.1.2 Acetilcolinesterase Muscular.....	27
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÕES.....	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

O rio Iguaçu, afluente do rio Paraná, é o maior rio de nosso Estado. Seu curso segue o sentido geral leste oeste e seu ponto de origem localiza-se na região metropolitana de Curitiba, a partir da confluência dos rios Atuba e Iraí. Sua bacia é caracterizada por um elevado grau de endemismo, provavelmente ocasionado pelo isolamento geográfico decorrente da formação das cataratas. Apesar de sua grande extensão e importância, a qualidade de suas águas superficiais apresenta-se afetada principalmente pela falta de coleta e tratamento de esgotos domésticos, por efluentes industriais e pela atividade agrícola 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. O objetivo deste trabalho foi realizar o biomonitoramento de duas localidades do rio Iguaçu (Porto Amazonas e Irineópolis) através da avaliação de biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental em peixes do gênero *Astyanax*. Para isto foram realizadas duas coletas, a primeira em abril/08, referente à época de seca, e a segunda em outubro/08, referente à época de chuva. Foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido amostras de músculo e cérebro para a análise da atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE), e fígado para a análise das atividades enzimáticas da Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) e a Lipoperoxidação (LPO). As análises referentes aos processos de estresse oxidativo indicaram que no ponto de Porto Amazonas (abr/08) pode-se observar um aumento na atividade enzimática da CAT e da GST e uma diminuição da LPO. Já a coleta de Porto Amazonas (out/08) apresentou baixa atividade específica da CAT e da GST bem como baixas medidas da LPO. Em Irineópolis (abr/08) a atividade enzimática da CAT estava aumentada, a GST não apresentou diferenças significativas e a LPO estava em baixas concentrações. Finalmente, para Irineópolis (out/08) houve uma elevada medida da LPO seguido por uma baixa atividade da CAT sem alterações significativas da GST. Referente às análises de neurotoxicidade pôde-se observar que a atividade específica da AChE cerebral e muscular apresentou-se diminuída nos peixes de Porto Amazonas quando comparados aos de Irineópolis para as duas coletas, sugerindo uma possível exposição a compostos organofosforados e carbamatos. As respostas obtidas pelos biomarcadores poderão contribuir para gerar um conjunto de dados que possa vir a auxiliar no monitoramento da qualidade da água do rio Iguaçu.

ABSTRACT

The Iguaçu River, tributary of the Paraná River, is the largest river in our state. Its course follows the general direction east - west and its point of origin is located in the Metropolitan Region of Curitiba, from the confluence of rivers Atuba and Iraí. Its basin is characterized by a high degree of endemism, probably caused by the geographic isolation during the formation of the falls. Despite its large size and importance, the quality of its surface water appears to be mainly affected by the lack of collection and treatment of domestic sewage, industrial effluents and by the agricultural activity along the path of the river. To assess these conditions, the use of biomarkers of environmental contamination proves to be important tools, as they show the effects of contaminants on living organisms. The purpose of this study was to realize the biomonitoring of two districts close to the Iguaçu River (Porto Amazonas and Irineópolis) through the evaluation of biochemical biomarkers of environmental contamination in fish of the genus *Astyanax*. For this two collects have been done, the first in april/08, referring to the season of drought, and the second in october/08, referring to the rainy season. Were collected and frozen in liquid nitrogen for later analysis in laboratory samples of muscle and brain to analyze the activity of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE), and liver for the analysis of enzymatic activities of Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) and the lipidic peroxidation (LPO). The analysis concerning the processes of oxidative stress indicated that the point of Porto Amazonas (apr/08) had an increase in the enzymatic activity of CAT and GST and a reduction of LPO. For the collect of Porto Amazonas (oct/08) has been showed a low specific activity of CAT and GST and low measures of LPO. In Irineópolis (apr/08) enzymatic activities of CAT and GST have been induced and, at the same point, low concentrations of LPO have been obtained. For Irineópolis (out/08) there has been a high measure of LPO followed by low activity of CAT without significant changes of the GST. As to the analysis of neurotoxicity, it has been observed that the specific activity of AChE in brain and muscle has been inhibited in fish from Porto Amazon when compared to Irineópolis for both samples, suggesting a possible exposure to organophosphorus compounds and carbamates. The responses obtained by biomarkers could help to generate a set of data that might assist in the monitoring of the water quality in the Iguaçu River.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Movimento de poluentes em ambientes aquáticos.	2
FIGURA 2 – Localização da bacia hidrográfica do Iguaçu e os pontos de coleta.	3
FIGURA 3 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação	12
FIGURA 8 – LPO em <i>Astyanax sp.</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletaS.....	23
FIGURA 6 – Atividades específicas da CAT em <i>Astyanax sp.</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas	24
FIGURA 7 – Atividades específicas da GST em <i>Astyanax sp.</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas	25
FIGURA 4 – Atividades específicas da AChE Cerebral em <i>Astyanax sp.</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas	26
FIGURA 5 – Atividades específicas da AChE Muscular em <i>Astyanax sp.</i> comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase
ATC – Iodeto de Acetilcolina
BChE – Butirilcolinesterase
BHT – Hidroxitolueno Butilato
BSA - Soro de albumina bovina
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ChE – Colinesterase
COMEC - Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
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 – Bifenils policlorados
OH• - Radical hidroxila
PA – Proporção absoluta
POP – Poluente Organo Persistente

RMC – Região Metropolitana de Curitiba

RO• - Radical alcoxil

ROO• – Radical peroxil

SOD – Superóxido dismutase

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é inegável a relação dualista que a sociedade possui com o recurso água já que é necessário universalizar seu acesso e ao mesmo tempo promover a sustentabilidade dos recursos hídricos. Além disso, não bastando a grande parcela da população brasileira que não tem acesso à água potável, nota-se a exaustão dos recursos hídricos naturais, seja pelo crescente consumo de água ou pela crescente deterioração de sua qualidade (SANTOS e MALINOWSKI, 2005).

Até meados de 1920, não considerando as secas do Nordeste, o Brasil não apresentava problemas e limitações relativas aos seus recursos hídricos, tendo sido este período o principal reperiúncursor da cultura da abundância. Contudo, nas décadas de 70 e 80 a sociedade brasileira começou a despertar para as possíveis consequências que estaria sujeita caso esta mentalidade de uso indiscriminado da água permanecesse. Durante este período, diversas comissões interministeriais foram instituídas a fim de buscar meios de aprimorar o sistema de uso dos recursos hídricos, tentando minimizar o comprometimento de sua qualidade visto que sua vulnerabilidade já se fazia ser vista (RODRIGUEZ, 1998).

Isto se dá ao fato do homem não ser capaz de criar fontes de fora do sistema ecológico que satisfaçam suas necessidades, o que gera uma pressão cada vez maior sobre o ambiente resultando em impactos de principalmente dois tipos: o consumo de recursos naturais em ritmo maior do que os sistemas ecológicos podem renovar e a geração de produtos residuais em quantidades superiores das que podem ser integradas aos ciclos naturais (GRUPO DE TRABALHO. ÍNDICES DE AVALIAÇÃO DE PROJETOS HÍDRICOS (GTZ), 1995).

Dentre as principais formas de impactos que atingem os corpos hídricos pode-se notar a extensa produção de efluentes domésticos e industriais, a agropecuária nas áreas de entorno, o desmatamento das matas ciliares seguido de erosão, a alteração de canais de rios e margens de lagos por meio de diques, a canalização, drenagem e inundação de áreas alagáveis, a dragagem para navegação, dentre diversas outras formas impactantes principalmente relacionadas com o adensamento populacional das regiões (KARR, 1997).

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 sobre 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 (Figura 1).

