

RAQUEL HUBIE BUSATO

**MONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, PONTA GROSSA -  
PARANÁ COM ÊNFASE EM CIANOTOXINAS**

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  
2009

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem do uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para a presente e as futuras gerações”

Artigo 225 da Constituição Federal do Brasil

## AGRADECIMENTOS

Para a conclusão de mais esta etapa de minha vida, a participação e/ou presença de inúmeras pessoas foram essenciais.

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por seu imenso amor e por ser presença constante em minha vida.

Aos meus pais por serem minha fonte de inspiração, admiração e respeito, pelo apoio incondicional e presença reconfortante nos momentos difíceis. Obrigada pela confiança, ajuda e amor de toda uma vida!

À minha irmã, companheira, conselheira e minha melhor amiga, por estar sempre presente, me apoiando, torcendo por mim e principalmente me ouvindo.

À todos os meus familiares, que mesmo distantes, sempre me apoiaram, especialmente minha avó Terezinha que sempre torce pelas minhas vitórias, me apoiando e incentivando.

À Prof<sup>a</sup> Helena pela oportunidade, orientação e paciência que tornaram este trabalho possível.

À Zaíra, com quem compartilhei muitos momentos, coletas e experimentos e com quem aprendi muito. Obrigada pela ajuda e pela paciência!

Aos meus colegas e amigos de laboratório Cris, Stéfani, Manu, Lu, Marcel, Flávio, Ju, Eliane, César, Fábio, Halina, com quem aprendi muito, dei muitas risadas e passei por ótimos momentos. Também a Wanessa por ter me ajudado tanto.

Aos meus amigos de turma que foram fontes de incentivo e tornaram esses quatro anos incríveis.

Ao Iate Clube de Ponta Grossa, por permitir a realização deste trabalho dentro de suas dependências e pelas informações disponibilizadas.

À Força Verde de Vila Velha, pela ajuda nas pescarias, ao IAP pela realização das análises de fitoplâncton e ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, da UFRJ pela realização das análises de cianotoxinas. Sem suas importantes colaborações, este estudo não seria possível.

E à todos os meus amigos por serem parte fundamental da minha e por sempre me incentivaram e acreditaram em mim, agradeço pela amizade, ajuda e carinho. Especialmente a Celina, a Geovana e o Gui, amigos presentes em momentos importantes, sempre dividindo idéias e construindo sonhos.

Concluo esta etapa levando grandes amigos e recordações. Sou eternamente grata a todos que participaram de todo esse processo.

## RESUMO

O reservatório Alagados é a principal fonte para abastecimento de água de Ponta Grossa, Paraná, além de ser utilizado para atividades recreativas e pesca. Em seu entorno há intensa exploração agropecuária e ocupação indevida e estas atividades antrópicas tem contribuído para o comprometimento deste manancial. Com o objetivo de monitorar a qualidade de água deste reservatório, este trabalho avaliou em peixes *Geophagus brasiliensis* (acará) do reservatório os biomarcadores bioquímicos como as atividades das enzimas glutatona S-transferase (GST), catalase (CAT), etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e lipoperoxidação (LPO) em fígado e acetilcolinesterase (AchE) em músculo e cérebro, considerando a contagem de cianobactérias e análise de saxitoxinas na água. Quatro coletas foram realizadas, no verão e no outono de 2008 e no verão e no outono de 2009. Uma parte dos peixes foi sacrificada no dia da coleta e a outra após 20 dias de depuração no laboratório em água filtrada. Amostras de fígado, músculo e cérebro foram retiradas e congeladas para posterior análise dos biomarcadores bioquímicos. A contagem de cianobactérias da água coletada na zona eufótica próxima à barragem foi de 135.296 cels/ml no verão de 2008, de 125.556 céls/ml no outono de 2008 e no outono de 2009 foi de 320.120 céls/ml todas com predominância de *C. raciborski*. Todas as contagens estão acima das 20.000 céls/ml que a legislação brasileira têm como limite aceitável. No verão e no outono de 2008 foi detectada a presença de GTX 2, 3, 4 e 5. A atividade específica da GST e da AchE cerebral não mostrou diferenças significativas quando comparados os grupos coleta e depuração nas coletas realizadas. Houve uma indução na atividade da EROD no grupo coleta em relação ao grupo depuração no outono de 2008 e no outono de 2009. No verão de 2008 e no outono de 2009 observou-se uma indução na atividade da CAT no grupo depuração em comparação ao grupo coleta. Houve aumento da LPO no grupo depuração em comparação ao grupo coleta no verão de 2008 e no outono de 2008 e de 2009. A atividade da AchE muscular aumentou no grupo coleta em relação ao grupo depuração no verão de 2008. De acordo com os resultados o reservatório Alagados sofre impacto antrópico. Os dados obtidos sugerem que o período de 20 dias em água livre de toxinas não foi suficiente para depuração das toxinas e mostraram haver variação sazonal na saúde dos peixes, que pode não somente estar relacionada as cianotoxinas, mas também às atividades agropecuárias realizadas no entorno do Reservatório Alagados e à variação na biodisponibilidade dos contaminantes ao longo do ano.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reservatório Alagados (Ponta Grossa).

FIGURA 2: Exemplar de *Geophagus brasiliensis* (acará).

FIGURA 3: Mapa da localização do Reservatório Alagados no Estado do Paraná, com destaque para os pontos de coleta.

FIGURA 4: Atividade específica da AchE muscular em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 5: Atividade específica da AchE muscular em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

FIGURA 6: Atividade específica da AchE cerebral em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 7: Atividade específica da AchE cerebral em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

FIGURA 8: Atividade específica da GST em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 9: Atividade específica da GST em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

FIGURA 10: Atividade específica da EROD em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 11: Atividade específica da EROD em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

FIGURA 12: Atividade específica da CAT em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 13: Atividade específica da CAT em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

FIGURA 14: LPO em *Geophagus brasiliensis* comparando-se grupos coleta e depuração em cada estação.

FIGURA 15: LPO em *Geophagus brasiliensis* comparando-se os grupos coleta de cada estação.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Saxitoxinas encontradas na água do reservatório no verão de 2008 e no outono de 2008.

TABELA 2: Parâmetros físico-químicos analisados na água em cada coleta realizada.

## 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  
COPEL – Companhia Paranaense de Energia  
CYP450 - Enzimas do citocromo P450  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio  
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio  
EROD – Etoxiresorufina-O-deetilase  
FMO - Monooxigenases flavoproteínas  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona redutase  
GST – Glutaciona S-transferase  
GTX - Goniatoxinas  
IAP – Instituto Ambiental do Paraná  
LPO – Peroxidação Lipídica  
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NEO - Neosaxitoxina  
NUCLEAM - Núcleo de Estudos em Meio Ambiente  
PCB – Bifenils policlorados  
PSPs – paralytic shellfish poisons (venenos paralisantes de mariscos)  
RNA – Ácido ribonucleico  
SANEPAR - Companhia de Saneamento do Paraná  
STX - Saxitoxina  
7ER - 7-etoxiresorufina

## SUMÁRIO

RESUMO.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1 Reservatório Alagados.....	10
1.2 Cianobactérias.....	12
1.3 Cianotoxinas.....	14
1.4 Saxitoxinas.....	15
1.5 Biomonitoramento.....	16
1.6 Biomarcadores.....	17
1.6.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	18
1.6.2 Glutathione S-transferase (GST).....	18
1.6.3 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	19
1.6.4 Catalase (CAT).....	20
1.6.5 Lipoperoxidação (LPO).....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos.....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Animais.....	23
3.2 Coleta de material.....	23
3.3 Análise da água.....	24
3.3.1 Análise de fitoplâncton.....	25
3.3.2 Análise de saxitoxina.....	25
3.4 Análises bioquímicas.....	26
3.4.1 Biomarcadores.....	26
3.4.2 Análise estatística.....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Análise da água.....	30
4.2 Análise dos biomarcadores.....	31
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>



## **1 - INTRODUÇÃO:**

O crescimento das cidades nas últimas décadas tem sido responsável pelo aumento da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. Em todo o planeta, praticamente não existe um ecossistema que não tenha sofrido influência direta ou indireta do homem. Atividades como mineração, construção de barragens e represas, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, desmatamento e uso inadequado do solo em regiões ripárias e planícies de inundação acabaram resultando na desestruturação do ambiente físico, químico e alteração da dinâmica natural das comunidades biológicas.

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais advindos de atividades antrópicas. Como consequência destas atividades, tem-se observado uma expressiva queda da qualidade da água e perda de biodiversidade aquática.

A água desempenha um papel fundamental na produção de bens indispensáveis à vida e ao bem estar da população mundial. O aumento populacional aliado à falta de planejamento urbano e ao desenvolvimento econômico tem trazido problemas como a falta de saneamento básico e principalmente a degradação do meio ambiente, sendo de particular importância, o comprometimento das bacias hidrográficas que são os primeiros ambientes a sofrerem as consequências do crescimento populacional, especialmente as situadas próximas as cidades. Estas bacias foram transformadas em receptores e diluidores de poluentes oriundos das atividades humanas desenvolvidas em suas áreas de drenagem. A grande maioria desses resíduos poluidores tem sido lançada sem nenhum tipo de tratamento prévio, potencializando riscos à saúde humana e animal, deteriorando a qualidade de vida dos organismos e desequilibrando os ecossistemas (LIMA e LIBOS, 2002).

O desenvolvimento industrial e o aumento populacional ocorridos nas últimas décadas no Brasil, não foram acompanhados de um aumento na área de saneamento gerando desta forma um déficit na coleta e tratamento de esgoto sanitário, o que acabou acarretando no despejo de esgotos e efluentes industriais nos ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos, próximos a grandes cidades. Com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais foram substituídas por monoculturas, cansando um grave desequilíbrio no solo visto que passaram a ser utilizados diversos

agroquímicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos (KLEMZ, 2002).

A descarga de esgotos industriais e domésticos sem nenhum tratamento e também a utilização extensa de fertilizantes na agricultura tem levado a desequilíbrios no ecossistema aquático, que acabam favorecendo a degradação da qualidade dos mananciais de água, incluindo os responsáveis por alimentar os sistemas de abastecimento de água. Esse aumento de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos ambientes aquáticos, causa um enriquecimento artificial desses ecossistemas aquáticos, denominado eutrofização, que pode afetar a qualidade e a disponibilidade da água de mananciais.

Este fenômeno altera vários atributos físicos, químicos e biológicos nos ecossistemas aquáticos e pode ser um processo natural, também conhecido como envelhecimento de lagos, ou um processo artificial provocado pela ação antrópica.

A eutrofização dos corpos d'água gera todo um desequilíbrio no ambiente aquático na medida que reduz o oxigênio dissolvido, aumenta a mortalidade de peixes e outros organismos aquáticos, aumenta o custo do tratamento da água e promove um intenso desenvolvimento de uma comunidade fitoplanctônica, geralmente com predominância de microalgas e cianobactérias responsáveis por florações. O aumento na entrada de nutrientes, inicialmente resulta num aumento da produtividade de fitoplâncton, com conseqüente mudança em seu padrão sazonal e que pode estabelecer populações maciças em períodos de tempo relativamente curtos (XAVIER *et al.*, 2005).

No Brasil tem-se percebido uma intensificação da ocorrência de florações de cianobactérias, e uma crescente preocupação com a saúde pública, uma vez que as cianobactérias sob determinadas condições podem produzir toxinas (cianotoxinas).

#### 1.1 - RESERVATÓRIO ALAGADOS:

A bacia hidrográfica do manancial de Alagados está inserida na região dos Campos Gerais no quadrante sudeste do Estado do Paraná e é limitada pelas coordenadas geográficas 24° 52'a 25° 05' de latitude S e 49° 46' a 50° 06' de latitude W de Greenwich, (e, pelas coordenadas UTM 592.000 a 624.000 e 7.226.300 a 7.249.800), abrangendo parte dos municípios de Ponta Grossa, Castro e Carambeí.

Alagados é a designação utilizada para nomear a área inundada pelo represamento das águas do rio foi Pitangui, por ocasião da construção de uma barragem

em 1929 com a finalidade de produção de energia elétrica. Com a formação do lago, pela construção da barragem, gerou-se uma mudança na paisagem, dotando a região de uma grande beleza. O que acabou despertando o interesse para a ocupação de suas margens nas décadas de 40 e 50. Em 1972, a Empresa Paranaense de Energia (COPEL) assumiu a geração de energia elétrica, e logo em seguida, em 1977 cedeu a instalação de captação para abastecimento de água de Ponta Grossa à Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). A represa passou a abastecer a cidade de Ponta Grossa, sendo responsável por aproximadamente 40% do abastecimento de água da cidade, algo em torno de 31mil m<sup>3</sup> (LANGE, 1998). Hoje o reservatório é também responsável pelo abastecimento das cidades de Castro e Carambeí.

