

ZAIRA CLEMENTE

**MONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, PONTA GROSSA (PR)  
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES E ANÁLISE DE CIANOTOXINAS**

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

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

CURITIBA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos fornece coisas de extrema beleza e complexidade, e oportunidades para entendê-las e cuidá-las.

À Profa Helena C. da Silva de Assis, pela orientação, confiança, paciência, e simplicidade com que sempre me recebeu.

Aos meus pais, simplesmente por serem pais, com todas as enormes e belas coisas que esta palavra implica.

Ao Edu, pelo apoio, paciência e amor durante todos estes anos.

À minha irmã, conselheira, estimuladora e julgadora de muitos de meus passos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, os que me ensinaram tudo no começo e os que me acompanham até agora: Cris, Stéfani, Manu, Ju, Flávio, Fábio, Halina, Eliane, César.

À Raquel, companheira de todas as coletas e experimentos.

À Profa Valéria F. Magalhães, pela orientação que veio em ótima hora e pela colaboração no estudo.

Ao Prof. Ciro Oliveira Ribeiro pela colaboração no estudo e a grande disponibilidade para ensinar e esclarecer dúvidas.

À Wanessa, pela nova amizade e pela realização do Ensaio Cometa mesmo nos fins de semana!

Ao IAP, em especial à Ana Carolina, pela realização das análises de fitoplâncton.

À Dalila, sem cuja hospitalidade no Rio de Janeiro teria sido muito difícil realizar a principal parte deste projeto.

À Força Verde de Vila Velha, pela valiosa ajuda nas pescarias.

Ao pessoal do Lab. de Toxicologia Celular, em especial à Dani, pela amizade e ajuda em diversos procedimentos do trabalho.

Ao pessoal do Lab. de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, da UFRJ, que me recebeu muito bem e me ajudou nos procedimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Ficologia da UFPR, em especial à profa Thelma, que me ensinaram coisas importantes para o projeto e ajudaram com material para análise de fitoplâncton.

Ao late Clube Ponta Grossa e seus sócios, que nos permitiram acampar em seus limites, e nos ofereceram dicas e ajuda de todo tipo.

Aos professores e técnicos do Depto de Farmacologia, pelos ensinamentos e ajuda.

Em fim, a todos os amigos e amigas, distantes ou perto, antigos ou novos, que sempre me estenderam a mão, se alegraram com minhas vitórias e aconselharam em meus erros.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O Reservatório Alagados (Paraná, Brasil) possui suma importância por abastecer as cidades de Ponta Grossa, Castro e Carambeí, além de ser usado para recreação e pesca amadora. A ocupação desordenada de sua margem, e as atividades agropecuárias realizadas no seu entorno tem contribuído para o comprometimento deste corpo d'água. Sua eutrofização tem acarretado em freqüentes e intensas florações de cianobactérias produtoras de neurotoxinas. O objetivo deste estudo foi monitorar a presença de cianobactérias na água e de Paralytic Shellfish Toxins (PST) na água e no músculo de peixes do Reservatório, assim como avaliar a saúde dos peixes, através de biomarcadores bioquímicos, genéticos e morfológicos. Um grupo de peixes (*Geophagus brasiliensis*) foi sacrificado no dia da amostragem de água e outro passou por um período de depuração de 20 dias em aquários com água limpa. As amostragens foram realizadas na primavera de 2007, verão e outono de 2008. A contagem de cianobactérias na água esteve acima do limite de 20.000 céls/ml estabelecido pela legislação brasileira; *Cylindrospermopsis raciborskii* foi a cianobactéria predominante. As concentrações de PST foram de 5,15, 43,84 e 50,78 ng de equivalente STX/L na primavera, verão e outono respectivamente. Na água e no músculo dos peixes foram detectadas apenas goniautoxinas, e GTX5 foi a toxina predominante no músculo. A concentração de PST no músculo foi semelhante nas três épocas de coleta e não mostrou redução significativa após 20 dias em água limpa; mas esteve em todos os grupos abaixo do limite de 80µg equiv STX/100g internacionalmente estabelecido para mariscos. No verão houve aumento na atividade da glutathione S-transferase e acetilcolinesterase muscular, lipoperoxidação e índice de dano genético. No outono, registrou-se um aumento na atividade da etoxiresorufina-O-deetilase e índice de dano genético. Importantes alterações histológicas foram observadas no fígado e brânquias nas três estações, também após o período de depuração. O período de depuração mostrou respostas diferentes nos biomarcadores entre as três coletas. Os resultados mostraram haver variação sazonal na saúde dos peixes, que pode estar relacionada às atividades agropecuárias realizadas no entorno do Reservatório Alagados e à variação na biodisponibilidade de múltiplos xenobióticos ao longo do ano.