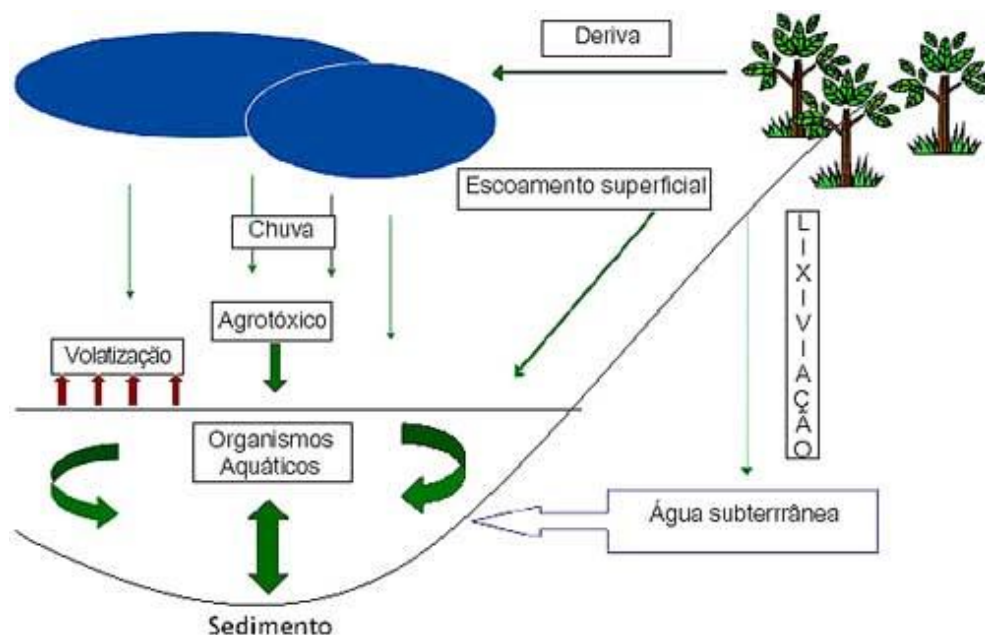


FIGURA 1 – Movimento de poluentes em ambientes aquáticos.

Fonte: TOMITA, 2002. *O Biólogo*, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142

1.1 A BACIA DO IGUAÇU

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).

A bacia do rio Iguaçu (Figura 2) por sua vez, é a maior do estado do Paraná, pertencendo ao seu sistema hidrográfico, do qual é isolada pelas Cataratas do Iguaçu. A bacia situa-se na região sudeste da América do Sul e se estende por cerca de 72.000 km², abrangendo áreas do sul do Brasil e nordeste da Argentina. A maior parte de sua bacia está em território paranaense, com algo em torno de 57.330 km² (MAACK, 1981).

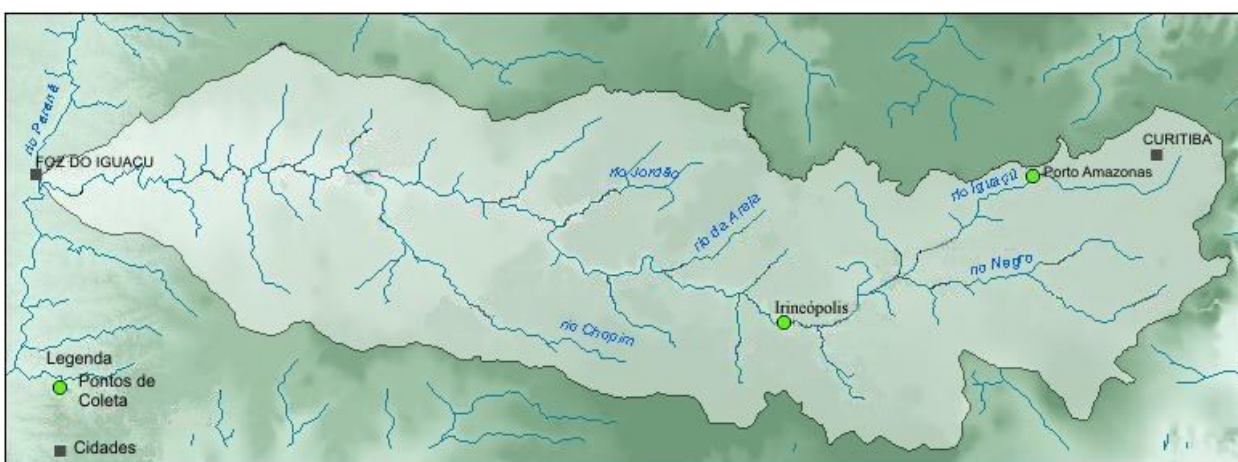


FIGURA 2 – Localização da bacia hidrográfica do Iguaçu e os pontos de coleta.

Fonte: Piancini (2008).

O Rio Iguaçu possui um sentido geral leste - oeste e sua nascente situa-se na Região Metropolitana de Curitiba (RMC) a partir da confluência dos rios Atuba e Irai. Sua extensão total alcança cerca de 1.302 km com um desnível de 830m a partir de suas cabeceiras que estão localizadas na Serra do Mar, e que possuem altitudes superiores a 1.000m. Com o surgimento das Cataratas do Iguaçu, que possuem um desnível de 70 metros, ocorrido a aproximadamente 22 milhões de anos durante o período Oligo-Mioceno, acredita-se que as populações ali viventes foram isoladas das populações do rio Paraná acarretando em um processo de especiação que seria responsável pelo elevado grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna

(KANTEK, 2005). É possível que processos de vicariância (a ictiofauna da atual bacia descende de peixes de uma linhagem atual que foi isolada do resto da bacia do Paraná após a formação das cataratas) ou dispersão (a ictiofauna atual descende de espécies ancestrais de outras bacias que se dispersaram para o rio após a formação das cataratas) tenham tido papel importante na atual diversidade da fauna da bacia (NELSON e PLATINICK, 1981).

Atualmente são conhecidas cerca de 81 espécies de teleósteos na bacia do Iguaçu, sendo esta ictiofauna composta por espécies de pequeno (<20cm), médio (entre 20 e 40cm) e grande porte (>40cm). A participação das diferentes ordens reflete a situação descrita para rios neotropicais, com a maior parte dos peixes pertencentes às ordens Characiformes e Siluriformes (INGÊNITO *et al.*, 2004).

Pode-se dizer ainda que o Iguaçu é sem dúvida alguma o principal rio do Estado do Paraná, sempre servindo como importante agente no progresso do estado. Ao longo da história nota-se que as terras interioranas do estado foram colonizadas com maior intensidade devido à navegação a vapor em seu leito. Ironicamente, tal colonização era movida pelo desmatamento das margens promovendo a erosão do entorno, e conseqüentemente o assoreamento do rio. Devido a grande voracidade dos colonizadores, em aproximadamente 71 anos (1882-1953) o trecho entre Porto Amazonas e União da Vitória deixou de ser navegável. Na década seguinte, toda a região do alto Iguaçu foi retificada a fim de evitar que a capital do estado sofresse com os transbordos naturais, repassando os problemas à jusante. Apesar de tudo, o rio continuava a dar sua contribuição para o desenvolvimento do estado, principalmente devido ao grande potencial hidrelétrico o qual passou a ser mais bem explorado nas décadas posteriores (BARDDAL, 2006).

A região de Curitiba por sua vez, sempre foi abundante no quesito recurso hídrico, característica bastante marcante devido ao regime de chuvas do primeiro planalto paranaense que possui um regime com distribuição espacial bem caracterizada e média de precipitação de 1354mm anuais. Devido a essa abundância, houve um crescimento da cidade em larga escala baseado no abastecimento local, entretanto no final da década de 1950 eram observados déficits no suprimento da água de Curitiba, e em 1958 estudos indicaram que as nascentes do rio Iguaçu seriam o único manancial

economicamente viável capaz de resolver o problema de abastecimento de Curitiba e região, contudo em 1964 já se observava o esgotamento dos mananciais locais e a pressão causada pelo crescimento populacional de Curitiba. Foi então criado o Sistema Iguaçu para captação de água, inaugurado em 1969 e com expectativa de atender à demanda de água até o ano de 2000. Porém o grande crescimento populacional ocorrido na década de 1970 fez com que esse sistema já estivesse com sua capacidade esgotada no início dos anos de 1980, assim com a crescente limitação da disponibilidade hídrica na região metropolitana de Curitiba, o planejamento da expansão do sistema de recursos hídricos integrado passa a ser sobre a bacia do Alto Iguaçu, determinando áreas reservadas para o abastecimento de água e reorientando esses recursos para a sua utilização principalmente por Curitiba (HASSLER, 2006).

Em 1992 um levantamento das ocupações na região realizado pela Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba (COMEC) constatou que aproximadamente 5% da população se encontravam em situação irregular. Em 1997 estes resultados aumentaram para 12% do percentual da população, tendo em torno de um terço dessas ocupações em áreas de proteção de mananciais. Na passagem pela RMC, o rio Iguaçu recebe uma significativa quantidade de substâncias poluidoras de origens domésticas, industriais e de escoamento difuso, sendo a maioria sem tratamento. A carga de poluição da região metropolitana tem grande influência na qualidade da água do rio Iguaçu, que é indicada através das altas concentrações de material orgânico e de nutrientes quando este passa pela RMC (MENDONÇA, 2004).