Na década de 90 houve uma ocupação desordenada das margens da represa, a qual conta com atualmente com mais de 150 construções residenciais, considerando somente a orla sul do reservatório, pertencente ao município de Ponta Grossa (GOULART, 2001). Com a construção de casas e a fundação de um iate clube a represa passou além de gerar energia e fornecer água, a ser utilizada para atividades de lazer, balneário, pesca, natação, prática de sky aquático e passeios de barcos a motor, lanchas e jet-skys (NUCLEAM, 2002).



FIGURA 1 - Reservatório Alagados (Ponta Grossa).  
Fonte: o autor (2008).

Em seu entorno são realizadas atividades de agricultura e pecuária (até 100m da margem). Podendo ser destacados o cultivo de soja, milho, feijão, trigo, cevada, aveia, e sorgo, além da criação de gado leiteiro, suínos, ovelhas e aves. A região é caracterizada pela utilização de insumos agrícolas modernos, como adubação química, sementes melhoradas, agrotóxicos e máquinas. Porém, as instalações físicas para o

desenvolvimento dessas atividades, muitas vezes não estão adequadas à legislação ambiental vigente, podendo comprometer a qualidade da água do reservatório (NUCLEAM, 2002).

Também são registradas várias áreas com exploração minerária (saibreira, cascalheira, pedreira) em atividade ou desativadas no entorno do reservatório, muitas vezes com processos erosivos acentuados resultando considerável assoreamento no leito dos rios e da represa (NUCLEAM, 2002). Capri (1999) diagnosticou uma série de problemas ambientais decorrentes da ação antrópica no local.

O Reservatório Alagados é classificado como sendo um reservatório de Classe III segundo o IAP, ou seja, moderadamente degradado, por apresentar um déficit considerável de oxigênio dissolvido na coluna d' água, médio aporte de nutrientes e matéria orgânica, tendência moderada à eutrofização e tempo de residência das águas, considerável de 34,1 dias. A profundidade máxima é do reservatório é de 14 m, a profundidade média, 4m, e acumula cerca de 27,7 milhões de m<sup>3</sup> de água. Apresentando uma vazão média de 9,4m<sup>3</sup>/s de média (NUCLEAM, 2002).

São registradas florações eventuais de cianobactérias no reservatório de Alagados desde 1980, porém as florações se tornaram mais intensas e freqüentes a partir de 2002, sendo registrada a presença de saxitoxina.

Segundo dados fornecidos pelo IAP, durante o ano de 2003, a contagem de cianobactérias nos meses de janeiro a junho foi superior a 80.000 céls/ml, sendo o pico registrado no mês de janeiro (366.360 céls/ml). Em 2006 a contagem foi superior a 83.000 céls/ml o ano inteiro, atingindo o máximo de 867.721 céls/ml em dezembro, com o predomínio de *Cylindospermopsis raciborskii*, sendo o limite estabelecido pelo Ministério da Saúde de 20.000 céls/ml. Há alguns anos análises de cianotoxinas em amostras de água pré e pós-tratamento do reservatório Alagados já revelavam a presença de Saxitoxina (STX), Neosaxitoxina (NEO), Goniatoxinas (GTX) 1, 2, 3 e 4 e em junho de 2002 detectou-se a presença de STX, de NEO, de GTX1 e de GTX2 (FERNANDES *et al.*, 2005). O exame hidrobiológico dos corpos d'água, Alagado indicou presença de uma floração persistente de *Cylindospermopsis raciborskii* no reservatório (YUNES *et al.*, 2003).

A pesca e banho no reservatório Alagados estão proibidos desde 2006 pela Portaria IAP nº29 para resguardar a saúde pública.

## 1.2 - CIANOBACTÉRIAS:

As cianobactérias surgiram há cerca de 3,5 bilhões de anos de acordo com o registro de fósseis em rochas sedimentares do noroeste da Austrália. Sendo portanto consideradas como um dos primeiros organismos a existirem no planeta e possivelmente constituírem os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberar oxigênio na atmosfera primitiva (GRAHAM e WILCOX, 2000).

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas (algas azuis), são microorganismos procariontes, fotoautotróficos e aeróbicos. Apresentam pigmentos como clorofila-a, ficobilinas, ficocianinas, ficoeritrinas e carotenóides, pigmentos que absorvem a energia solar possibilitando a realização da fotossíntese (AZEVEDO *et al.*, 2006; GRAHAM e WILCOX, 2000). Sua morfologia básica compreende formas unicelulares, coloniais e multicelulares filamentosas, podendo estas ser ou não ramificadas e portadoras ou não de células especializadas, os heterocistos. Seu tamanho pode variar de 20 µm para as unicelulares a 200 µm para as filamentosas ou coloniais (GRAHAM e WILCOX, 2000).

Seus processos vitais necessitam de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para seus processos vitais e tem como seu principal modo de obtenção de energia a fotossíntese. Por apresentarem essa simples e pequena necessidade de moléculas para sua sobrevivência, as cianobactérias possuem uma grande capacidade de crescimento nos mais variados meios, na água onde vivem predominantemente, até nos solos e rochas. Na água doce, necessitam de um pH neutro, em torno de 6 a 9, temperatura entre 15 e 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio para melhor se desenvolverem. E sobre determinadas condições ambientais de temperatura e pH (DOMINGOS, 2001) liberam endotoxinas (toxinas intracelulares) na coluna d'água.

Florações de cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* e *Oscillatoria* em águas de abastecimento público caracterizam um sério problema às estações de tratamento por entupirem filtros, alterarem o sabor da água tratada e causarem odor. E sabe-se que quarenta das cerca de duas mil espécies existentes de cianobactérias até hoje identificadas são descritas como produtoras de toxinas capazes de causar graves problemas à saúde humana e até mesmo a morte de animais domésticos e selvagens (CHORUS e BARTRAM, 1999; WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

No mundo inteiro, têm-se registrado casos de intoxicação de seres humanos e animais em decorrência da ingestão ou contato com as toxinas produzidas por

cianobactérias em corpos d'água em que se desenvolveram florações. Já foram descritas intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (FALCONER, 1994) e Portugal (OLIVEIRA, 1991). No Brasil, Teixeira *et al.*,(1993) descreveu em seu trabalho evidências de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica na Bahia e a morte de 88 pessoas em 1988.

### 1.3 - CIANOTOXINAS:

As cianotoxinas são toxinas produzidas por algumas espécies de cianobactérias tanto de água doce como salgada, e são liberadas para a água quando ocorre lise celular ou morte celular. Estas toxinas incluem-se em três grupos de acordo com sua estrutura química: peptídios cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos, com pesos moleculares que variam entre 165 a 1600 Da (SIVONEN e JONES, 1999).

Por sua ação farmacológica estão classificadas em duas classes principais. As neurotoxinas, alcalóides ou organofosforados neurotóxicos caracterizadas pela ação rápida e por causarem morte por parada respiratória poucos minutos após a exposição do indivíduo e as hepatotoxinas, peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos, que atuam menos rapidamente causando morte em poucas horas ou dias.

As cianotoxinas podem comprometer a qualidade da água e causar danos a saúde humana e à vida animal se encontradas em águas de consumo, sendo registrados casos de mortes de animais, e doenças de ordem hepática e neurológica, conforme a estrutura da toxina. Existem evidências de que a imersão de peixes em água contendo cianobactérias pode causar danos à saúde dos mesmos, sendo a manifestação do efeito tóxico muito variada dependendo da espécie.

As cianotoxinas podem se acumular em vertebrados e invertebrados aquáticos como em peixes, mexilhões e no zooplâncton em geral. Existe um considerável potencial para que os efeitos tóxicos sejam ampliados através das cadeias alimentares aquáticas. Essa toxicidade ampliada já é bem conhecida devido a poluentes antropogênicos, como metais pesados e pesticidas.

Devido aos problemas que podem ser causados pelas florações, a Legislação Brasileira passou a considerar como um dos parâmetros a serem monitorados a concentração de cianotoxinas na água destinada ao consumo humano e a análise de saxitoxinas em amostras de água está se tornando de extrema importância, visto que em

vários mananciais de abastecimento, desde a região nordeste até a região sul do país foi observada a presença de cianotoxinas.

#### 1.4 - SAXITOXINAS:

Entre as neurotoxinas estão as saxitoxinas grupo de alcalóides carbamatos neurotóxicos produzidos por cianobactérias, que apresentam efeitos de inibição da condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio, impedindo desta forma a propagação da despolarização e a transmissão do impulso nervoso (CESTELE e CATTERALL, 2000, FERNANDES *et al.*, 2005; WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

Este grupo de neurotoxinas hidrofílicas foi primeiramente isolado de dinoflagelados marinhos, responsáveis pela ocorrência de marés vermelhas. Atualmente, sabe-se que são produzidas especialmente pelos dinoflagelados *Alexandrium* spp. e *Gymnodinium* spp., e por bactérias heterotróficas. São produzidas também por cianobactérias como *Aphanizomenon* sp., *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Planktothrix* sp. (BRIAND *et al.*, 2003, CALIJURI *et al.*, 2006; WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

Em 1999, foi publicada a primeira evidência de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtoras de análogos da saxitoxina na América do Sul. Essas cianobactérias foram isoladas de dois reservatórios do estado de São Paulo (LAGOS *et al.*, 1999). Desde então, no Brasil, a análise de saxitoxinas em amostras de água está se tornando importante, na medida, que em vários mananciais de abastecimento, desde a região nordeste até a região sul do país, um grande número de ocorrências de cepas do gênero *Cylindrospermopsis* produtoras de neurotoxinas têm sido registradas (FERNANDES *et al.*, 2005).

As saxitoxinas são também conhecidas como paralytic shellfish poisons (PSPs – venenos paralisantes de mariscos) devido à sua ocorrência e associação com frutos do mar e são geralmente agrupadas em três categorias de acordo com sua toxicidade; as menos potentes C-toxinas (duplamente sulfatadas), as mais tóxicas goniatoxinas (com apenas um grupamento sulfato) e as altamente tóxicas saxitoxinas (não sulfatadas) (JONES e NEGRI, 1997).

A presença dessas toxinas em águas para consumo humano implica em sérios riscos à saúde pública. Os sinais clínicos de intoxicação humana por saxitoxina são principalmente tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular,

náusea, vômito e sede. Os sintomas podem começar 5 minutos após a ingestão e a morte pode ocorrer entre 2 a 12 horas e em casos de intoxicação com dose não letal, os sintomas desaparecem de 1 a 6 dias (CARMICHAEL, 1994). Não se tem conhecimento de efeitos crônicos por falta de estudos de longa duração com animais.

#### 1.5 - BIOMONITORAMENTO:

A comunidade científica e agências regulatórias nas últimas três décadas tem intensificado seu interesse em relação à detecção, conhecimento e controle dos agentes ambientais responsáveis por causar danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA *et al.*, 2003). Este interesse aumentou com o crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da industrialização, associado à utilização inadequada de recursos naturais.

Existem três principais situações que requerem biomonitoramento: onde existam razões para se acreditar que espécies nativas estão sendo ameaçadas; quando há implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados; e quando existe o interesse em conhecer a qualidade ambiental (DA SILVA *et al.*, 2003).

O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. A habilidade de proteger os ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência das ações humanas sobre os sistemas biológicos (CAIRNS *et al.*, 1993). Nesse contexto, a definição de biomonitoramento mais aceita é o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas (MATTHEWS *et al.*, 1982).

O uso das respostas dos organismos é a base dos índices biológicos. Bioindicadores são espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes (WASHINGTON, 1984). O termo “resposta biológica” se refere ao conjunto de reações de um indivíduo ou uma comunidade em relação a um estímulo ou a um conjunto de estímulos (ARMITAGE, 1995). Por estímulos entende-se algo que induza uma reação do indivíduo que possa ser percebida e medida na população ou na comunidade.



O biomonitoramento, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes; utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), propicia promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA *et al.*, 2003).

#### 1.6 - BIOMARCADORES:

A análise de biomarcadores pode auxiliar na detecção de alterações no ambiente por substâncias tóxicas biologicamente significativas, antes da ocorrência de danos irreversíveis ao ecossistema. Sendo desta forma, uso de bioindicadores e biomarcadores está sendo amplamente utilizado nas últimas décadas na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas.