Palavras-chaves: biomonitoramento, biomarcadores, paralytic shellfish toxins, Reservatório Alagados.

## ABSTRACT

The Reservoir Alagados (Paraná, Brazil) has great importance to supply water to Ponta Grossa, Castro and Carambeí and also to be used for recreation and fishery. The disordered occupation of its edges and agricultural activities and domestic effluents have contributed for the contamination of this water body. Its eutrophization has frequently caused intense cyanobacteria blooms of neurotoxins producers. The aim of this study was to monitor the presence of cyanobacteria in water and Paralytic Shellfish Toxins (PST) in the water and muscle of fishes from de reservoir, as well as the health of fishes through biochemical, genetic and morphological biomarkers. A group of fishes (*Geophagus brasiliensis*) was sacrificed on the day of the sampling water and other one passed by a depuration period of 20 days in aquaria with clean water. The samplings were carried out in Spring 2007, Summer and Autumn 2008. The cyanobacteria counting in water was above the limit of 20,000 céls/ml established by the Brazilian legislation.; *Cylindrospermopsis raciborskii* was the predominant cyanobacteria. The PST concentrations in water were 5.15, 43.84 and 50.78 ng equiv STX/L in Spring, Summer and Autumn, respectively. In the water and fish muscle were detected only gonyautoxinas (GTX), and GTX5 was the predominant toxin in muscle. The PST concentration in muscle was similar in the three studied seasons of the year and did not show significant reduction after the 20 days in clean water; but it was below the limit of 80µg equiv STX/100g internationally established for shellfish. In Summer sampling, the activities of GST and AchE and LPO and genetic damage index increased. It was registered in autumn an increase in EROD activity and in the genetic damage index. Several histopathology alterations in the fish gills and liver were observed in all samplings, also after the depuration time. The time of depuration showed different responses of biomarkers among the three seasons of the year. The results showed a seasonal variation in the health of fishes, which can be related to agriculture activities and to the variation in the biodisponibility of multiple xenobiotics during the year.