A bacia do rio Iguaçu caracteriza-se por apresentar uma vazão que tende a aumentar no sentido montante - jusante (AZEVEDO *et al.*, 2006), fator que contribui, através de processos hidrogeológicos, com a descontaminação do rio conforme ele se afasta da sua nascente e da RMC. Portanto embora seja grande a quantidade de dejetos lançados em seu leito, sobretudo na região de Curitiba, conforme se afasta de sua nascente e recebe seus afluentes menos afetados pelas atividades antrópicas, o rio Iguaçu se renova chegando ao seu final em território protegido no Parque Nacional do Iguaçu onde deságua nas Cataratas do Iguaçu (BARDDAL, 2006).

Assim, a fim de obter uma ampla visão sobre as reais condições do rio o presente estudo analisou quatro biomarcadores bioquímicos em lambaris do gênero

Astyanax. Para isto foram realizadas duas coletas em duas cidades logo após a RMC, Porto Amazonas (localizado a 72km de Curitiba) e Irineópolis (localizado a 219km de Curitiba).

1.2 PORTO AMAZONAS

O município de Porto Amazonas localiza-se na região metropolitana de Curitiba, Latitude 25° 32' 41" S e Longitude 49° 53' 25" W a uma altitude de 793 metros. O clima, conforme classificação climática de Köepen é do tipo Cfb – Clima temperado com temperatura média do mês mais frio abaixo de 18° C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22° C e sem estação seca definida (FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, 1984). Porto Amazonas se formou em função do florescente comércio que era proporcionado pela navegabilidade do Rio Iguaçu. Sua população é de aproximadamente 4648 habitantes, sendo 1707 na área rural e 2941 na área urbana. A taxa de crescimento anual da população foi de 3,57% no ano de 2006. A área total do município é de 190.613 km² e fica a 72 quilômetros da capital Curitiba. O setor primário da economia é constituído pelas atividades de agricultura, pecuária e extração de madeira. A agricultura apresenta como principais cultivos: milho, arroz, feijão, soja e fruticultura. A maçã é o principal produto da economia e absorve grande parte da mão-de-obra disponível. Porto Amazonas é hoje conhecida como “Terra da maçã”, um dos maiores produtores do Paraná. Na pecuária os bovinos e suínos formam os principais rebanhos. No setor secundário as atividades desenvolvidas são metalurgia, fábricas de papelão, plásticos e embalagens, além de olarias e curtumes de pequeno porte. Já o setor terciário é composto por um comércio essencial e pouco expressivo: supermercados, confecções, farmácias, papelarias, materiais de construção (PROGRAMA LUZ PARA TODOS, 2007).

O ponto de coleta de Porto Amazonas compreende a região do rio conhecida por “Alto Iguaçu”. Esta denominação não se refere a uma definição formal dos limites do rio, no entanto é conhecida como a região que compreende o trecho desde suas nascentes

até a divisa entre o primeiro e o segundo planalto paranaense, local onde o rio Iguaçu corta a escarpa devoniana em um longo trecho de corredeiras (MAACK, 1981).

1.3 IRINEÓPOLIS

O município de Irineópolis está localizado no Planalto Norte catarinense, latitude 26° 14' 01" e longitude 50° 47' 59" a uma altitude de 762 metros acima do nível do mar e a 219km de Curitiba. O clima predominante é o mesotérmico úmido, com verões amenos (Cfb de Köppen). A temperatura média anual gira em torno de 17 a 18 °C e a precipitação média anual em torno de 1500 a 1700 mm, sendo que a umidade relativa média gira em torno de 80 a 82% (PANDOLFO, 2002). O município possui uma área aproximada de 581,27km² e sua população estimada em 2004 era de 9720 habitantes. O município tem sua economia baseada na agricultura, representando cerca de 85% desta. As poucas indústrias existentes são de cerâmica. A maior produção agrícola é de milho, mas cultiva-se também soja, feijão, fumo e trigo (SCHAFASCHEK, 2005).

O ponto de coleta da cidade de Irineópolis compreende a região do rio conhecida por "Médio Iguaçu", que também não possui definição formal. Aceita-se que ela compreende o trecho desde suas corredeiras em Engenheiro Bley até onde se localizava o Salto Grande, em Porto Vitória (PR). Tal região está compreendida no segundo planalto paranaense e limitada por duas escarpas, a Devoniana iniciada em uma queda conhecida como Salto Caiacanga, e a Mesozóica limitada pelo Salto Grande (MAACK, 1981).

Este ponto localiza-se em um local de captação de água para a cidade de Porto União e região e, portanto, é de se esperar um local onde a qualidade da água seja relativamente melhor. Os efluentes domésticos e industriais não são tão evidentes, no entanto a área é circundada por fazendas onde existem diversas culturas o que pode contribuir para um expressivo influxo de agrotóxicos no rio.

1.4 CONTAMINANTES AMBIENTAIS

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 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 do meio ambiente, 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 lançadas 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).

Dentre as fontes impactantes dos corpos hídricos podemos citar os efluentes domésticos, os efluentes industriais, a agropecuária e também acidentes pontuais, todos contribuindo para o influxo de poluentes. Oliveira Ribeiro (2006) classifica esses poluentes em três classes distintas: os poluentes organopersistentes (POPs); os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); e os metais pesados.

Poluentes organopersistentes (POPs) são compostos persistentes no meio ambiente sendo acumulados nos solos, sedimentos, ar, água ou biota e que possuem longas meias-vidas que chegam de anos a décadas. Os POPs são tipicamente lipofílicos e em sistemas aquáticos e solos eles se acumulam junto à matéria orgânica. Em relação aos organismos, os POPs interagem com os lipídios de modo a evitar o meio aquoso das células, permanecendo principalmente no tecido adiposo (JONES e VOOGT, 1999). Desta forma podem se acumular tanto nos organismos vivos (bioacumulação) quanto ao longo da cadeia alimentar (biomagnificação) (SANDANGER *et al.*, 2006). Ainda, devido a características físico-químicas como a volatilização em temperaturas ambientes e à baixa taxa de biodegradação, os POPs possuem a

capacidade de percorrer grandes distâncias e assim atingir locais afastados de onde foram originalmente emitidos, chegando aos corpos hídricos por aporte direto ou indireto (GOERKE *et al.*, 2003; WEBER e GOERKE, 2003). Apresentam efeitos tóxicos mesmo em pequenas quantidades e, portanto, apesar de concentração elevadas desses compostos serem pouco freqüentes no meio natural, suas retenções nos sedimentos podem causar uma contaminação em longo prazo podendo trazer conseqüências diretas e indiretas aos organismos encontrados nestes ecossistemas (KIM *et al.*, 2007; HOLMQVIST *et al.*, 2007). Dentre os POPs podem-se citar os bifenis policlorados (PCBs), os pesticidas organoclorados, os hexaclorobenzenos (HCB), o diclorodifeniltricloroetano (DDT), dentre outros compostos conhecidos por causar danos a organismos aquáticos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por sua vez, são 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. Havia, até o começo do século XX, 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)

Por fim, os metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico maior que 5 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 “metais pesados” é utilizado para elementos químicos que contaminam o meio ambiente, provocando diferentes danos à biota, podendo 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). Esses elementos são encontrados naturalmente no solo em concentrações inferiores àquelas consideradas como tóxicas para diferentes organismos vivos. Em pequenas quantidades alguns destes elementos são essenciais para a manutenção da vida, no entanto podem ser tóxicos quando apresentados em concentrações elevadas (BURGERA e GOCHFELDB, 2005, SALAMI *et al.*, 2008). Estes compostos atingem os ambientes aquáticos principalmente através de efluentes industriais e domésticos, gerando desequilíbrios nos ecossistemas uma vez que se acumulam nos organismos e incorporam-se as cadeias tróficas dos sistemas (KHANSARIA *et al.*, 2005; WANGA *et al.*, 2005).

1.5 BIOMONITORAMENTO

Buscando compreender os ecossistemas e de modo a dar suporte às políticas ambientais, o monitoramento ambiental é uma importante ferramenta, uma vez que gera dados e informações básicas sobre a presença de contaminantes no meio. Em estudos de monitoramento é importante associar fatores abióticos com bióticos, pois assim os estudos de avaliação de impacto fornecem dados mais precisos sobre o ambiente monitorado (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

De modo que ambos os fatores sejam correlacionados, se faz necessário a utilização de organismos vivos, ou bioindicadores, já que são eles os principais afetados por desequilíbrios nos ambientes.

Bioindicadores podem ser organismos, populações ou comunidades, cujas funções vitais se correlacionam tão estreitamente com determinados fatores ambientais que podem ser empregados como indicadores na avaliação de dada área.

Portanto, de modo a identificar possíveis problemas sobre o ambiente monitorado é importante que os bioindicadores possuam certas características uma vez que serão eles os responsáveis a nos mostrar as condições locais.