Quando expostos aos agentes estressores ambientais, os organismos respondem através da modificação de diferentes biomarcadores a nível molecular, histológico e fisiológico. Assim sendo, biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER *et al.*, 1996). Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992).

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, desta forma 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 segundo Van der Oost (2003) em:

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;

Biomarcadores de efeito: são aqueles que mostram o efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente;

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.

Os biomarcadores utilizados para a realização deste trabalho foram acetilcolinesterase (AChE) relacionada a neurotoxicidade, glutathione S-transferase (GST) e etoxiresorufina O-deetilase (EROD) relacionadas ao mecanismo de biotransformação, catalase (CAT) e lipoperoxidação (LPO), relacionadas ao estresse oxidativo.

#### 1.6.1 - ACETILCOLINESTERASE (AChE):

Dois tipos de colinesterases são conhecidas a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) também chamada de pseudocolinesterase. Os peixes possuem ambas no músculo, mas somente a AChE no cérebro (VAN DER OOST, 2003). A AChE encontra-se envolvida na desativação da acetilcolina na fenda sináptica, prevenindo o estímulo contínuo do neurônio, sendo vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (PAYNE *et al.*, 1996).

A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, formando colina e ácido acético e sua inibição é o mecanismo de ação de diversos agentes tóxicos, principalmente organofosforados, e carbamatos. Outros compostos como metais pesados e organoclorados também podem inibi-la, mas a concentração necessária para gerar esse efeito é relativamente mais alta (STURM *et al.*, 2006).

Os organofosforados e carbamatos possuem curto tempo de meia-vida, tornando a análise da inibição da AChE uma ferramenta útil na avaliação do seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis no ambiente (MONTSERRAT *et al.*, 2007).

#### 1.6.2 - GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST):

Nos organismos é essencial para se alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula que ocorra a transformação metabólica dos compostos químicos. O metabolismo ou biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes que atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais facilmente excretadas (ROSSI, 2008).

O metabolismo envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II, e estas muitas vezes podem ocorrer

seqüencialmente. As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), e geralmente os produtos são quimicamente mais reativos e muitas vezes mais tóxicos ou carcinogênicos que a substância original. As reações de fase II são anabólicas, e envolvem conjugação, gerando produtos inativos.

A enzima Glutathione S-transferase (GST) pertence à fase II do metabolismo sendo uma enzima essencial na proteção contra danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (MARIONNET *et al.*, 2006).

A GST é responsável pela conjugação da glutathione em substratos hidrofóbicos eletrofílicos durante a fase II do metabolismo e sua atividade pode ser também indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como co-fator o GSH, e este participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A família das enzimas 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).

### 1.6.3 - ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE (EROD):

O metabolismo oxidativo envolvendo oxigênio molecular é o processo enzimático inicial na biotransformação da maioria dos compostos orgânicos lipofílicos (reações de fase I). Os principais grupos de enzimas envolvidas nesta etapa da biotransformação de xenobióticos, são as monooxigenases flavoproteínas (FMO) e as monooxigenases heme proteínas (citocromo P450) (STEGEMAN e HAHN, 1994).

As enzimas do citocromo P450 (ou simplesmente CYP450) são proteínas do grupo heme, pertencentes à fase I da biotransformação que oxidam, hidrolizam ou reduzem xenobióticos. Em peixes, e em outros vertebrados, o citocromo P450 é principalmente encontrado no retículo endoplasmático liso e mitocôndrias de células hepáticas, renais, cérebro e outros órgãos (BUCELLI e FENT, 1995).

As reações de fase I normalmente transformam substâncias endógenas ou exógenas lipofílicas em compostos mais hidrofílicos, facilitando sua eliminação. Alterando a estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mesmo mais tóxicos do que a substância original.

A indução de isoenzimas específicas do citocromo P450 acontece principalmente como uma resposta sensível à exposição de animais a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e dibenzodioxinas. Ocorre uma transcrição do gene para CYP1A, mediada por estimulação do receptor, que resulta no aumento do nível de RNA mensageiro especificando nova síntese de isoenzimas de citocromo P450 (CYP1A) e no aumento da respectiva atividade catalítica, ou seja, atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) (STEGEMAN e HAHN, 1994).

A EROD catalisa uma reação de O-desalquilação na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina (7ER) (STEGEMAN e HAHN, 1994), com a formação de resorufina, que pode ser medida espectrofotometricamente (BUCHELLI e FENT, 1995).

O aumento da atividade da EROD em vertebrados é um indicador da indução do CYP1A, auxiliando, portanto, no monitoramento ambiental (BUCHELLI e FENT, 1995). Há uma crescente utilização da indução de CYP1A como um biomarcador para indicar a exposição dos organismos a vários compostos indutores (STEGEMAN *et al.*, 1992).

#### 1.6.4 - CATALASE (CAT):

A catalase é uma enzima intracelular localizada no peroxissomo que facilita a remoção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), metabolizando este em oxigênio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ). O peróxido de hidrogênio é um exemplo de espécie reativa de oxigênio (ERO), que assim como os radicais livres é formado durante o metabolismo oxidativo e de xenobiontes. Radical livre é toda molécula que possui um elétron ímpar em sua órbita externa, que acaba favorecendo a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos, inclusive com moléculas orgânicas. Os radicais livres têm vida média de milésimos de segundo, mas ocasionalmente podem tornar-se estáveis ao reagirem com biomoléculas. Espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, no entanto não possuem elétrons desemparelhados na órbita externa, e desta forma não podem ser classificados como radicais livres (ROSSI, 2008).

No nosso organismo, as espécies reativas são normalmente produzidas pelas células durante os processos metabólicos, entretanto, sob condições normais nosso organismo possui enzimas protetoras, ou antioxidantes que reparam os danos causados pela oxidação. O desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma

condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO/ERN que causa danos às estruturas celulares, podendo levar a inativações enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO), danos de DNA e até a morte celular (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabólitos) têm sido relatados por causar estresse oxidativos. Os efeitos mediados pela oxidação, assim como suas respostas adaptativas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e concentração de componentes não enzimáticos, são potentes biomarcadores de toxicidade (VAN DER OOST *et al.*, 2002).

#### 1.6.5 - LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO):

A oxidação de ácidos graxos polinsaturados é uma importante consequência do estresse oxidativo. O processo de lipoperoxidação (LPO) ocorre por uma cadeia de reações. Quando um radical livre qualquer interage com um ácido graxo insaturado da membrana celular, ocorre o seqüestro de um átomo de hidrogênio e gera-se um radical lipídico, que vai reagir com O<sub>2</sub>, abundante nas regiões de membrana, formando um radical peroxila, que então irá seqüestrar um átomo de hidrogênio de um novo ácido graxo gerando hidroperóxido e um novo radical lipídico que dará continuidade a reação em cadeia.

O término da peroxidação lipídica é o resultado da interação de radicais lipídicos e/ou formação de espécies não radicais por radicais lipídicos peroxil. O hidroperóxido lipídico resultante pode facilmente se decompor em espécies reativas, sendo muitos desses agentes tóxicos e mutagênicos. Desta forma, as membranas lipídicas peroxidadas podem tornar-se rígidas e virem a perder sua permeabilidade e integridade (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). As consequências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e a preservação do gradiente de íons e metabólitos (REBELLO, 2005).

Numerosos estudos têm demonstrado o aumento da lipoperoxidação em vários tecidos de espécies de peixes expostos in vivo a uma variedade de substâncias químicas. A lipoperoxidação tem se mostrado um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN *et al.*, 1992), visto que através dela podemos inferir sobre os danos causados as células pelo estresse oxidativo (KAPPUS, 1987).

## **2 – OBJETIVOS:**

### **2.1 - GERAL:**

Avaliar a qualidade da água do manancial de abastecimento de Alagados localizado no município de Ponta Grossa, Paraná, utilizando biomarcadores e análise de cianotoxinas.

### **2.2 – ESPECÍFICOS:**

Detectar as cianotoxinas presentes na água do manancial de abastecimento.

Avaliar a aplicabilidade da atividade da acetilcolinesterase dos peixes expostos as cianotoxinas com efeitos neurotóxicos do manancial de abastecimento.

Avaliar o metabolismo dos peixes expostos as cianotoxinas do manancial de abastecimento através das análises dos biomarcadores enzimáticos da EROD e da GST.

Avaliar o estresse oxidativo através das análises da CAT e LPO.

Gerar informações para auxiliar nas tomadas de decisão, no sentido de proteger os mananciais e a qualidade da água para os organismos aquáticos e consumo humano.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1 - ANIMAIS:

Os animais coletados pertencem a família Cichlidae, um dos maiores grupos de peixes teleósteos. A família Cichlidae, contém cerca de 1400 espécies, sendo que a grande maioria é de habitat dulcícola e uma minoria é encontrada em ambiente salobre (BENINCÁ, 2006).

O *Geophagus brasiliensis* (acará), utilizado como bioindicador também em outros estudos (WILHEM FILHO *et al.*, 2001) é encontrado em lagos e reservatórios da região Central e Sul do Brasil. É uma espécie abundante no período de verão, em ambientes de fundos lodosos, com reprodução entre final de verão e início de outono. É muito versátil, territorialista e resistente, com predileção por ambientes lânticos, principalmente lagos e lagoas (BENINCÁ, 2006).

Esta espécie foi utilizada por ser uma espécie endêmica e com baixa vulnerabilidade, além da facilidade de captura e disponibilidade no Reservatório Alagados.



FIGURA 2 - Exemplar de *Geophagus brasiliensis* (acará).  
Fonte: [www.malawicichlidhomepage.com](http://www.malawicichlidhomepage.com).

#### 3.2 - COLETA DE MATERIAL:

Foram realizadas coleta de água e peixes em duas estações do ano (verão e outono). As coletas aconteceram em fevereiro e maio de 2008 e em janeiro e maio de 2009. A localização dos pontos de coleta no reservatório (P1 e P2) podem ser

observados na Figura 3. O ponto P1 refere-se ao ponto mais profundo do Reservatório e o ponto P2 à margem do Reservatório, local de coleta dos peixes.

Os peixes coletados foram divididos em dois grupos, um grupo de peixes (grupo coleta) foi sacrificado no local da coleta e outro grupo (grupo depuração) foi transportado, em caixas com água do reservatório com aeração, ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais do grupo depuração foram mantidos por 20 dias, isoladamente, em aquários com água filtrada (sendo trocado metade do volume a cada 2 dias) a 22-23°C, fotoperíodo de 12 horas e alimentados com ração comercial, para avaliar possível depuração de xenobióticos. O grupo depuração do verão de 2009 não sobreviveu aos 20 dias de depuração em laboratório.

Os animais foram anestesiados com benzocaína 20% (diluindo 1ml em 2l de água) e eutanaziados por secção medular. Foi medido o comprimento total de todos os peixes, e deles foram coletados fígado, cérebro e músculo para análise de biomarcadores bioquímicos.

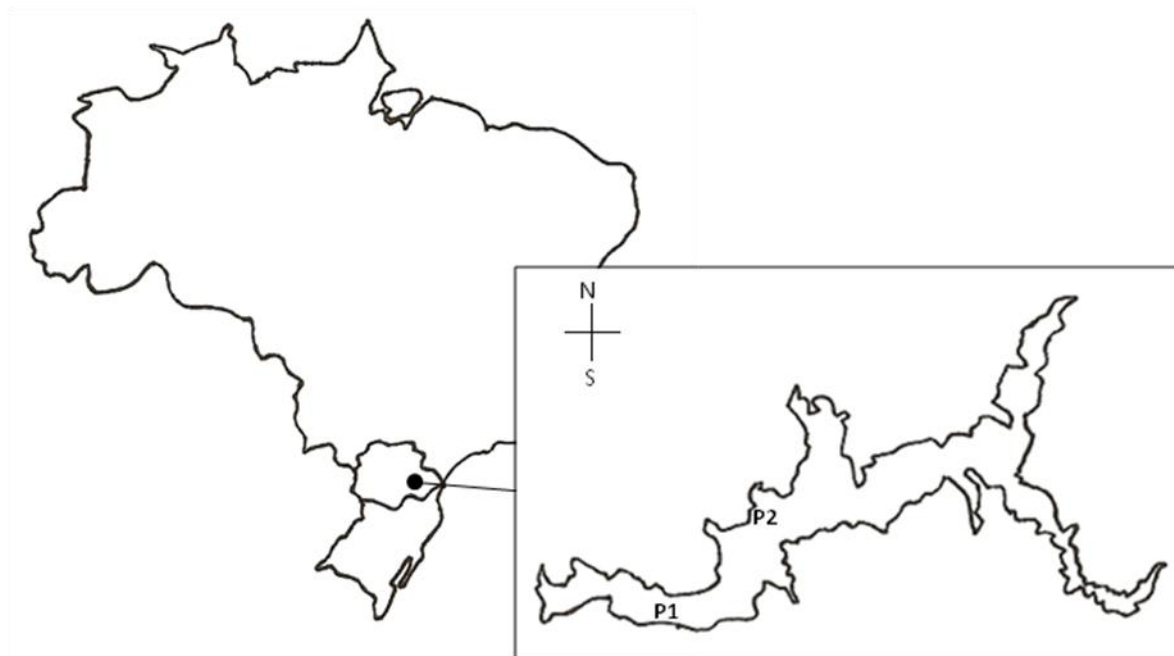


FIGURA 3 – Mapa da localização do Reservatório Alagados no Estado do Paraná. Em destaque mapa do reservatório com os pontos de coleta de água e peixes (P1 E P2).  
Fonte: CLEMENTE (2009).