Key words: biomonitoring, biomarkers, paralytic shellfish toxins, Alagados Reservoir.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MARGEM DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, COM CONSTRUÇÕES E PLANTAÇÃO DE SOJA AO FUNDO. ....	13
FIGURA 2 – CONTAGEM TOTAL DE CIANOBACTÉRIAS NO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2003 A OUTUBRO DE 2007. ....	15
FIGURA 3 – ESTRUTURA DAS PST.....	19
FIGURA 4 – MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	34
FIGURA 5 – BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> DO RESERVATÓRIO ALAGADOS.. ....	50
FIGURA 6 - ESCORES DE DANO GENÉTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .....	52
FIGURA 7 – CORTES HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIA DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .. ....	54
FIGURA 8 – CORTES HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIA DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .. ....	55
FIGURA 9 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .. ....	56
FIGURA 10 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .. ....	57
FIGURA 11 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> .. ....	58
FIGURA 12 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> DO RESERVATÓRIO ALAGADOS. ....	59
FIGURA 13 – CONTAGEM DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS EM FÍGADO DE <i>GEOPHAGUS BRASILIENSIS</i> DO RESERVATÓRIO ALAGADOS.....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	VALORES DE TOXICIDADE RELATIVA DE ALGUMAS PST .....	35
TABELA 2 –	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM FÍGADO COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA .....	42
TABELA 3 –	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM BRÂNQUIA COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA .....	42
TABELA 4 –	TEMPERATURA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS TRÊS ÉPOCAS DE ESTUDO (MÉDIA DE P1 E P2) .....	45
TABELA 5 –	ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA E AFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NA PRIMAVERA DE 2007 .....	46
TABELA 6 –	ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO VERÃO DE 2008 .....	46
TABELA 7 –	ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO OUTONO DE 2008 .....	47
TABELA 8 –	PST ENCONTRADAS NA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, NAS 3 DATAS DE COLETA, EM P1 E P2 .....	47
TABELA 9 –	PST EM MÚSCULO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS TRÊS DATAS DE COLETA: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO .....	48
TABELA 10 –	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS ESCORES DE DANO GENÉTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> NOS TRÊS PERÍODOS DE ESTUDO: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO.....	51
TABELA 11 –	PREVALÊNCIA (%) DAS ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM FÍGADO E BRÂNQUIAS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NOS TRÊS PERÍODOS DE ESTUDO: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO .....	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	12
2.1 ÁREA DE ESTUDO - RESERVATÓRIO ALAGADOS	12
2.2 CIANOBACTÉRIAS	16
2.3 CIANOTOXINAS	17
2.3.1 Saxitoxinas (Paralytic Shellfish Toxins – PST)	18
2.4 BIOMONITORAMENTO e BIOMARCADORES	22
2.5 BIOINDICADOR	22
2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	24
2.6.1 Biomarcador de neurotoxicidade – acetilcolinesterase (AChE)	24
2.6.2 Biomarcadores de biotransformação	24
2.6.2.1 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	25
2.6.2.2 Glutathione S-transferase (GST)	26
2.6.3 Biomarcadores de estresse oxidativo	27
2.6.3.1 Catalases (CAT)	28
2.6.3.2 Lipoperoxidação (LPO)	29
2.7 BIOMARCADOR GENÉTICO	30
2.8 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1 COLETA DE MATERIAL	33
3.2 ANÁLISE DA ÁGUA	34
3.2.1 Análise quali e quantitativa do fitoplâncton	34
3.3 ANÁLISE DE PST EM ÁGUA E MÚSCULO	35
3.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	37
3.4.1 Preparo das amostras para análises bioquímicas	37
3.4.2 Atividade da AChE	38
3.4.3 Atividade da EROD	38
3.4.4 Atividade da GST	39
3.4.5 Atividade da CAT	39
3.4.6 LPO	40
3.4.7 Concentração protéica	40
3.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS - HISTOPATOLOGIA	40
3.5.1 Análise dos centros de melano-macrófagos e macrófagos livres	42
3.6 BIOMARCADOR GENÉTICO - ENSAIO COMETA	43
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
<b>4 RESULTADOS</b>	45
4.1 ANÁLISE DA ÁGUA	45
4.2 ANÁLISE DE PST EM MÚSCULO	47
4.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	48
4.4 BIOMARCADOR GENÉTICO	51
4.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS	52
<b>5 DISCUSSÃO</b>	61
5.1 PST	61
5.2 BIOMARCADORES	65



<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável para todos os seres vivos, e motivo cada vez mais freqüente de preocupações, seja por questões econômicas, ambientais, ou de saúde pública. O Brasil possui uma situação privilegiada em relação à quantidade de água: estima-se que possua cerca de 12% das reservas mundiais de água doce. Entretanto, este recurso tem sofrido considerável descaso. Desperdício, desmatamento, despejo de esgoto não tratado, contaminação com agrotóxicos, são alguns dos fatores que afetam a qualidade e disponibilidade de água.

Uma importante consequência da poluição dos corpos d'água é a sua eutrofização, ou seja, seu enriquecimento excessivo por nutrientes. A eutrofização causa um desequilíbrio no ecossistema aquático que altera vários atributos físicos, químicos e biológicos. Este fenômeno pode ser um processo natural, também conhecido como envelhecimento de lagos, ou um processo artificial provocado pela ação antrópica.

A eutrofização artificial aumenta os custos de tratamento da água, provoca mortandade de organismos aquáticos e pode acarretar em problemas de saúde pública, como a proliferação de insetos vetores de doença. Além disso, com freqüência tem-se observado a ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de toxinas em ambientes aquáticos eutrofizados. 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.

O Reservatório Alagados (município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil) é um exemplo de manancial eutrofizado e sujeito a intensas e freqüentes florações de cianobactérias, por isso foi escolhido para este estudo de biomonitoramento.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a qualidade da água do reservatório Alagados, Paraná - Brasil, através da análise de biomarcadores em peixes e análise de cianotoxinas.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar as cianotoxinas presentes na água e no músculo de peixes do Reservatório Alagados;
- Avaliar a saúde dos peixes do reservatório através de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos.
- 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.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ÁREA DE ESTUDO - RESERVATÓRIO ALAGADOS

O Reservatório Alagados foi formado em 1929 pelo barramento do Rio Pitangui. Inicialmente foi construído para produção de energia elétrica, mas a partir de 1977 a represa passou a abastecer a cidade de Ponta Grossa, sendo responsável por aproximadamente 38% do abastecimento de água da cidade. Atualmente, abastece também as cidades de Castro e Carambeí (NUCLEAM, 2002).