Segundo Zamoner (2007) é necessário que o organismo utilizado apresente limites de tolerância estreitos (seja sensível a pequenas mudanças ambientais), tenha boa abundância no local e pouca mobilidade, seja de fácil identificação e possua sua ecologia bem conhecida.

Assim, quando utilizamos organismos vivos em estudos de monitoramento ambiental podemos denominá-los biomonitoramento.

1.6 BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas moleculares, celulares ou sistêmicas 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; ROSSI, 2008), refletindo o status saudável de organismos nos níveis mais baixos de organização e apresentando rápida resposta ao estresse e alta importância ecotoxicológica. Por este motivo podem ser usados como indicadores precoces de alterações ambientais, antes da ocorrência de danos irreversíveis nos ecossistemas (SILVA DE ASSIS, 1998).

É importante que um biomarcador seja capaz de relacionar uma mudança ambiental antes que haja uma consequência adversa significativa sobre o organismo de modo que prejudique o funcionamento do ecossistema, portanto é ideal que um biomarcador seja específico para um composto ou classe de compostos e que possa ser utilizado em diferentes espécies. Os biomarcadores podem ser divididos em (VAN DER OOST *et al.*, 2003):

- a) Biomarcadores de exposição: referentes a quaisquer alterações biológicas que detectam e quantificam a substância exógena, seus metabólitos e os produtos da interação do xenobiótico com o organismo;

- b) Biomarcadores de efeito: são aqueles que mostram o efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente;
- c) Biomarcadores de suscetibilidade: aqueles que indicam uma habilidade adquirida ou inerente do organismo em responder à exposição a determinado xenobiótico de modo que altere a suscetibilidade do organismo a uma dada exposição.

Desta maneira, os biomarcadores utilizados neste estudo foram biomarcadores bioquímicos de exposição e efeito, sendo eles a atividade específica das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e a lipoperoxidação (LPO).

1.6.1 Biomarcadores Bioquímicos

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) representado na Figura 3. 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 alcóxil ($RO\cdot$) e peróxil ($ROO\cdot$) (OLIVEIRA, 1999).

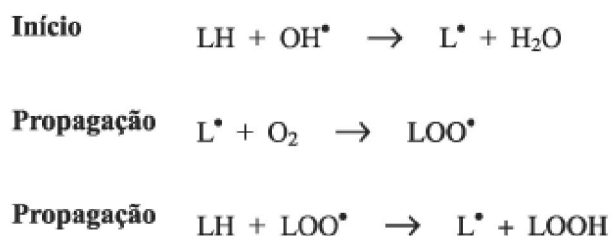


FIGURA 3 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; $OH\cdot$: radical livre; $L\cdot$: radical lipídico, $LOO\cdot$: Radical peróxila e $LOOH$: hidroperóxido lipídico).
 FONTE: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICCOLO, 2007.

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).

Catalase

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, a CAT desempenha um papel fundamental nos organismos que vivem em condições aeróbicas, sendo a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , que não consome equivalentes redutores celulares e que possui um mecanismo muito eficiente em remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (MALLICK e RAI, 1999; SILVA, 2007).

A atividade da catalase está associada com os peroxissomos ou pequenos corpos que estão associados ao metabolismo de ácidos graxos. O H_2O_2 produzido durante a oxidação do ácido graxo peroxissomal é degradado pela CAT a fim de evitar a formação de $\text{OH}\cdot$ que pode vir a causar danos às membranas (HUGGETT *et al.*, 1992).

O peróxido de hidrogênio é um exemplo de espécies reativas de oxigênio que, da mesma forma que os radicais livres, são formados durante o metabolismo oxidativo de xenobiontes. Uma molécula que possua um elétron ímpar na sua órbita externa responsável por favorecer a recepção de outras moléculas, inclusive orgânicas é considerada um radical livre (WANG *et al.*, 2008). Estas moléculas possuem vida média de milésimos de segundos, no entanto quando reagem com biomoléculas podem se tornar estáveis por um período de tempo maior. Espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são tão reativas quanto os radicais livres, contudo diferem por não apresentarem elétrons desemparelhados na órbita externa, não sendo classificados como radicais livres e, portanto, recebendo esta nomenclatura mais ampla (LESSER, 2006). Em organismos vivos, estas espécies reativas são

produzidas normalmente pelas células durante processos metabólicos, entretanto sob condições normais o organismo possui enzimas protetoras, ou antioxidantes, que reparam 99% dos danos causados pela oxidação (ROSSI, 2008).

Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e remoção pelos sistemas de defesa antioxidantes, denominamos que o organismo está submetido a um estresse oxidativo. Esta condição celular ou fisiológica se caracteriza por uma elevada concentração dessas espécies reativas que são responsáveis por causar danos às estruturas celulares, podendo levar a inativação enzimática, peroxidação lipídica (LPO), danos de DNA e mesmo morte celular. Muitos contaminantes ambientais e/ou seus metabólitos são relatados por induzirem o estresse oxidativo, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2002; ROSSI, 2008).

Os sistemas de defesa antioxidantes incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), e antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular como a GSH, β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol, dentre outras enzimas e substâncias (VAN DER OOST *et al.*, 2002).

Glutathione S-transferase

Nos organismos, 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 (RANG *et al.*, 2004).

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 pertencente à fase II do metabolismo (MARIONNET *et al.*, 2006).

A GST é responsável pela conjugação da glutathione em uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofilicos 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 e atuando com peroxidases na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool no processo de estresse oxidativo (DIXON e LAPHORN, 2002).

A família das enzimas GST caracteriza-se por sua ampla especificidade a substratos com pouca afinidade. É por esta baixa eficiência catalítica, 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).

Acetilcolinesterase

O termo colinesterase (ChE) refere-se a 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 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-TABACHE *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 (ADAMS, 1992; KLEMZ, 2002). Com a inibição da atividade da AChE pode-se ocorrer um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, paralisando algumas funções vitais do organismo afetado (STENESH, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o biomonitoramento de duas localidades do Rio Iguaçu através de biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental em *Astyanax sp.*

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a possibilidade do uso de peixes do gênero *Astyanax* como bioindicadores de contaminação ambiental.
- Avaliar os níveis de estresse oxidativo em *Astyanax sp.* em dois pontos do rio Iguaçu através das análises da lipoperoxidação (LPO) e das atividades específicas das enzimas glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT).
- Avaliar a neurotoxicidade em *Astyanax sp.* em dois pontos distintos do rio Iguaçu através da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular.
- Gerar dados que possam auxiliar nas tomadas de decisões no sentido de proteger a qualidade da água para os organismos aquáticos e para a utilização humana e animal.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os animais coletados foram peixes do gênero *Astyanax*, pertencentes à família Characidae e subfamília Tetragonopterinae (NOMURA, 1975). Eles são peixes estritamente de água doce, de pequeno porte e com coloração bastante variável (SILVA, 2008). Forrageiam em todos os níveis tróficos e exibem ampla habilidade em mudar de presa como resposta a mudanças ambientais (LOBÓN-CERVIÁ e BENNEMANN, 2000). O gênero se distribui pelas bacias Amazônicas, Araguaia-Tocantis, São Francisco, Prata e Atlântico Sul.

3.2 COLETA DOS PEIXES

Duas coletas (abril/08 e outubro/08) ao longo de 12 meses de projeto foram realizadas em dois pontos ao longo do Rio Iguaçu, obtendo-se os exemplares de *Astyanax sp.* Os pontos de coleta localizam-se em Porto Amazonas, e Irineópolis. Obteve-se 30 peixes na primeira coleta sendo 14 em Porto Amazonas e 16 em Irineópolis, na segunda coleta obteve-se um total de 31 peixes sendo 20 em Porto Amazonas e 11 em Irineópolis. As amostragens foram realizadas pelos seguintes métodos:

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 algumas horas, com revisões periódicas.

3.2.2 Arremessos de tarrafa

Foram realizados vários arremessos em cada base e por fase de campo.

3.2.3 Redes de espera

Foram montadas baterias de redes de espera simples de 20 m de comprimento, e variadas malhas, permanecendo por algumas horas no local e com revisões periódicas.

3.2.3 Vara de pesca

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

3.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Os animais foram coletados e anestesiados com benzocaína no local e amostras de músculo, cérebro e fígado foram retiradas e mantidas em nitrogênio líquido.

3.3.1 Extração enzimática

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, com auxílio do homogeneizador automático Potter-Elvehjem e em seguida centrifugadas a 10000 x g por 20 minutos 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 CAT, GST e LPO.