### 3.3 - ANÁLISE DA ÁGUA:



Amostras de água foram coletadas na zona eufótica (50 cm abaixo da superfície da água) do ponto P1 e no ponto P2. Foram obtidas medidas do pH, temperatura e oxigênio dissolvidos nos dois pontos utilizando-se pHâmetro e oxímetro portáteis. As medidas foram sempre realizadas por volta das 11 horas da manhã.

### 3.3.1 - ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON:

As análises do fitoplâncton foram realizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), segundo método de Utermöhl(1958). As amostras de água coletadas foram preservadas com adição de solução de lugol e permaneceram em geladeira até a realização das análises.

### 3.3.2 - ANÁLISE DE SAXITOXINAS:

As análises foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com derivatização pós-coluna, segundo método de Oshima (1995). As amostras foram mantidas sob refrigeração até chegada ao laboratório, quanto então foram liofilizadas. O liofilizado de 500 ml de água foi resuspendido em ácido acético 0,5M e congelado até a análise. As amostras foram filtradas com filtros de celulose antes da análise por HPLC.

Um sistema Shimadzu com detector de fluorescência Shimadzu (RF-10A<sub>XL</sub>) usando comprimento de onda de excitação a 330nm e emissão a 390nm foi utilizado na análise. Uma coluna de silica gel C18, de fase reversa (LiChroCART® 125-4) e duas fases móveis separadas, com fluxo de 0,8ml/min, foram usadas para detectar diferentes grupos de saxitoxinas: heptasulfonato de sódio 2mM em fosfato de amônio 10mM (pH 7,1) para GTX1-5, e heptasulfonato de sódio 2 mM em fosfato de amônio 30mM (pH 7,1) com acetoneitrila (10:5) para STX e neoSTX. O agente oxidante pós-coluna foi ácido periódico 7mM em solução tampão fosfato de potássio 10mM (pH 9.0), administrado a 0,4 ml/min em tubo de reação de Teflon de 10m em forno seco a 85°C. Após o forno, ácido acético 0,5M foi administrado a 0,4 ml/min para neutralizar a solução antes desta entrar na célula do detector de fluorescência.

Padrões de STX, neoSTX, GTX1, 2, 3, 4 e 5, da NRC-Canadá foram analisados antes e depois da análise das amostras. Os limites de detecção foram: STX, 0,89 ng/L; neoSTX, 2,33 ng/L; GTX 1, 1,03 ng/L; GTX 2, 0,72 ng/L; GTX 3, 0,21 ng/L; GTX 4, 0,24 ng/L, GTX 5, 0,01 ng/L.

### 3.4 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS:

Uma amostra de cérebro e músculo axial de cada peixe foi obtida, pesada e homogeneizada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 (na proporção de 100mg de cérebro ou 50mg de músculo em 1 ml), utilizando homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram transferidos a eppendorfs de 2 ml e centrifugados por 10 min a 4°C a 10.000xg. Alíquotas dos sobrenadantes foram armazenadas a -20° C para posterior análise da atividade de acetilcolinesterase e concentração protéica.

Uma amostra de fígado de cada animal foi obtida, pesada e homogeneizada na proporção de 100 mg em 1 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,5, utilizando homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram transferidos a eppendorfs de 2 ml e centrifugados por 20 min a 4°C a 10.000 x g. Amostras de sobrenadante foram alíquotadas em eppendorfs e armazenadas a -70° C para posterior realização das análises bioquímicas de lipoperoxidação, catalase, etoxiresorufina-O-deetilase, glutathione S-transferase e concentração protéica.

#### 3.4.1 - BIOMARCADORES:

Atividade da Acetilcolinesterase (AChE):

O princípio é o desenvolvimento de reação colorida entre a colina formada pela quebra da acetiltiocolina e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato).

As alíquotas do sobrenadante de músculo e cérebro foram diluídas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 na proporção de 1:20 v/v, e pipetadas em 4 réplicas de 50µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 200µl de DTNB preparado a 0,75 mM em tampão fosfato 0,1M pH 7,5; e 50µl de iodeto de acetiltiocolina (ATC) 9mM em água destilada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 415nm, durante 4 min, seguindo método de Ellman (1961) modificado para

microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998). A atividade enzimática foi expressa em nmol de colina formada/ min/ mg de proteína.

#### Atividade da Glutathione S-transferase (GST):

O método baseia-se no trabalho proposto por Keen *et al.* (1976). As glutathione S-transferases (GSTs) catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB (1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathione reduzida), formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorvância.

Alíquotas do sobrenadante do fígado foram diluídas (1:20 v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetadas em 4 réplicas de 100µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 200µl de solução reação. A solução reação foi composta por CDNB a 3mM e GSH 3mM, em solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,5.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm, durante 2 min e a atividade enzimática foi expressa em nmol de CDNB conjugado/min/mg proteína.

#### Atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD):

A atividade da EROD foi determinada por espectrofluorimetria direta da resorufina, resultado da metabolização da 7-etoxiresorufina (EGGENS *et. al.*, 1992). A leitura foi realizada durante 10 min, com comprimento de onda de excitação a 530nm e emissão a 590nm. Para a análise, 4 réplicas de 50µl do sobrenadante de fígado foram incubadas por 5 min com 420µl de 7-etoxiresorufina (2,6µM em solução tampão TRIS 0,1M - NaCl 0,1M, pH 7,5). Na sequência, foram adicionados 30µl de NADPH (2,6mM, em água destilada). A atividade enzimática foi calculada em pmol de resorufina formada/min/mg de proteína usando uma curva padrão de resorufina.

#### Atividade da Catalase (CAT):

O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (AEBI, 1984).

Alíquotas do sobrenadante do fígado foram diluídas (1:5 v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetadas em 4 réplicas de 10µl em cubetas de quartzo para leitura em espectrofotômetro, seguido de 990µl de solução reação. A solução reação foi composta por peróxido de hidrogênio 30mM, em solução tampão (TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm por 1 min e 30 seg e a atividade enzimática foi expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/min/mg proteína.

#### Lipoperoxidação (LPO):

A lipoperoxidação é dada indiretamente pela concentração de hidroperóxido. O método é baseado na oxidação do Fe<sup>+2</sup> mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe<sup>+3</sup> - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (BHT) (JIANG *et al.*, 1992).

Alíquotas do sobrenadante de fígado foram diluídas (1:5 v/v) em metanol e a seguir centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 10.000xg. O novo sobrenadante foi pipetado em 3 réplicas de 100µl em tubos eppendorf, seguido de 900µl de solução reação. A solução reação foi composta por metanol 90%, BHT (hidroxitolueno butilado – 4mM na solução reação final), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25mM) sulfato ferroso amoniacal (250µM) e alaranjado de xilenol (100µM). As amostras foram incubadas com solução reação por 30 minutos, realizando-se em seguida a leitura, em cubetas de quartzo, por espectrofotometria com comprimento de onda de 560nm. O cálculo da concentração de hidroperóxido nas amostras baseou-se numa curva padrão de peróxido de hidrogênio. A concentração de LPO foi expressa em nmol de hidroperóxidos/mg proteína.

#### Concentração protéica:

Com a finalidade de normalizar os dados nos diferentes ensaios bioquímicos, foi necessária a quantificação de proteínas totais nas amostras. Para análise de proteína no sobrenadante dos tecidos (cérebro, músculo e fígado) foi utilizado o método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de uma curva padrão realizada com albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

### 3.4.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados das análises de biomarcadores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni para analisar os biomarcadores bioquímicos. A comparação entre cada coleta e a respectiva depuração foi realizada através de teste T. Todos os dados foram estatisticamente analisados pelo programa GraphPad Prism v5.00.288 (GraphPad Software, Inc.). A regra de decisão ( $\alpha$ ) foi de 0,05 em todas as análises.

## 4 - RESULTADOS:

### 4.1 - ANÁLISE DA ÁGUA:

A contagem de cianobactérias da água coletada na zona eufótica próxima à barragem foi de 135.296 céls/ml no verão de 2008, com predominância de *Cylindrospermopsis raciborski* (120.800 céls/ml), a contagem foi de 125.556 céls/ml no outono de 2008, com predominância de *Cylindrospermopsis raciborski* (113.627 céls/ml) e no outono de 2009 foi de 320.120 céls/ml, com predominância também de *Cylindrospermopsis raciborski* (285.390 céls/ml). Não há contagem da amostra coletada no verão de 2009. Todas as contagens encontram-se acima do limite estabelecido pela Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde de 20.000 céls/ml.

As análises de saxitoxinas da água foi realizada somente para as duas primeiras coletas (verão 2008 e outono de 2008). Em ambas as coletas realizadas em 2008 foi detectada a presença de goniautoxinas, sendo destacada a presença de GTX 2, 3, 4 e 5 em diferentes concentrações. Os respectivos valores encontrados encontram-se na tabela 1. A concentração média de PST encontrada na água foi de 43,84 ng de equiv. STX/L no verão de 2008 e de 50,78 ng de equiv STX/L no outono de 2008. Não foram detectadas STX e NeoSTX na água em nenhuma das duas coletas realizadas.

TABELA 1: PSPs ENCONTRADAS NA ÁGUA DO RESERVATÓRIO NO VERÃO DE 2008 E NO OUTONO DE 2008.

COLETAS	Equiv. STX (ng/l)	Concentração total de saxitoxina (ng/l)	GTX 2 no total de PSPs (%) (ng/l)	GTX 3 no total de PSPs (%) (ng/l)	GTX 4 no total de PSPs (%) (ng/l)	GTX 5 no total de PSPs (%) (ng/l)
Verão - P1	48,81	82,76	27,45	12,04	56,74	3,75
Verão - P2	38,87	63,50	27,85	13,32	58,81	*
Outono - P1	18,11	37,39	54,15	27,89	15,19	2,75
Outono - P2	83,44	117,21	*	5,40	93,17	1,41

\*menor que o Limite de Detecção

Quanto aos fatores físicos químicos analisados na água coletada no verão e outono de 2008 e no verão e outono de 2009, obtiveram-se os valores que seguem na tabela 2.

TABELA 2: TEMPERATURA, pH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NAS QUATRO COLETAS REALIZADAS.

Coleta	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio dissolvido (mg/l)
Verão 2008	26,9	8,6	9,5
Outono 2008	16,8	7,4	6,2
Verão 2009	23,9	8,8	8,2
Outono 2009	19,8	7,7	6,0

#### 4.2 – ANÁLISE DOS BIOMARCADORES:

##### Atividade da AchE muscular:

A atividade da AchE muscular dos peixes coletados no verão de 2008 observou-se reduzida no grupo depuração em relação ao grupo coleta. No outono de 2008 e no outono de 2009 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos coleta e depuração (FIGURA 4). Comparando-se os grupos coleta do verão de 2008, do outono de 2008, do verão de 2009 e do outono de 2009 percebe-se que a atividade da AchE muscular dos peixes coletados no verão de 2008 foi maior do que a dos peixes coletados em outono de 2008. A atividade da AchE também foi maior no grupo coleta do verão de 2009 em relação ao outono de 2008. (FIGURA 5).