A bacia hidrográfica à qual este reservatório pertence, situa-se no quadrante sudeste do Estado do Paraná, Brasil; e é limitada pelas coordenadas geográficas 24° 52' a 25° 05' de latitude S e 49° 46' a 50° 06' de longitude W de Greenwich, (e, pelas coordenadas UTM 592.000 a 624.000 e 7.226.300 a 7.249.800) (NUCLEAM, 2002).

O reservatório apresenta profundidade máxima de 14 m, profundidade média de 4m, vazão média de 9,4m<sup>3</sup>/s e acumula cerca de 27,7 milhões de m<sup>3</sup> de água (NUCLEAM, 2002).

Com a construção da barragem e formação do lago, despertou-se o interesse para a ocupação de suas margens e o reservatório passou a ser utilizado para atividades de lazer, balneário, pesca, prática de sky aquático e passeios de barcos a motor (NUCLEAM, 2002).

Atividades de agricultura e pecuária são desenvolvidas no entorno do reservatório (FIGURA 1). Destacam-se o cultivo de soja, milho, feijão, trigo, cevada, aveia e sorgo, além da criação de gado leiteiro, suínos, ovelhas e aves (frangos e perus). 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 dos rios e conseqüentemente da represa (NUCLEAM, 2002).



FIGURA 1 - MARGEM DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, COM CONSTRUÇÕES E PLANTAÇÃO DE SOJA AO FUNDO. FONTE: O autor (2008).

Registrou-se também várias áreas com exploração minerária (saibreira, cascalheira, pedreira) em atividade ou desativadas, muitas vezes com processos erosivos acentuados, resultando em considerável assoreamento no leito dos rios e da represa (NUCLEAM, 2002).

Em relatório divulgado em 2004 pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), o Reservatório Alagados foi considerado de Classe III, 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 (34,1 dias).

Desde 2002, ocorrem intensas e freqüentes florações de cianobactérias no Reservatório Alagados, iniciando geralmente no final da primavera e perdurando até meados do inverno (YUNES *et al.*, 2003; IAP, 2007). Assim, a pesca e banho neste reservatório estão proibidos pela Portaria IAP nº29 de 16 de Fevereiro de 2006 para resguardar a saúde pública.

Segundo Moro *et al.* (2003), organismos da Classe Cyanophyceae são uns dos representantes fitoplactônicos mais abundantes no Reservatório Alagados, sendo seu melhor desenvolvimento nos meses de verão. O exame hidrobiológico dos corpos d'água, Alagados e Pitanguí, indicou presença de uma floração persistente de *Cylindrospermopsis raciborskii* (YUNES *et al.*, 2003).

*C. raciborskii* é capaz de produzir diversas toxinas: Cylindrospermopsina, Saxitoxinas, Anatoxina-a (CHORUS; BARTRAM, 1999). Enquanto as cepas

australianas de *C. raciborskii*, parecem ser análogas às dos USA, produtoras de Cylindrospermopsina e Anatoxina-a, as cepas brasileiras produzem principalmente saxitoxinas (JONES; SAUTER, 2005).

Análises de cianotoxinas em amostras de água pré e pós-tratamento do Reservatório Alagados e do rio Pitangui, realizadas há alguns anos revelaram a presença de Saxitoxina (STX), Neosaxitoxina (NEO), Goniatoxinas (GTX) 1, 2, 3 e 4 e os bioensaios com camundongos foram positivos para neurotoxinas (YUNES *et al.*, 2003). Em junho de 2002 detectou-se 76,7µg/L de STX, 92,6µg/L de neoSTX, 470,3µg/L de GTX1 e 5,3µg/L de GTX2 na água (FERNANDES *et al.*, 2005).

Em dados fornecidos pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP, 2007) (FIGURA 2), observa-se que 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).