3.3.2 Lipoperoxidação

O sobrenadante das amostras de fígado foi ressuscitado em metanol PA na proporção 1:10 (volume/volume), centrifugado por 30 minutos a 9000 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 30µl da amostra seguido de 270µl da solução reação composta de xilenol orange, ácido sulfúrico, hidroxitolueno butilado (BHT) e sulfato ferroso amoniacal, e metanol 90%. Após 30 minutos de incubação na própria microplaca, as amostras foram lidas a 560 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos $\text{mmol por minuto}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.3 Catalase

O sobrenadante das amostras de fígado foram diluídas (1:5 ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Após a diluição, 990µl de solução reação 20mM (Tampão Tris 1M / EDTA 5mM pH8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água MilliQ em concentração específicas e mantidas em banho-maria 25°C) foi pipetado em cubeta de quartzo seguido por 10µl de amostra, 4 réplicas foram realizadas. O princípio do método é o consumo de peróxido de hidrogênio exógeno através da atividade da Catalase que gera oxigênio e água e é mensurado por espectrofotometria (AEBI, 1984). A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro Shimadzu UV - Visible 1650PC a 240 nm e a 25°C, por 40 segundos. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol por minuto}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.4 Glutathione S-transferase

O sobrenadante das amostras de fígado foram diluídas na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1M pH 6,5. 100µl 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 glutathione reduzida (GSH) 2 mM em tampão

fosfato 0,1M pH 6,5. O método baseia-se no trabalho de Keen *et al.* (1976). As GSTs catalisam a reação de conjugação do CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorvância através da leitura em espectrofotômetro (Sunrise-TECAN utilizado para nossas análises). O aumento linear da absorvância a 340nm foi monitorado e a atividade expressa em nmoles de conjugado GSH-CDNB produzido por minuto⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.5 Acetilcolinesterase

O sobrenadante das amostras de cérebro e músculo foram diluídas (1:10 ou 10% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5. Após a diluição cada amostra foi pipetada em 4 réplicas de 50µl na microplaca, seguido de 200µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitrobenzoato) e 50µl de ATC (iodeto de acetiltiocolina). 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 de microplaca Sunrise-TECAN em comprimento de onda de 415nm, seguindo o método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Os resultados foram expressos em nmol por minuto⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.6 Concentração Protéica

A concentração de proteína foi medida de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados através de teste t com nível de significância de 0,05 comparando-se os dois pontos diferentes de coleta (caracteres latinos) e entre os

mesmo pontos de coleta (caracteres gregos) através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

De acordo com as metodologias anteriormente descritas foram medidas as atividades enzimáticas da AChE Cerebral e Muscular, GST, CAT e a LPO para as duas coletas realizadas (abril/2008 e outubro/2008) nos dois pontos do rio (Porto Amazonas e Irineópolis)

4.1.5 Lipoperoxidação

A análise da LPO apresentou-se aumentada nos peixes de Irineópolis em relação aos de Porto Amazonas para a segunda coleta (Figura 11). A comparação entre os mesmos pontos para as diferentes coletas nos mostrou também que os peixes de Irineópolis da coleta de outubro estão com a quantificação da LPO aumentada em relação aos peixes de Irineópolis de abril (Figura 12).

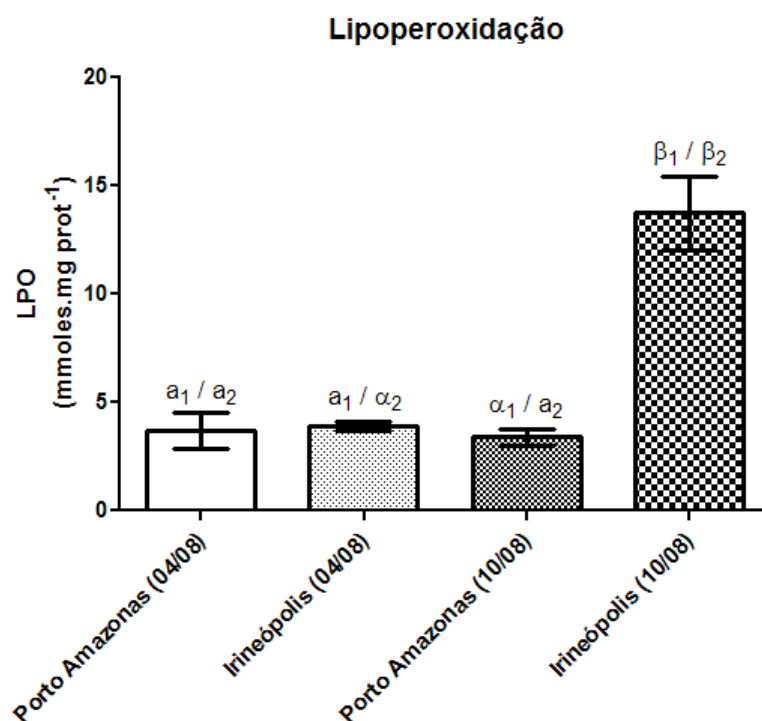


FIGURA 4 – LPO em *Astyanax sp.* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média \pm erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a primeira coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos pontos para a segunda coleta; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando teste t).

4.1.3 Catalase

Em relação à medida da atividade específica da CAT não foi possível observar diferenças significativas entre os pontos para as duas coletas (Figura 7). No entanto, quando comparadas as coletas entre os mesmos pontos podemos ver que em ambas as localidades para a coleta de outubro esta enzima aparece com menor atividade (Figura 8).

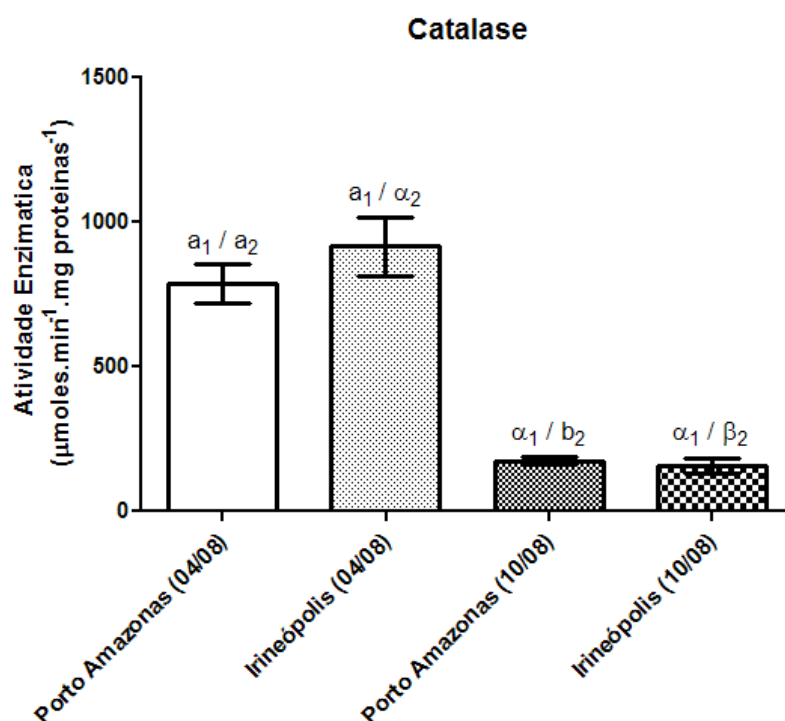


FIGURA 5 – Atividades específicas da CAT em *Astyanax sp.* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média \pm erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a primeira coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos pontos para a segunda coleta; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando teste t).

4.1.4 Glutathione S-transferase

A atividade específica da GST não mostrou diferenças significativas para as atividades específicas quando comparados os pontos para as duas coletas. (Figura 9). Contudo, comparando-se os mesmos pontos para as diferentes coletas foi possível observar que a atividade desta enzima aparece diminuída nos peixes de Porto Amazonas da segunda coleta em relação aos da primeira (Figura 10).