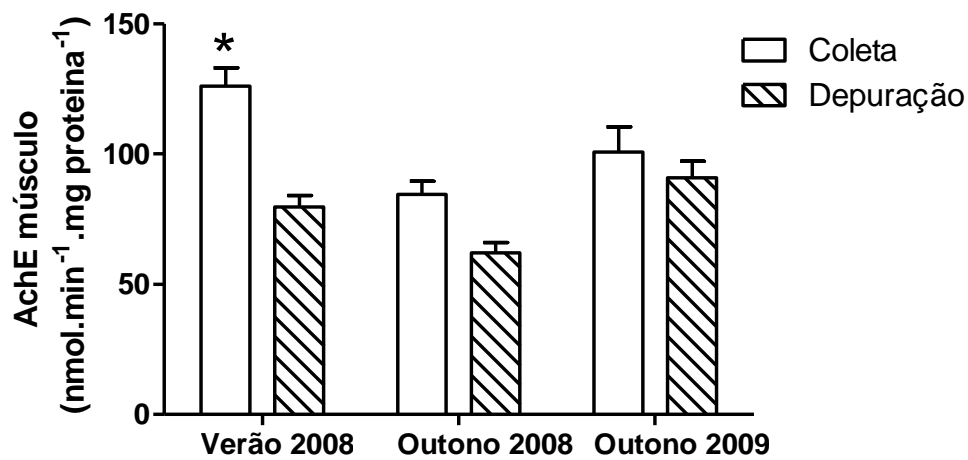


FIGURA 4: Atividade específica da AchE em músculo (nmol de tiocolina/min/mg de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\* p<0,05 comparado ao respectivo grupo depuração).

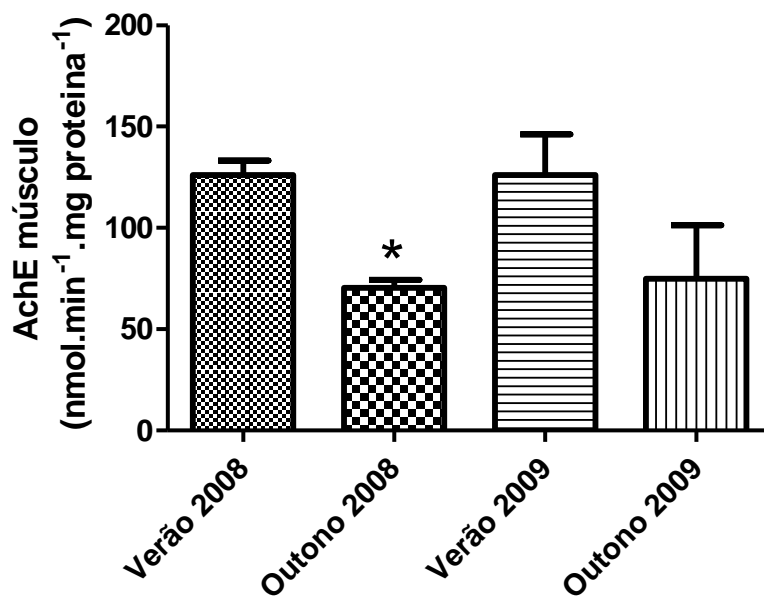


FIGURA 5: Atividade específica da AchE em músculo (nmol de tiocolina/min/mg de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\* p<0,05 comparado ao grupo verão de 2008 e  $\alpha$  <0,05 comparado ao grupo verão de 2009).



## Atividade da AchE cerebral:

As análises da atividade da AchE cerebral indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos coleta e depuração das coletas realizadas no verão de 2008, no outono de 2008 e no outono de 2009 (FIGURA 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando-se os grupos coleta do verão de 2008, do outono de 2008, do verão de 2009 e do outono de 2009 (FIGURA 7).

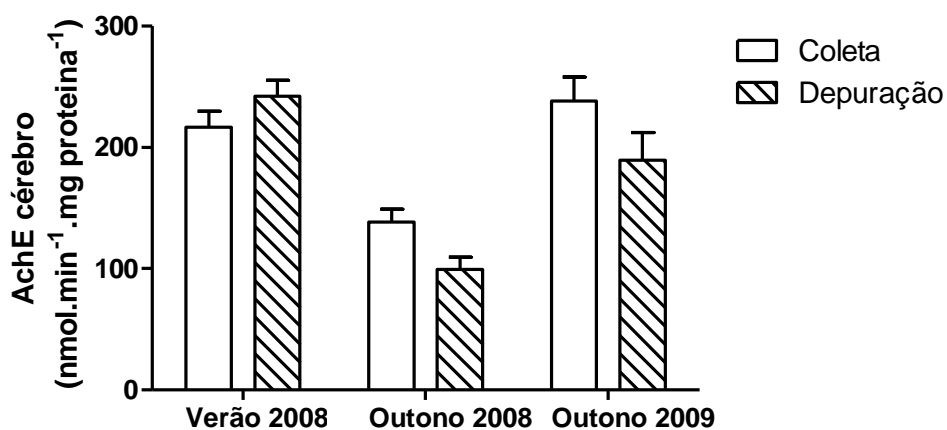


FIGURA 6: Atividade específica da AchE em cérebro ( $\text{nmol}$  de colina/ $\text{min}$ /  $\text{G}$  de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média $\pm$ erro padrão.

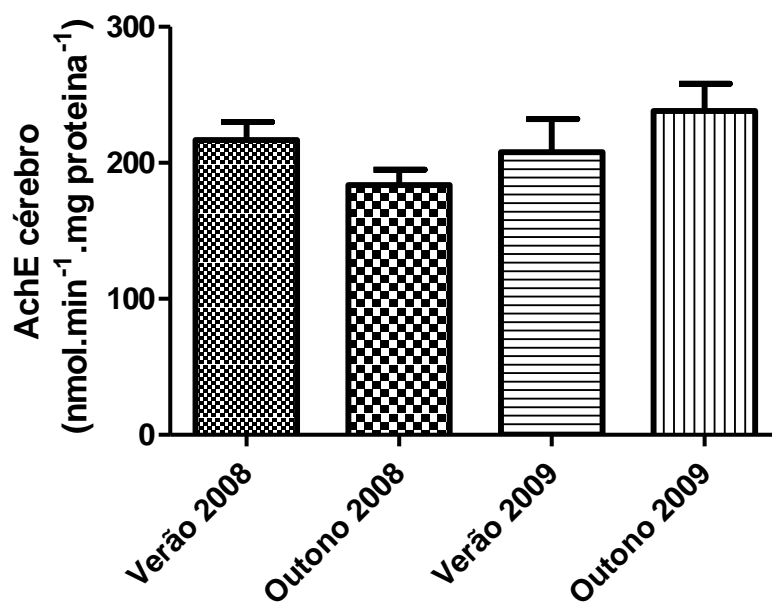


FIGURA 7: Atividade específica da AchE em cérebro (nmol de colina/min/ G de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média±erro padrão.

#### Atividade da GST:

A atividade específica da GST não mostrou diferenças significativas para as atividades específicas quando comparados os grupos coleta e depuração nas quatro coletas realizadas, verão de 2008, outono de 2008, verão de 2009 e outono de 2009 (FIGURA 8). Comparando-se a atividade específica da GST entre os grupos coleta de cada estação observou-se apenas uma redução dessa atividade no grupo coleta do outono de 2008 quando comparado ao grupo coleta do verão de 2008 e quando comparado ao grupo coleta verão de 2009 (FIGURA 9).

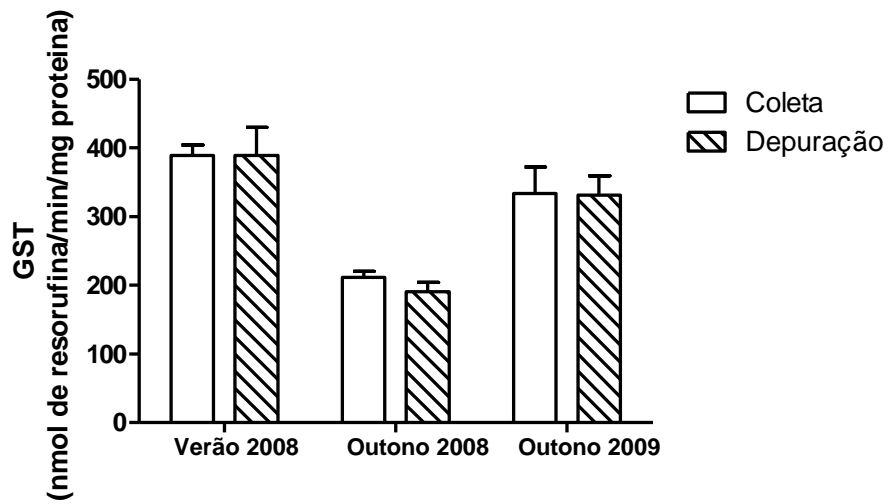


FIGURA 8: Atividade específica da GST no fígado (nmol de CDNB conjugado/min/mg de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média ± erro padrão.

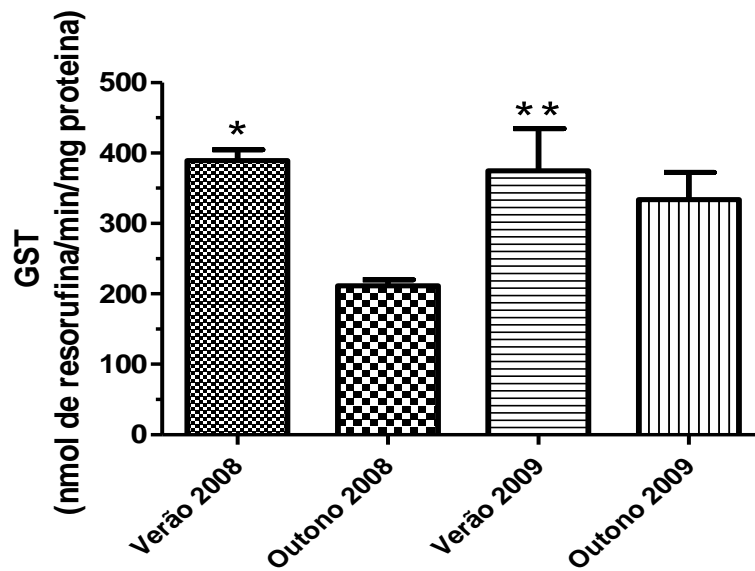


FIGURA 9: Atividade específica da GST no fígado (nmol de CDNB conjugado/ min/ mg de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. . (\* p<0,05 comparado ao grupo outono de 2008 e  $\alpha$  <0,05 comparado ao grupo outono de 2008).

#### Atividade da EROD:

No outono de 2008 e no outono de 2009 comparando-se o grupo coleta com o grupo depuração nota-se uma indução na atividade da EROD no grupo coleta. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos coleta e depuração no verão de 2008 (FIGURA 10). Quanto aos grupos coleta, observaram-se maiores valores no outono de 2009 (FIGURA 11).

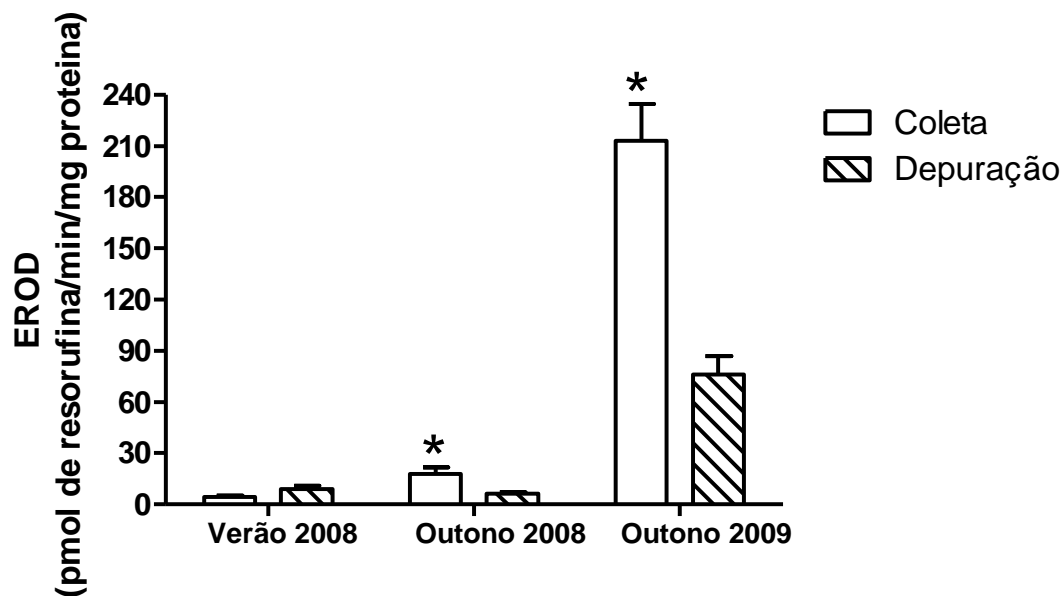


FIGURA 10: Atividade específica da EROD no fígado (pmol de resorufina /min/ mg de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\* p<0,05 comparado ao respectivo grupo depuração).