CONTAGEM DE CIANOBACTÉRIAS NO RESERVATÓRIO  
ALAGADOS DE 2003 A 2007

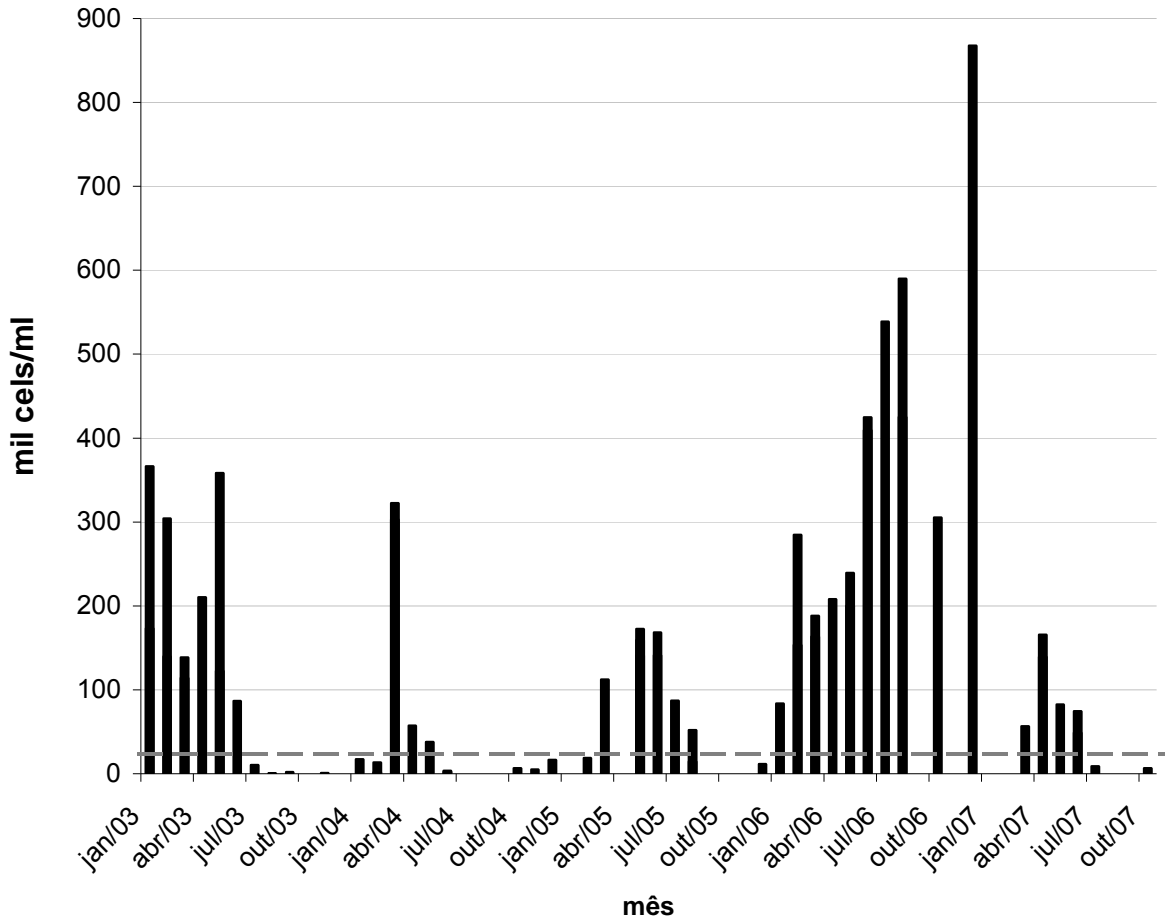


FIGURA 2 – CONTAGEM TOTAL DE CIANOBACTÉRIAS NO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2003 A OUTUBRO DE 2007. A linha horizontal tracejada indica o limite de 20.000 céls/ml estabelecido pela legislação brasileira. FONTE: IAP (2007).

Nos dois anos seguintes, o pico de contagem de cianobactérias ocorreu nos meses de março a junho, sempre com predomínio de *C. raciborskii*; porém houve uma redução nos demais meses, com contagem abaixo do limite de 20.000 céls/ml estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) e com predomínio de organismos como *Aphanocapsa delicatissima*, *Asterionella formosa*, *Micractinium* ou *Merismopedia* spp.

Entretanto, no ano de 2006 observou-se contagem superior a 83.000 céls/ml o ano inteiro, atingindo o máximo de 867.721 céls/ml em dezembro. Durante todo o ano, o organismo predominante foi *C. raciborskii*. Essa contagem só retornou a

níveis inferiores ao limite estabelecido pelo MS em julho do ano seguinte, quando a contagem foi de 7.758 céls/ml, e o organismo predominante passou a ser uma alga verde (*Mougeotia* spp). Porém, em novembro de 2007, a contagem retornou a 46.508 céls/ml, com predomínio novamente de *C. raciborskii*.