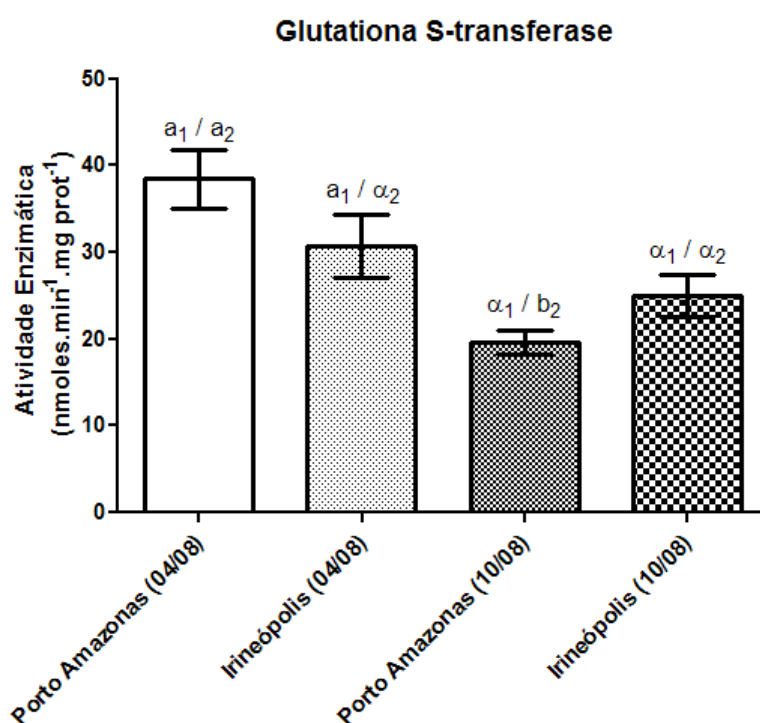


FIGURA 6 – Atividades específicas da GST em *Astyanax sp.* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média \pm erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a primeira coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos pontos para a segunda coleta; letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando teste t).

4.1.1 Acetilcolinesterase Cerebral

As análises da atividade enzimática da AChE Cerebral indicaram que a atividade apresentou-se diminuída nos peixes de Porto Amazonas em relação os de Irineópolis nas duas coletas (Figura 3). Ainda quando comparamos as coletas entre os mesmos pontos, a atividade desta enzima apresenta-se diminuída tanto nos peixes de Porto Amazonas e de Irineópolis da primeira coleta em relação aos da segunda coleta (Figura 4).

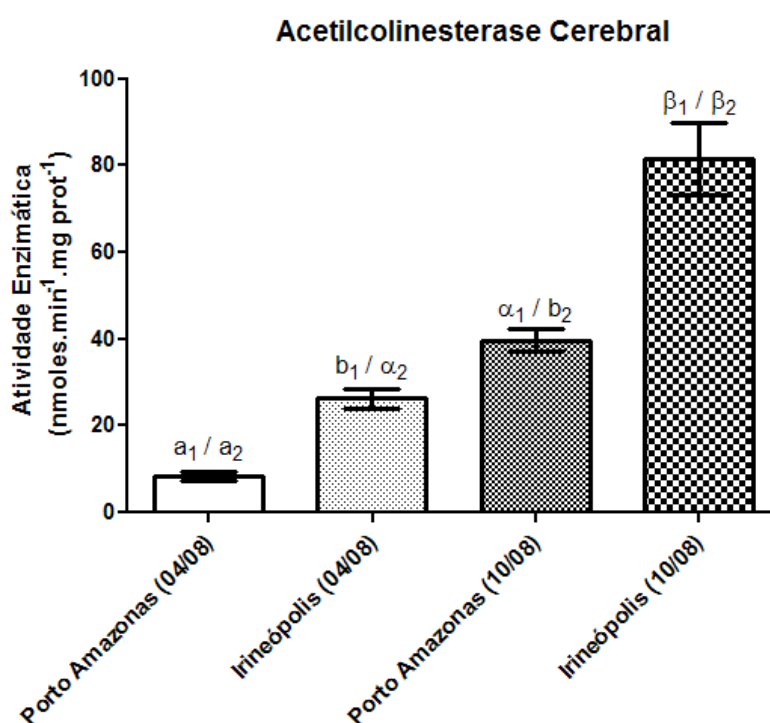


FIGURA 7 – Atividades específicas da AChE Cerebral em *Astyanax sp.* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média + erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a primeira coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos pontos para a segunda coleta; letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. ($p < 0,05$, utilizando teste t).

4.1.2 Acetilcolinesterase Muscular

Quanto as análises da atividade enzimática da AChE Muscular, podemos observar que esta apresenta-se com menor atividade nos peixes de Porto Amazonas em relação os de Irineópolis tanto na primeira quanto na segunda coleta (Figura 5). Ainda quando comparamos as coletas entre os mesmos pontos, esta enzima apresenta-se com menor atividade nos peixes de Porto Amazonas e Irineópolis da primeira coleta em relação aos da segunda coleta (Figura 6).

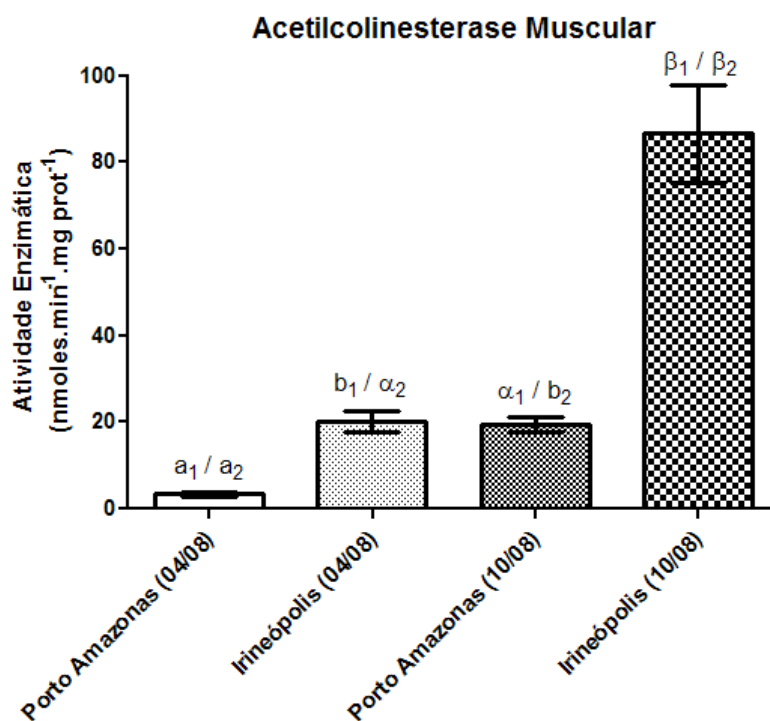


FIGURA 8 – Atividades específicas da AChE Muscular em *Astyanax sp.* comparando-se os dois locais de coleta para as mesmas coletas e os mesmos locais de coleta para as duas coletas. Os resultados expressam média \pm erro padrão. OBS: caracteres latinos referem-se à comparação dos pontos para a primeira coleta e caracteres gregos são referentes à comparação dos pontos para a segunda coleta; letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. ($p < 0,05$, utilizando teste t).

5 DISCUSSÃO

As questões ligadas ao meio ambiente no Brasil 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 agrícola (MENDES, 1994).

Observa-se um crescente número de estudos ao longo dos últimos 20 anos com relação aos danos causados por efluentes nos ecossistemas aquáticos (WESTER e VETHAAK, 1994), inclusive devido à intensificação das ações antrópicas consideradas impactantes. Para compreender estas ações, estudos de biomonitoramento capazes de fornecer novas abordagens e informações sobre a situação atual de nossas águas têm sido desenvolvidos (SILVA *et al.*, 2004).

Dentre estas abordagens estão o uso dos biomarcadores (bioquímicos, genéticos, fisiológicos e morfológicos) que vêm sendo empregados com maior frequência, utilizando-se peixes como bioindicadores (SILVA *et al.*, 2004) e visando encontrar biomarcadores e bioindicadores sensíveis e específicos para as mais diversas classes de contaminantes. Isto decorre do fato de que em áreas contaminadas, a exposição de organismos a xenobiontes resulta em interações entre essas substâncias e os sistemas biológicos que podem acarretar em distúrbios ou respostas adaptativas dos organismos (MASFARAUD, 1992).

No entanto, quando falamos do Rio Iguaçu, apesar da grande quantidade de trabalhos que mostram a qualidade das águas através de análises físico-químicas e bacteriológicas (SANTOS e MALINOWSKI, 2005; HASSLER, 2006; MENDONÇA, 2004, IAP 2005), ainda é pequeno o número que as correlaciona com biomarcadores de toxicidade a fim de obter uma ampla visão sobre suas reais condições. Para isto, o presente estudo analisou quatro biomarcadores bioquímicos em lambaris do gênero *Astyanax* em dois pontos de coleta ao longo do Rio Iguaçu.

Na passagem pela RMC, o rio Iguaçu recebe uma significativa quantidade de substâncias poluidoras de origens domésticas, industriais e de escoamento difuso, sendo a maioria sem tratamento. A carga de poluição da região metropolitana tem grande influência na qualidade da água do rio Iguaçu, que é indicada através das altas concentrações de material orgânico e de nutrientes, quando este passa pela RMC (MENDONÇA, 2004).