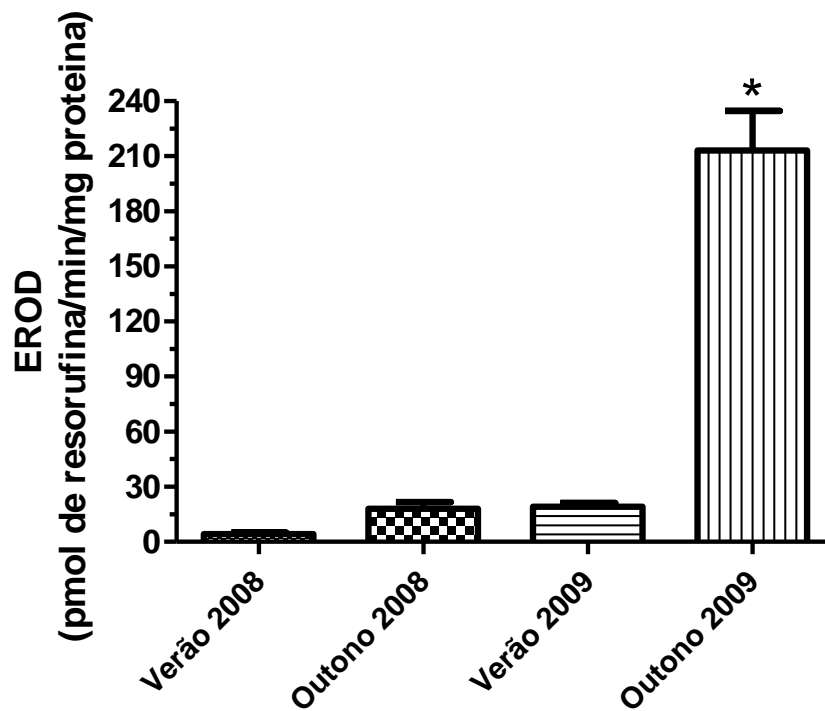


FIGURA 11: Atividade específica da EROD no fígado (pmol de resorufina/min/ G de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\*  $p < 0,05$  comparado aos grupos do verão de 2008, do outono de 2008 e do verão de 2009).

Atividade da CAT :

No verão de 2008 observou-se uma indução na atividade da CAT no grupo depuração em comparação ao grupo coleta. No outono de 2008 a atividade da CAT não apresentou diferenças significativas entre o grupo coleta e depuração. No entanto no outono de 2009 pode-se observar uma indução na atividade da CAT no grupo depuração

em relação ao grupo coleta (FIGURA 12). Comparando-se os grupos coleta do verão de 2008, do outono de 2008, do verão de 2009 e do outono de 2009 não é observada diferença significativa na atividade específica da CAT (FIGURA 13).

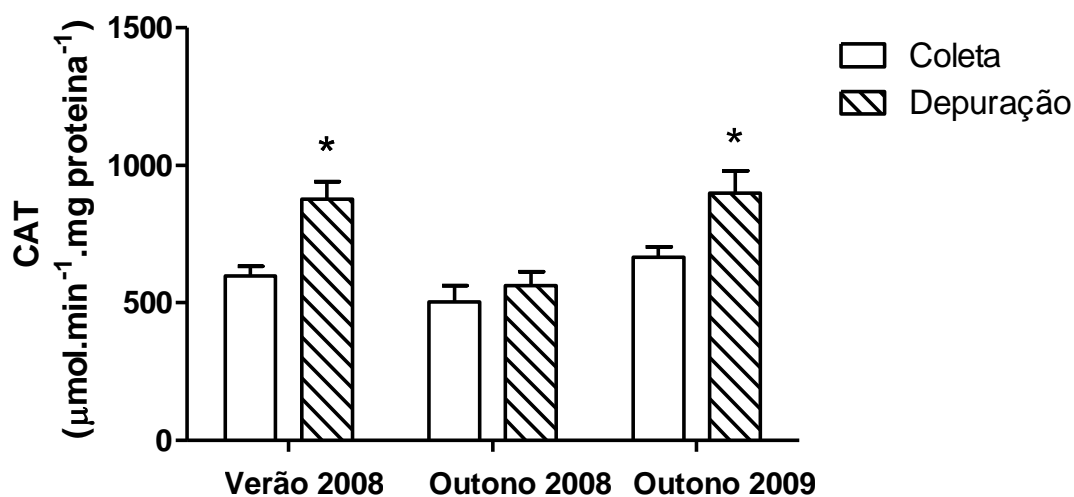


FIGURA 12: Atividade específica da CAT no fígado ( $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado/min/ G de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média $\pm$ erro padrão. (\*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo coleta).

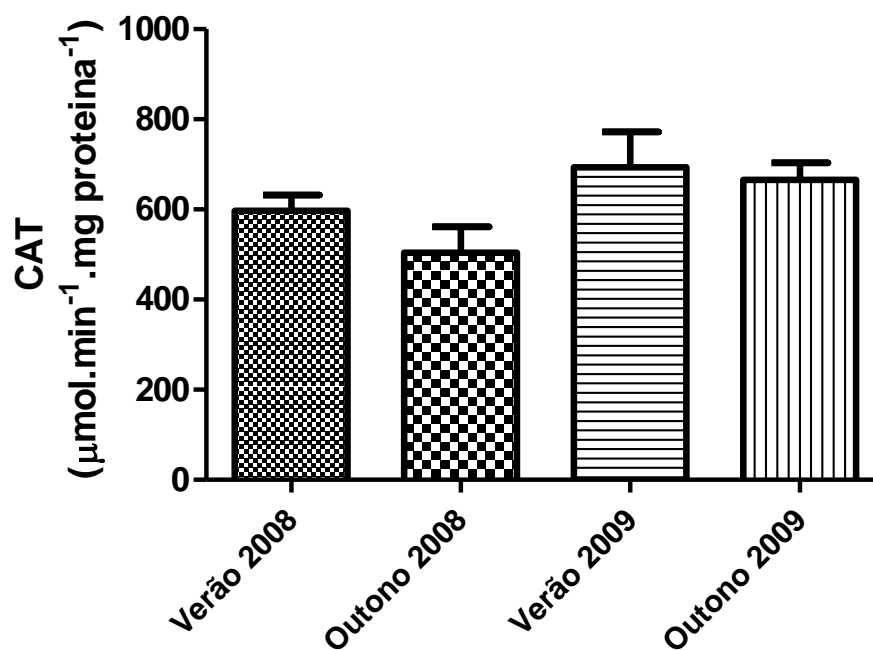


FIGURA 13: Atividade específica da CAT no fígado ( $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado/min/ G de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média $\pm$ erro padrão.

#### Atividade da LPO:

No verão de 2008 a LPO observou-se aumentada após os 20 dias de depuração e mesmo pode ser observado nas outras duas coletas. A LPO apresenta-se maior no grupo depuração tanto no outono de 2008, como no outono de 2009, em comparação ao grupo coleta (FIGURA 14). Comparando-se os grupos coleta nas quatro estações observa-se que a LPO foi menor no outono de 2008 comparado ao verão de 2009. Há também um aumento da LPO no verão de 2009 quando comparado ao outono de 2009 (FIGURA 15).

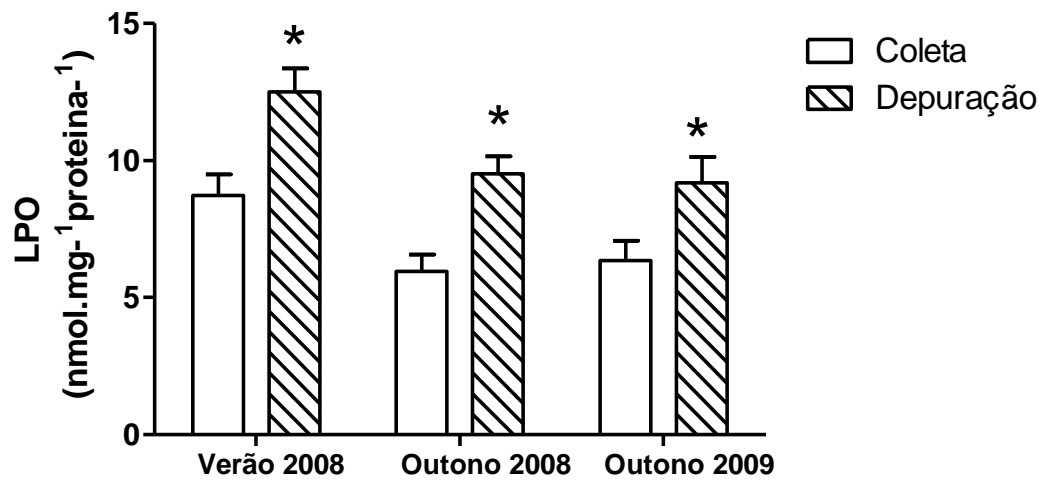


FIGURA 14: LPO no fígado (nmol/ mg de proteína). Comparação entre grupos coleta e depuração de cada estação (teste T). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\* p<0,05 comparado ao respectivo grupo coleta).

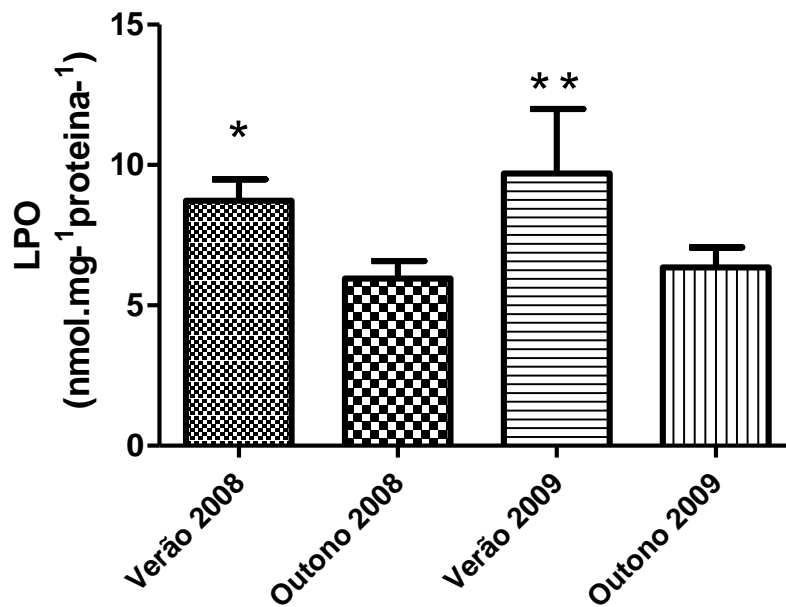




FIGURA 15: LPO no fígado (nmol/ mg de proteína). Comparação entre grupos coleta (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.). Os resultados são expressos em Média±erro padrão. (\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo do outono de 2008 e  $\alpha < 0,05$  comparado ao grupo outono de 2009).

## 5 – DISCUSSÃO:

As águas da Represa de Alagados sofrem processos de florescimento de algas durante todo o ano, sendo mais acentuados em temperaturas elevadas. A eutrofização deste ambiente aquático pode estar em parte associada à profundidade do reservatório, como também aos processos de impactação, evidenciados pela expansão urbana sobre o entorno daquela represa. A eutrofização das águas leva a uma progressiva degradação de sua qualidade, trazendo perda de seu potencial recreacional e de seu valor econômico para o uso no abastecimento público (SCHEFFER *et al.*, 2003). Esta eutrofização acaba promovendo um intenso desenvolvimento de uma comunidade fitoplanctônica, geralmente com predominância de microalgas e cianobactérias responsáveis por florações.

Durante as décadas de 1980 e 1990 ocorreram florações eventuais de cianobactérias no reservatório Alagados, mas a partir de 2002 as florações tornaram-se mais intensas e freqüentes, iniciando geralmente no final da primavera e perdurando até meados do inverno (YUNES *et al.*, 2003). Rodrigues e Pacheco (1997) apontaram a existência de níveis preocupantes de cianobactérias potencialmente tóxicas na represa, especialmente *Cylindropermopsis* e *Dactylococcospsis*, cuja abundância levou à interdição para banho e pesca dos verões 2001/02 e 2002/03.

A contagem de cianobactérias da água na zona eufótica no verão de 2008 e no outono de 2008 e de 2009 apresentou valores acima do limite de 20.000 céls/ml, proposto pela Organização Mundial da Saúde para águas de contato primário e estabelecido como limite aceitável, pela Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde em águas destinadas ao consumo humano. Sendo a *Cylindropermopsis raciborskii* o organismo predominante encontrado nas florações.