O rio Iguaçu caracteriza-se por apresentar uma vazão que tende a aumentar no sentido montante - jusante (AZEVEDO *et al.*, 2006). A relação entre a vazão da fonte contaminante e do rio define qual a porcentagem de tratamento necessária para que o efluente se adeque a exigências de qualidade no trecho de jusante do ponto de aporte da fonte impactante. 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).

Portanto, seria de se esperar que o rio apresentasse certo nível de descontaminação conforme se afastasse da RMC. Contudo, devido a aportes pontuais de efluentes domésticos, industriais e da agricultura das várias cidades e fazendas ao longo do trajeto do rio, é possível que tal gradiente não seja observado, mesmo em locais mais afastados da RMC.

Desta forma, no município de Porto Amazonas, provavelmente devido a sua proximidade com a RMC, o rio apresenta-se com uma coloração escura e um forte odor, decorrente do aporte de esgoto dos efluentes domésticos e industriais da cidade de Porto Amazonas e da RMC. Ainda com a atividade agrícola da cidade, é de se esperar algum influxo de agrotóxicos no rio através do escoamento superficial e da lixiviação. É importante ressaltar que, para este ponto, durante a primeira coleta (abril/08) o nível do rio estava mais baixo (aproximadamente 3 metros) quando comparado à segunda coleta (outubro/08).

Já no ponto de coleta de Irineópolis o Iguaçu se apresenta menos turvo e sem o forte odor. O ponto localiza-se em um local de captação de água para a cidade de Porto União e região e, portanto, seria de se esperar um local onde a qualidade da água seja relativamente melhor. No entanto a área é circundada por fazendas onde existem

culturas de milho, soja, feijão, dentre outras que utilizam diversos tipos de agrotóxicos. Neste ponto, para a primeira coleta o rio apresentava-se com um nível mais baixo (aproximadamente 5 metros) em relação à segunda coleta.

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 espécies reativas de oxigênio dependendo do tipo e da concentração dos compostos metabolizados (KARUZINA e ARCHAKOV, 1994). Estas espécies reativas podem reagir com ácidos nucleicos, 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 ativados, apresentando padrões enzimáticos que podem ser utilizados como biomarcadores de exposição a poluentes (SILVA *et al.*, 2004).

As repercussões dos danos causados por essas espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorrem quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes, sendo estabelecido assim o estresse oxidativo. Este pode ser mensurado através da interferência sobre a função dos órgãos dos animais, assim como pela determinação indireta de seus efeitos sobre as membranas celulares avaliados através da lipoperoxidação (LPO).

Foi possível observar que a LPO estava aumentada no ponto de Irineópolis para a coleta de out/08 em relação a todas as outras análises deste biomarcador. Desta forma vemos que os peixes neste local podem já ter sofrido os possíveis efeitos de um processo de estresse oxidativo. Estas suposições podem ser mais fortemente aceitas quando observamos as análises dos outros biomarcadores referentes ao metabolismo (direto ou indireto) de EROS, como a atividade da CAT e da GST.

Neste mesmo ponto pudemos observar que a atividade da CAT apresenta-se diminuída em relação à primeira coleta (abr/08). Em diversos estudos foi encontrada diminuição da atividade desta enzima devido a ação de metais pesados (Cd, Cu, Cr e Zn) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (β -naftoflavona) seguido por um aumento da LPO e da atividade específica da GST (AHMAD *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2000; TEISSEIRE e VERNET, 2000). Dados semelhantes também foram encontrados

para peixes expostos a misturas de pesticidas (ROSSI, 2008; LUSHCHAK *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2006). No entanto, a indução da atividade da GST não foi observada para este ponto.

Ainda no que se refere ao estresse oxidativo, aumento da atividade específica da CAT tem sido relatado como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003; STURVE *et al.*, 2006). O estresse oxidativo resulta da tentativa da célula eliminar radicais livres formados na metabolização de diversos compostos químicos através de enzimas específicas como a catalase (GIULIO *et al.*, 1989). A indução da CAT pode sugerir uma defesa do organismo frente a agentes oxidantes, pois é uma enzima chave para remover o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e evitar a formação de radicais hidroxila (OH^\cdot) que podem causar danos celulares (REGOLI *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

Seguindo esta linha de raciocínio, quando observarmos as coletas de abr/08, é possível perceber a indução da atividade da CAT e da GST em Porto Amazonas neste período em relação à coleta de out/08. Houve também uma maior atividade da CAT em Irineópolis em abr/08 em relação à out/08 (neste ponto a GST não apresenta atividade significativamente diferente quando comparada à coleta de out/08 para o mesmo ponto, no entanto pode-se considerar relevante a medida da sua atividade visto que esta também não difere em relação ao ponto de Porto Amazonas de abr/04).

Estes resultados podem sugerir que os peixes de ambos os pontos estão submetidos a algum nível de estresse oxidativo. Contudo suas defesas antioxidantes estão suficientemente contendo estes níveis de impacto, visto que a LPO encontra-se em níveis relativamente baixos. Resultados semelhantes foram encontrados em outros peixes para tais padrões enzimáticos, referindo-se a um possível estresse oxidativo (PANDEY *et al.*, 2003; AHMAD *et al.*, 2006, MONTEIRO *et al.*, 2007).

Para a coleta de Porto Amazonas de out/08 foi possível notar que a medida da LPO encontrou-se baixa, bem como a atividade da CAT e da GST, quando comparadas à coleta de Porto Amazonas de abr/08. Isto pode indicar que os peixes estão submetidos a certo nível de estresse oxidativo, no entanto as repercussões dos danos provenientes desse estresse ainda não se fizeram ser notadas, uma vez que os níveis de LPO apresentam-se baixos e devido ao aumento das atividades da CAT e GST.

A análise da enzima acetilcolinesterase tem sido utilizada como biomarcador de efeito e exposição a compostos persistentes no meio ambiente, especialmente organofosforados e carbamatos (STURM *et al.*, 2000).

Ao ser observada uma diminuição na atividade da AChE cerebral e muscular dos peixes de Porto Amazonas em ambas as coletas quando comparados aos peixes de Irineópolis, podemos supor uma possível contaminação do local por compostos organofosforados e/ou carbamatos, oriundos das diversas culturas do entorno, principalmente da maçã, a qual o município destaca-se como grande produtor.

A atividade da acetilcolinesterase é conhecida por ser inibida por pesticidas organofosforados e carbamatos (STURM *et al.*, 2000). Outros estudos ainda comprovam que esta enzima pode ser inibida por poluentes como metais pesados, hidrocarbonetos e organoclorados, no entanto, sendo necessárias concentrações altas de tais poluentes (ZINKL *et al.*, 1991; PAYNE *et al.*, 1996).

Ainda a respeito da AChE cerebral e muscular notamos que a atividade dessa enzima apresenta um aumento nesses mesmos peixes de Porto Amazonas para a segunda coleta (out/08) em relação aos da primeira coleta (abr/08). Este padrão de aumento da atividade das enzimas poderia estar relacionado com o período de chuvas, intenso nos meses de setembro, outubro e novembro, e relacionado com a elevação do nível do Iguaçu. 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.

Tais especulações podem ser feitas frente a esta leve elevação da atividade da AChE cerebral e muscular que, no entanto continua a apresentar-se com uma baixa atividade quando comparada aos pontos de coleta de Irineópolis (que da mesma forma apresentam estes padrões de aumento frente as épocas de chuvas). Contudo, afirmativas concretas sobre essas causas são difíceis de serem feitas uma vez que diversos fatores influenciam na dinâmica dos poluentes nos corpos hídricos.

Portanto, observa-se que em ambos os municípios a água do rio Iguaçu apresenta-se impactada, de tal forma que com o uso dos biomarcadores de contaminação ambiental foi possível adicionar mais um dado às análises de qualidade já existentes (SANTOS e MALINOWSKI, 2005; HASSLER, 2006; MENDONÇA, 2004,

IAP 2005), gerando dados que contribuam no monitoramento do rio pelos órgãos ambientais responsáveis.

6 CONCLUSÕES

- Apesar das dificuldades de identificação no campo, os peixes do gênero *Astyanax* demonstraram-se organismos capazes de indicar os efeitos de contaminação ambiental, podendo ser considerados bons bioindicadores.
- As análises referentes aos processos de estresse oxidativo apresentaram-se bastante diversificadas em cada coleta, no entanto pode-se considerar que em todos os pontos os peixes estão submetidos a algum nível de estresse oxidativo.
- As análises referentes à atividade da AChE cerebral e muscular nos indicaram que esta apresenta-se baixa nos peixes de Porto Amazonas em relação aos de Irineópolis para ambas as coletas, confirmando uma possível neurotoxicidade nesses peixes. Ainda esta neurotoxicidade pode estar relacionada com a presença de compostos organofosforados e/ou carbamatos na água, conhecidos por inibirem esta enzima.
- Com o uso dos biomarcadores de contaminação ambiental foi possível adicionar mais um dado às análises de qualidade já existentes, gerando dados que contribuam no monitoramento do rio pelos órgãos ambientais responsáveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol.** 105: 121–126. 1984.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim Biophys Acta.** v. 1523, i. 1, p. 37-48. 2000.