Os valores encontrados poderiam talvez ser ainda maiores se uma contagem da zona afótica tivesse sido realizada. Clemente (2009) encontrou valores próximos a 46.000 céls/ml na zona afótica enquanto que na zona eufótica um valor menor de aproximadamente 28.000 céls/ml na mesma coleta.

A contagem de cianobactérias que vem sendo registrada no decorrer dos anos no reservatório indica que valores próximos a estes já foram encontrados e que valores muito maiores também já foram observados. Na água do manancial nos meses de Janeiro a Junho de 2003, segundo dados fornecidos pelo IAP a contagem foi superior a 80.000 céls/ml e o pico foi registrado no mês de Janeiro (366.360 céls/ml). Em 2006 a contagem foi superior a 83.000 céls/ml o ano inteiro, atingindo o máximo de 867.721 céls/ml em

dezembro. Mas não é possível afirmar causas para as diferentes contagens observadas ao longo dos anos, uma enorme gama de fatores pode estar relacionada aos diferentes valores.

A dominância do organismo *Cylindrospermopsis* no reservatório também já foi apontada por outros autores. Segundo MORO *et al.* (2003), organismos da Classe Cyanophyceae são uns dos representantes fitoplanctônicos mais abundantes na represa Alagados, sendo seu melhor desenvolvimento nos meses de verão. O exame hidrobiológico dos corpos d'água, Alagados e Pitangui, indicou presença de uma floração persistente de *Cylindrospermopsis raciborskii* no reservatório (YUNES *et al.*, 2003).

Em 1999, foi publicada a primeira evidência de cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtoras de análogos da saxitoxina na América do Sul. Essas cianobactérias foram isoladas de dois reservatórios do estado de São Paulo (LAGOS *et al.*, 1999). Desde então, no Brasil, a análise de saxitoxinas em amostras de água está se tornando de extrema importância, visto que em vários mananciais de abastecimento no Brasil, um grande número de ocorrências de cepas do gênero *Cylindrospermopsis* produtoras de neurotoxinas têm sido registradas (FERNANDES *et al.*, 2005).

Nas coletas de água realizadas em 2008 foi detectada a presença de goniautoxinas, sendo destacada a presença de GTX 2, 3, 4 e 5. Análises de cianotoxinas em amostras de água pré e pós-tratamento do reservatório foram realizadas por Fernandes *et al.* (2005) com a identificação de saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO) e goniautoxinas (GTX) 1, 2, 3 e 4. Bioensaios realizados com ratos foram positivos para neurotoxinas e confirmaram a toxicidade da floração local (YUNES *et al.*, 2003). Não foram detectadas STX e NEO na água em nenhuma das duas coletas realizadas. A ausência das demais saxitoxinas não pode ser afirmada, já que podem estar presentes em concentrações inferiores ao limite de detecção, e não havia disponibilidade dos padrões de outras toxinas.

A concentração de GTX 2, 3 e 4 encontradas foi maior que a de GTX 5 e sabe-se que suas toxicidades são relativamente maiores que a de GTX 5 (OSHIMA, 1995). No verão de 2008, GTX 4, o subtipo mais tóxico dentre as toxinas detectadas, cerca de 11 vezes mais tóxico que GTX 5 (OSHIMA, 1995), foi a saxitoxina encontrada em maiores valores, mais de 50% do total.

Os valores encontrados de uma forma geral indicam a importância de um constante monitoramento da área em vista da real presença das florações, especialmente

de *Cylindrospermopsis* produtoras de neurotoxinas e das conseqüências que estas toxinas podem trazer a saúde do ecossistema e a saúde humana.

O ambiente aquático está sujeito a inúmeras perturbações ocasionadas principalmente por atividades antrópicas, que de alguma forma podem ser impactantes. Buscando uma maior compreensão dos efeitos destas ações sobre os ecossistemas, diversos estudos de biomonitoramento vêm sendo realizados ao longo das últimas décadas buscando fornecer novas abordagens e informações sobre a atual situação dos nossos ecossistemas aquáticos (SILVA *et al.*, 2004).

O biomonitoramento, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes (bioindicadores); utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), propiciam promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA *et al.*, 2003).

Quando expostos aos agentes estressores ambientais, os organismos respondem através da modificação de diferentes biomarcadores a nível molecular, histológico e fisiológico. Em áreas contaminadas a exposição de organismos a contaminantes resulta em interações entre estas substâncias e os sistemas biológicos que podem acarretar em distúrbios ou respostas adaptativas dos organismos. A análise de biomarcadores pode auxiliar na detecção de alterações no ambiente por substâncias tóxicas biologicamente significativas e avaliar o impacto dos poluentes nos organismos expostos.

Os resultados deste biomonitoramento mostram que parece haver uma variação sazonal na saúde dos peixes no reservatório de estudo, evidenciada por um comportamento diferenciado dos biomarcadores nas duas estações em que coletas foram realizadas. Também foram observadas diferentes respostas quanto ao estado oxidativo e metabólico dos peixes entre as estações quando estes passaram por um período de depuração.

A atividade da AchE muscular foi maior no grupo coleta em relação ao grupo depuração no verão de 2008. O fato da atividade da AchE muscular ser reduzida nos peixes após depuração em aquários com água limpa, não tem uma explicação comprovada. Outros resultados semelhantes foram obtidos (STURM *et al.*, 1999) e algumas explicações foram propostas, porém o mecanismo de ação pelo qual a atividade de AchE apresenta-se maior em animais a campo quando comparado com animais mantidos em aquários ainda não está claro. A adrenalina, liberada em situações de estresse, pode aumentar a síntese de AchE (PAVLOV *et al.*, 1994). Além disso, fatores abióticos como temperatura podem influenciar a atividade de AchE (BOCQUENE *et al.*,

1990). Tortelli (2005) constatou atividade de AchE cerebral maior em bagres coletados em local poluído do que naqueles coletados em área controle-limpa, e sugere que isto se deva a adaptações ao meio impactado, como por exemplo aumento na síntese de AchE na presença de contaminantes que inibam a sua atividade.

Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade específica da AchE cerebral e da GST entre os grupos coleta e depuração nas coletas realizadas, indicando que o período de 20 dias em água limpa não favoreceu a depuração dos agentes oxidantes. A falta de referências dos valores destas enzimas para a espécie utilizada como bioindicador não permite conclusões quanto à normalidade dos valores encontrados.

No outono de 2008 e de 2009 pode-se perceber uma indução da na atividade da EROD no grupo coleta em relação ao grupo depuração, o período de 20 dias em água limpa favoreceu a depuração dos agentes indutores da atividade da EROD. De acordo com alguns autores (ANDERSON e FORLIN, 1992; BUCHELI e FENT, 1997; VAN DER OOST *et al.*, 2003) a atividade desta enzima geralmente ocorre em níveis baixos em animais controle, mas pode ser altamente induzida por tratamentos com determinados agentes tóxicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pentaclorobifenis. Vioque-Fernández *et al.* (2005) em trabalho realizado em região caracterizada pela presença de cianotoxinas (COSTAS, 2004) observou que caranguejos de uma certa área da região possuíam maiores valores da atividade da EROD em comparação a caranguejos de áreas controle.

Quanto à atividade da catalase entre os grupos coleta e depuração no outono de 2008 não houve diferença significativa. No verão de 2008 e no outono de 2009 pode-se observar um aumento da atividade da catalase no grupo depuração em relação ao grupo coleta. As medidas em sistemas biológicos expostos a poluentes, geralmente detectam decréscimo nos níveis de enzimas antioxidantes, mas alguns aumentos podem ocorrer sob certas condições (LIVINGSTONE, 2001, VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Estudos realizados por Van der Oost, *et al* (2003) e por Bagnyukova, *et al.*(2005) mostraram que alguns xenobióticos podem ser capazes de inibir a atividade da catalase.

Ferreira *et al.* (2007) em trabalho realizado com tainhas coletadas em um rio impactado, observaram que após um mês de depuração estes animais apresentaram uma maior da atividade da catalase e que houve uma redução desta neste mesmo grupo de tainhas após 4 a 8 meses de depuração, sugerindo que faz-se necessário um período maior de depuração para redução do estresse oxidativo induzido por contaminantes.

Esses autores sugerem que o aumento enzimático no primeiro mês possa estar relacionado ao fato dos peixes estarem em jejum durante os primeiros dias em cativeiro. Morales *et al.* (2004) relata a influência do jejum no estresse oxidativo com elevação de algumas enzimas antioxidantes, como a catalase.

Em todas as coletas observou-se um aumento da LPO no grupo depuração em relação ao grupo coleta. A depuração pode ter mobilizado contaminantes acumulados em tecidos dos peixes durante a vida livre, e que uma vez em água limpa provocaram um aumento na produção de EROs e conseqüente indução de danos oxidativos e de mecanismos antioxidantes (CLEMENTE, 2009). Esse aumento da produção de EROs com conseqüente indução de danos oxidativos talvez possa também explicar o aumento da atividade da catalase no grupo depuração em relação ao grupo coleta no verão de 2008 e outono de 2009.

Os valores da LPO quando comparados aos valores de grupos controle de outras espécies de peixe de água doce (GUILOSKI, 2008; ROSSI 2008) parecem estar elevados em todos os períodos, indicando a ocorrência de estresse oxidativo.

Considerando-se a atividade da AchE muscular entre os grupos coletas, aparentemente não houve inibição em nenhum período, mas não é possível estabelecer se houve uma indução desta atividade no verão ou se ela encontra-se reduzida no outono. Valores de aproximadamente 30  $\eta$ mol/min/mg já foram relatados em peixes da mesma espécie coletados em uma área referência (BENINCÁ, 2006) e valores entre 64 e 430  $\eta$ mol/min/mg foram encontrados em peixes de água doce pertencentes a grupos controle (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Os valores quanto a atividade da AchE cerebral entre os grupos coleta não apresentaram variação significativa, e são comparáveis aos de animais controle de outras espécies de peixes (SILVA DE ASSIS, 1998; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; TORRE *et al.*, 2007; GUILOSKI, 2008).

Nos grupos local a atividade da catalase e da AchE cerebral não mostrou diferenças significativas, mas observou-se uma elevação na LPO e nas atividade da GST, e da AchE muscular nas coletas feitas no verão. Alguns xenobióticos são capazes de inibir a CAT (BAGNYUKOVA *et al.*, 2003). A diminuição da glutathiona pode reduzir a capacidade celular de destruir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, de modo que aumente o potencial oxidativo da célula. Assim, GSH e suas enzimas associadas exercem um papel protetor dentro da célula. Devido ao papel que as GSTs têm na conjugação das espécies reativas e outras substâncias eletrólíticas, a indução da GST

pode ser considerada benéfica (VAN DER OOST *et al.*, 2003). De fato, a conjugação da glutatona com os xenobióticos, seja espontânea, ou catalizada pela glutatona-S-transferase (GST), diminuem o efeito dos xenobióticos (BOYLAND. E. e CHASSEAUD, 1969).

O aumento da atividade das enzimas pode estar relacionado com a diferente concentração de saxitoxinas e cianobactérias na água do reservatório (CLEMENTE, 2009), mas a falta de alguns dados não nos permite uma elucidação da situação. Alguns autores (GUBBINS *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2006) correlacionaram o aumento ou redução nas atividades de GST e da EROD com as PST, porém outros autores não (HONG, 2003; KOZLOWSKY-SUZUKI *et al.*, 2009). A exposição a saxitoxinas também parece promover um aumento na LPO em moluscos (CHOI *et al.*, 2006).

Fatores abióticos talvez possam ser responsáveis pela diferença entre as estações quanto a atividade dos biomarcadores. A variação sazonal da atividade da GST foi relacionada à temperatura da água por Wilhelm Filho *et al.* (2001) e por Niyogi *et al.* (2001), mas não por Bebianno *et al.* (2007) e por Sanchez *et al.* (2008).

A variação sazonal observada na saúde dos peixes no reservatório não pode ser somente relacionada à concentração de saxitoxinas na água deste reservatório. A concentração de saxitoxinas na água por si só possivelmente não gera as alterações nos parâmetros analisados. Provavelmente as alterações estejam também relacionadas a outros poluentes.

No entorno do reservatório além das diversas construções que geram efluentes industriais e domésticos, são desenvolvidas atividades de agricultura e pecuária e muitas destas atividades geram resíduos que são lançados direta ou indiretamente no reservatório. Na região são utilizados diversos herbicidas, inseticidas e fungicidas compostos por glifosatos, triazóis e piretróides e organofosforados (NUCLEAM, 2002). Os organofosforados 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 e apresentam efeitos tóxicos mesmo em pequenas quantidades (GOERKE *et al.*, 2003). Já os efluentes industriais e domésticos podem conter diferentes concentrações de metais pesados que podem ser tóxicos quando apresentados em concentrações elevadas (BURGERA e GOCHFELDB, 2005).

A mistura de contaminantes que chega ao reservatório deve, portanto ser complexa. Miranda *et al.* (2008) em estudos realizados no lago Ponta Grossa utilizando

peixes observou a bioacumulação de diferentes pesticidas e metabólicos no fígado e músculo destes animais.

Possivelmente a biodisponibilidade destes xenobióticos deva variar ao longo do ano. A biodisponibilidade pode estar relacionada a fatores como pH, potencial redox e agentes complexantes, variáveis com o calendário agrícola. A variação do perfil dos contaminantes no reservatório pode ativar diferentes vias de metabolização nos peixes gerando diferentes respostas dos biomarcadores quanto às diferentes estações do ano (CLEMENTE, 2009). Represas são sistemas complexos, com um padrão dinâmico e de acordo com Margalef (1983) estão sujeitas a ação de forças climatológicas, como precipitação, vento e radiação solar, e também apresentam mecanismos específicos de circulação.

A biodisponibilidade pode estar relacionada ao clima. Em estações mais chuvosas uma maior concentração de contaminantes pode chegar ao reservatório, e em períodos de seca, épocas de maior demanda energética e de água pode ocorrer um acúmulo de poluentes no reservatório (CLEMENTE, 2009). Mudanças na temperatura também podem influenciar a biodisponibilidade e mobilização dos contaminantes na água (BUCHELI e FENT, 1995).

A falta de um maior número de informações a respeito das respostas dos biomarcadores para a espécie utilizada como bioindicador e de um estudo de outros fatores que também possam interferir na dinâmica deste ecossistema não nos permite tirar certas conclusões. Porém, os resultados sugerem a existência do impacto antrópico sobre o Reservatório Alagados.



## 6 – CONCLUSÃO:

A contagem de cianobactérias da água coletada com predominância de *Cylindrospermopsis raciborskii* está acima das 20.000 céls/ml que a legislação brasileira têm como limite aceitável. Sendo detectada a presença de goniautoxinas no manancial.

A AchE pode ser um biomarcador utilizado em monitoramento, porém não respondeu satisfatoriamente às cianotoxinas.

Os dados indicam que os contaminantes presentes na água do reservatório induziram estresse oxidativo nos peixes.

Parece haver variação sazonal na saúde dos peixes, que pode não somente estar relacionada as cianotoxinas, mas também às atividades agropecuárias realizadas no entorno do Reservatório Alagados e à variação na biodisponibilidade dos contaminantes ao longo do ano.

Os dados obtidos sugerem que o Reservatório Alagados sofre impacto antrópico e que o período de 20 dias em água livre de toxinas não foi suficiente para a detoxificação.

Considerando-se as conseqüências das florações sobre a qualidade da água e a saúde pública faz-se necessário à implantação de programas de monitoramento para a aquisição de importantes informações, no sentido de minimizar e prevenir essas conseqüências, de modo que os níveis de exposição a contaminantes como as cianotoxinas sejam mantidos em valores que não constituam um risco a saúde humana.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AEBI, H. Catalase in vitro. Academic Press, v.105, p.121-126, 1984.

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology*, v. 24, p. 1-20, 1992.

ARMITAGE, P. D. Behaviour and ecology of adults. In: *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges* (P. D. Armitage, P. S. Cranston & L. C. V. Pinder, ed.), p. 194-224, London: Chapman & Hall, 1995.

AZEVEDO, S.M.F.O; VASCONCELOS, V.M. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. In: ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações*, p.433 -447, São Paulo: Rima, 2006.

BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. *Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, v. 142, n. 3, p. 335-341, 2005.

BEBIANNO, M. J. *et al.* Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environment International*, v. 33, p. 550–558, 2007.

BENINCÁ, C. Biomonitoramento das Lagoas Estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta - Laguna (SC); Utilizando *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE). Dissertação de mestrado em Genética. Universidade Federal do Paraná, 2006.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, v. 30, p. 75-89, 1990.

BOYLAND. E. & CHASSEAUD, L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances Enzymology Relatives Areas Molecular Biology*, v. 32, p. 173–219, 1969.

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

BRIAND, J.F.; JACQUET,S.; BERNARD,C.; HUMBERT,J.F. Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, v. 34, p. 361-377, 2003.

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

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

CAIRNS Jr., J.; McCORMICK, P. V. & NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia*, v. 263, p. 1-44, 1993.

CALIJURI, M.S.; ADRIANI ALVES, M.S.; ALVES DOS SANTOS, A.C. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos: Rima, p.118, 2006.

CAPRI, L. Diagnóstico preliminar das irregularidades ambientais decorrentes da ação antrópica praticadas na Represa de Alagados, Ponta Grossa, PR. Ponta Grossa. Monografia (Especialização em Geografia Urbana e Análise Ambiental) Universidade Estadual de Ponta Grossa. p.78, 1999.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1), pp. 78-86, 1994.

CÈSTELE, S. CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin actino on voltaje-gated sodium channels. *Biochimie*, v.82, p.883-892, 2000.

CHOI, N. M. C. *et al.* Relationships between tissue concentrations of paralytic shellfish toxins and antioxidative responses of clams, *Ruditapes philippinarum*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 572–597, 2006.

CHORUS, I e BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Publicado pela WHO. London: E & FN Spon, 1999.

CLEMENTE, Z. Monitoramento do Reservatório Alagados, Ponta Grossa (PR) através de biomarcadores e análise de cianotoxinas. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COSTAS, E. Cianobacterias y microalgas tóxicas en el Parque Nacional de Doñana: detección, caracterización, valoración de su posible efecto sobre la avifauna, y desarrollo de un sistema de seguimiento y control. Universidad Complutense de Madrid – Resultados de La investigación em El Parque Nacional de Doñana, 2004.

DA SILVA, J. HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. Genética Toxicológica p.167-178. 2003.

DOMINGOS, P. Dominância de cianobactérias produtoras de microcistinas na lagoa de Jacarepaguá (RJ). Tese de doutorado. CCS. Programa de Pósgraduação em Biotecnologia Vegetal, 2001.

EGGENS, M. L.; GALGANI, J.; KLUNGSOYR, L.; EVERTS, J. Hepatic EROD-activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. Marine Ecology Progress Series. v. 91, p. 71-75, 1992.

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

FALCONER, I.R. Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In : Toxic Cyanobacteria current status of research and management. Eds. STEFFENSEN, D.A & NICHOLSON, B.C. Proceedings of an International Workshop. Adelaide. Austrália, 1994.

FERNANDES, L.F. *et al.* Cianobactérias e cianotoxinas. In: ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C. Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados. Curitiba: Finep, p.369-388, 2005.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUES, M.A. The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. *Marine Environmental Research*, v. 64, p. 181–190, 2007.

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

GOULART, C.F. Diagnóstico e zoneamento da Represa do Alagados. Ponta Grossa. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental) – NUCLEAM/UEPG. p.51, 2001.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. *Algae*. USA: Prentice-Hall, 2000.

GUBBINS, M. J. *et al.* Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research*, v. 50, p. 479-483, 2000.

GUILOSKI, I. C. Estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos de pesticidas em peixes nativos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GUIMARÃES, A. T. B.; SILVA DE ASSIS, H. C.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, p. 57–62, 2007.

HONG, H-Z.; LAM, P. K. S.; HSIEH, D. P. H. Interactions of paralytic shellfish toxins with xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rodents. *Toxicon*, v. 42, p. 425–431, 2003.

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. *Analytic Biochemistry*, v.202, p.384-389, 1992.

JONES, G. e NEGRI, A.P. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) em freshwaters. *Water Research*, v. 31, n. 3, p. 525-533, 1997.

KAPPUS, H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chemistry and Physics of Lipids* v.45, p.105-/115, 1987.

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

KLEMPZ, C. Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo). Dissertação de Mestrado: Departamento de Farmacologia – UFPR, 2002.

KOZLOWSKY-SUZUKI, B. *et al.* Glutathione transferase activity and oocyte development in copepods exposed to toxic phytoplankton. *Harmful Algae*, v. 8, n. 3, p. 395-406, 2009.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; Zagatto, P.A.; Andrinolo D.; Azevedo, S.M.F.Q, OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. v.37, p.1359-1373, 1999.

LANGE, F. L. P. Os Campos gerais e sua Princesa. Curitiba: COPEL, 1998.

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. Rio de Janeiro-RJ : ABES- Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2002.

LIVINGSTONE, D.R.. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, [S.I.], v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L. & CAIRNS Jr., J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. *Water Research*, v.16, p.129-139, 1982.

MARGALEF, R. Limnologia. Barcelona: Omega, 1983.

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

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

MORALES, A. E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses alter prolonged starvation in *Dentex lentex* liver. *Comparative Biochemistry Physiology, part C*, v. 139, p. 153–161, 2004.

MORO, R. S. *et al.* Heterogeneidade espacial do fitoplâncton na represa de Alagados. *Publicações UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*. Ponta Grossa: v. 1, p.21-30, 2003.

NIYOGI, S. *et al.* Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in Barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, v. 52, p.13-26, 2001.

NÚCLEO DE ESTUDOS EM MEIO AMBIENTE (NUCLEAM). Universidade Estadual de Ponta Grossa. *Bacia Hidrográfica do Manacial Alagados*. Ponta Grossa, 2002.

OLIVEIRA, M.R. Eutrofização do rio Guadiana. Blooms de Cyanofphyceae e influência na ictiofauna. *Relatório Técnico Científico INIP*, p.42, 1991.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. *et al.* Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 51, p. 161–167, 2002.

OSHIMA, Y. Post-Column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris: UNESCO, p. 81-9, 1995.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Marine Pollution Bulletin v. 32, ed. 2, p. 225-231, 1996.

PAVLOV, D. F.; CHUIKO, G. M.; SHABROVA, A.G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.). Comparative Biochemistry and Physiology, v. 108, p. 113-115, 1994.

REBELLO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e anti-tumoral de chalconas sintéticas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

RODRIGUES, E. M. e PACHECO, C. R. R. V. Utilização de corpos d'água com superdesenvolvimento de cianobactérias (algas azuis): implicações e cuidados quando da liberação de suas toxinas em águas de abastecimento. Sanare, v.7, n.7 jan./jul. 1997).

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.

SANCHEZ, W. *et al.* Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: implication for environmental biomonitoring. Environment International, v. 34, p. 791–798, 2008.

SCHEFFER, E. W. *et al.* Avaliação da biomassa fitoplanctônica na Represa de Alagados e de sua relação com parâmetros aquáticos de qualidade. Publ. UEPG. Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v.9, p. 21-30, 2003.

SILVA DE ASSIS, H.C. Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. Dissertação (Doutorado em Ciências Naturais: Toxicologia ambiental). Technische Universität Berlin, Berlin, 1998.



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.

SIVONEN, K.; JONES, G.(1999). Cyanobacterial toxins. In: Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I. & Bartram, J. Eds. London, E & FN SPON, p. 41-91, 1999.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN HELD, P.A. - Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. SETAC, Eds. Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994.

STURM, A; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Marine Environmental Research, v. 47, p. 389-398, 1999.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S. & HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the área pf the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, v. 27, p. 244-253, 1993.

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

TORRE, F.R. de la; SALIBIAN, S.; FERRARI, L. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. Chemosphere, v. 68, p. 1582–1590, 2007.

TORTELLI, V. Atividade colinesterásica no monitoramento ambiental: importância da determinação de parâmetros cinéticos em peixes estuarinos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas: Fisiologia animal comparada) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2005.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Limnology*, v. 5, p. 567-596, 1958.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.64, p.178- 189, 2006.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.64, p.178- 189, 2006.

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

VIOQUE - FERNÁNDEZ, A. *et al.* Estudios proteómicos y de biomarcadores en cangrejo de río para evaluar la contaminación del entorno de Doñana. Universidade de Cordoba, España. *Revista de Toxicologia* ano/vol.22 nº2 p.130, 2005.

XAVIER, C.F. *et al.* Eutrofização. In: ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO,C. *Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados*. Curitiba: Finep, p.273-302, 2005.

YUNES, J.S. et al. Cyanobacterial neurotoxins from southern brazilian freshwaters. *Comments on Toxicology*, v. 9, p. 103-105, 2003.

WALKER, C.H. Principles of Ecotoxicology. London: Taylor and Francis, 1996.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, v. 18, p.653-694, 1984.

WIEGAND, C., E PFLUGMACHER, S., Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203, p. 201-218, 2005.

WILHELM FILHO, D. *et al.* Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar ( *Geophagus brasiliensis* ). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 719-726, 2001.