AHMAD, I.; MARIA, V. L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. **Mutat Res Gen Tox. En..** v. 608, i. 1, p. 16-28. 2006.

AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTO, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β -naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere.** v. 61, i. 2, p. 267-275. 2005.

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. **B Environ Contam Tox.** v. 65, n. 3, p. 391-398. 2000.

AZEVEDO, L. C.; ANDRADE, A. R.; SOUSA, P.; NERY, J. T. A influência do fenômeno El Niño na vazão da bacia do Rio Iguaçu-PR. **Persp Geog.** n. 2, p.52-65. 2006.

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.

BARDDAL, M. L. **A influência da saturação hídrica na distribuição de oito espécies arbóreas da floresta ombrófila mista aluvial do rio Iguaçu, Paraná, Brasil.** Tese de Doutorado em Ciências Florestais. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

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.

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.

FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Cartas climáticas do Estado do Paraná.** Londrina: IAPAR. p. 45. 1984.

GIULIO, R. T. D.; WASHBURN, P. C.; WENNING, R. J.; WINSTON, G. W.; JEWELL, C. S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ Toxicol Chem.** 9: 1103-1123. 1989.

GOERKE, H.; WEBER, K.; BORNEMANN, H.; RAMDOHR, S.; PL ÖTZ, J. Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota. **Mar Pollut Bull.** v. 48, i 3-4, p. 295-302. 2003.

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.

GRUPO DE TRABALHO. ÍNDICES DE AVALIAÇÃO DE PROJETOS HÍDRICOS (GTZ). **Coletânea de textos traduzidos: índices hidro-ambientais – análise e avaliação do seu uso na estimação dos impactos ambientais e projetos hídricos.** Curitiba (PR) cap. 2. 1995.

HASSLER, M. L. **A dinâmica das unidades de conservação na região metropolitana de Curitiba.** Editora UFPR. Curitiba. n.12, p.135-143. 2006.

HOLMQVIST, N.; STENROTH, P.; BERGLUND, O.; NYSTRÖM, P.; GRANELI, W.; LARSSON, P. Persistent organic pollutants (POP) in a benthic omnivore – A comparison between lake and stream crayfish populations. **Chemosphere.** v. 66, i. 6, p. 1070-1078. 2007.

HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE JR, P. M. **Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.** Bergman HL (ed). Boca Raton, FL, USA. 1992.

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

INGÊNITO, L. F. S.; DUBOC, L. F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do Alto Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arq Ciênc Vet Zool Unipar.** Umuarama 7 (1): 23-36. 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.

JONES, K.C.; de VOOGT, P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environ Pollut.** v. 100, i. 1-3, p. 209-221. 1999.

KANTEK, D. L. Z. **Estudo citogenético comparativo entre populações de uma espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) endêmica do rio Iguaçu.** Dissertação de Mestrado em Genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

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

KARR JR. Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. **Ecol Appl.** 1:66-84. 1991.

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.

KHANSARIA, F. E.; GHAZI-KHANSARIA, M.; ABDOLLAHIC, M. Heavy metals content of canned tuna fish. **Food Chem.** v. 93, i. 2, p. 293-296. 2005.

KIM, Y.; EUN, H.; TAKAO, K.; FUJIWARA, H. Vertical distributions of persistent organic pollutants (POPs) caused from organochlorine pesticides in a sediment core taken from Ariake bay, Japan. **Chemosphere.** v. 67, i. 3, p. 456-463. 2007.

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

LESSER, M. P. Oxidative Stress In Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annu Rev Physiol.** v. 68, p. 253-278. 2006.

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.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; BENNEMANN, S. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). **Arch Hydrobiol.** v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STONEY, K. B. Diethyldithiocarbamate injection induces transient oxidative stress in goldfish tissues. **Chem-Biol Interact.** v. 170, i. 1, p. 1-8. 2007.

MAACK, R. **Geografia física do estado do Paraná.** 2ed. Rio de Janeiro: J. Olympio; Curitiba: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná. p. 442. 1981.

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.

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.

MENDONÇA, F. Riscos, vulnerabilidade e abordagem socioambiental urbana: uma reflexão a partir da RMC e de Curitiba. **Editora UFPR**. n. 10, p. 139-148. 2004.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALINIM, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp Biochem Phys C**. v. 143, i. 2, p. 141-149. 2006.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; NOGUEIRA, A. J. A.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. **Chemosphere**. v. 66, i. 3, p. 514-522. 2007.

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.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônadosomático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Rev Bras Biol**. v. 35 (4), p. 775-798, 1975.

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.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Programa Em Tese – TV UFPR**. Universidade Federal do Paraná, 2006.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci Total Environ.** v. 309, i. 1-3, p. 105-115. 2003.

PANDOLFO, C.; BRAGA, H. J.; SILVA JR, V. P.; MASSIGNAM, A. M.; PEREIRA, E. S. **Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: Epagri. 2002.

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.

PIANCINI, L. D. S. **Biomonitoramento do Rio Iguaçu em Dois Pontos Utilizando Como Bioindicador Peixes do Gênero *Astyanax* (Characiforme, Characidae).** Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

PROGRAMA LUZ PARA TODOS. **O Programa Luz Para Todos no Paraná inaugurou obras de eletrificação e Telecentro Rural para a comunidade Nova Restinga – Porto Amazonas (PR).** 2007.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BOMPADRE, S.; WINSTON, G. W. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. **Aquat Toxicol.** 49: 13-25. 2000.

RODRIGUES, A. P. C.; SILVA, L. C. C. P.; CASTILHOS, Z. C. Avaliação de risco ecológico em ecossistemas aquáticos contaminados por mercúrio. Estudo de caso: *Netuma barba* (Lacepede, 1803) (Siluriformes, Ariidae), Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ. In: **IX Congresso Brasileiro de Limnologia.** 2003, Juiz de Fora. Água- rompendo fronteiras entre ciência, educação e cidadania, 2003.

RODRIGUEZ, A. F. Os caminhos das águas. **Agroanalysis**. 18:22-6. 1998.

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.

SANDANGER, T. M.; BRUSTAD, M.; SANDAU, C. D.; LUND, E. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in a coastal northern Norwegian population with high fish-liver intake. **J. Environ. Monit.** v. 8, p. 552–557. 2006.

SANTOS, D. C.; MALINOWSKI, A. Programa de conservação de água no meio urbano: Uma aplicação enfocando o reuso da água. **Rev Bras Eng Agr Amb**. v9, p.171-175. 2005.

SCHAFASCHEK, T. P. **Do convencional ao ecológico: normas, divergências e implicações sobre a produção apícola**. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005.

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.

SILVA, M. D. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN) através da aplicação de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e**

genéticos em *Astyanax sp.* Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

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 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.

STENESH, J. **Biochem Plen.** New York, EUA. p 596. 1998.

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.

STURVE, J.; HASSELBERG, L.; FALTH, H.; CELANDER, M.; FORLIN L. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquat Toxicol.** 78: 73-78. 2006.

TEISSEIRE, H.; VERNET, G. Is the “Diuron Effect” Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*? **Pestic Biochem Phys.** v. 66, p. 153–160. 2000.

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

TOMITA, R. Y. Toxicologia em ambientes aquáticos. **O Biológico.** v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TSUTIYA, M. T. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgoto. In: 20o 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. **Environ Toxicol Pharmacol**. v. 13, p. 57-149, 2002.

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.; CICCIONI, 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.

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

WANG, X.; CAI, J.; ZHANG, J.; WANG, C.; YU, A.; CHEN, Y.; ZOU, Z. .Acute trimethyltin exposure induces oxidative stress response and neuronal apoptosis in *Sebastiscus marmoratus*. **Aquat Toxicol**. v. 90, i. 1, p. 58-64. 2008.

WANG, X.; SATO, T.; XING, B.; TAO, S. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. **Sci Total Environ**. v. 350, i. 1-3, p. 28-37. 2005.

WEBER, H.; GOERKE, H. Persistent organic pollutants (POPs) in antarctic fish: levels, patterns, changes. **Chemosphere**. v. 53, i. 6, p. 667-678. 2003.

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

ZAMONER, M. **Biologia Ambiental**. 1. ed. Curitiba: Protexto, 2007. v. 500. 432 p.
2007.