No ano de 2000 detectou-se 5,11% de inibição da enzima acetilcolinesterase em amostras contendo *Anabaena spiroides* (produtora de anatoxina-a(s), cuja principal ação é a inibição enzimática) no Reservatório Alagados (YUNES *et al.*, 2003) e em fevereiro de 2004 e 2005 os organismos predominantes foram, respectivamente, *Anabaena* spp. e *Pseudoanabaena* spp., também cianobactérias (IAP, 2007).

## 2.2 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são microorganismos procariontes, fotoautotróficos e aeróbicos (GRAHAM; WILCOX, 2000; AZEVEDO; VASCONCELOS, 2006). Tradicionalmente, a classificação das cianobactérias segue a nomenclatura botânica, por isso são conhecidas também como algas azuis ou Cyanophyceae. Porém, o uso dos critérios da nomenclatura botânica para as cianobactérias é criticado por diversos autores e atualmente está sofrendo revisões para incluir esse grupo na nomenclatura bacteriológica (CALIJURI *et al.*, 2006).

Distribuem-se no mundo inteiro e nos mais variados meios, terrestres e aquáticos, tanto em ecossistemas de água doce como marinhos (BRIAND *et al.*, 2003; CALIJURI *et al.*, 2006). São importantes no equilíbrio dos ecossistemas, mas quando encontram as condições ideais, podem formar grandes florações e provocar graves distúrbios ecológicos e de saúde pública. Quarenta das cerca duas mil espécies de cianobactérias identificadas são descritas como potenciais produtoras de toxinas capazes de causar danos à saúde e até mesmo a morte de seres humanos e animais, domésticos ou selvagens (NEGRI; JONES; HINDMARSH, 1995; CHORUS; BARTRAM, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2002; WIEGAN; PFLUGMACHER, 2005). Quando uma floração de cianobactérias tóxicas colapsa, seja naturalmente ou após o uso de algicidas, as toxinas são liberadas na coluna d'água.



Interações entre fatores físicos, químicos e biológicos favorecem o intenso crescimento das cianobactérias na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade. De acordo com Yunes *et al.* (2002), dentre estes fatores estão a baixa hidrodinâmica do ambiente, que propicia a deposição da forma resistente desse microrganismo (cistos e acinetos); a incidência de luz solar; o pH entre 7,8 e 8,0; a temperatura da água  $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ; a razão nitrogênio e fósforo (N:P) entre 10:1 e 16:1 e a disponibilidade de nutrientes e metais essenciais. Segundo a mesma fonte, o processo de eutrofização dos corpos d'água eleva a incidência destas florações.

Com relação às normas ambientais, o Conselho Nacional de Meio Ambiente, através da resolução CONAMA nº 274 de 29/11/2000, que dispõe sobre as condições de balneabilidade, estabelece restrições à recreação de contato primário quando verificada a ocorrência de florações de algas, até que se comprove que não oferecem risco à saúde humana.

### 2.3 CIANOTOXINAS

As toxinas produzidas por cianobactérias são denominadas cianotoxinas. As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química como peptídeos cíclicos, alcalóides ou lipopolissacarídeos. Entretanto, são mais comumente discutidas com relação à sua toxicidade nos animais. Sendo então classificadas como (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; BRIAND *et al.*, 2003; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005):

- Dermatotoxinas - linbyatoxina A, aplisiatoxina, lipopolissacarídeos
- Hepatotoxinas - microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas.
- Neurotoxinas - anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza  $1\mu\text{g/L}$  de equivalente de microcistina-LR como valor limite a ser controlado na água de beber (CHORUS; BARTRAM, 1999). Embora a OMS considere que ainda não há dados suficientes para o estabelecimento de um limite de concentração máximo aceitável para as saxitoxinas em água potável, Fitzgerald, Cunliffe e Burch (1999), baseados em estudos que analisaram os dados de eventos de intoxicação humana, propuseram 3

µg de equivalente STX/L como limite máximo aceitável de saxitoxinas em água para consumo humano.

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil, na Portaria nº 518 de 2004, adotou 1µg/L de equivalente de microcistina-LR como valor máximo permitido na água para consumo humano. O MS recomenda ainda que se analise saxitoxinas e cilindrospermopsinas, observando, respectivamente, os valores limites de 3µg de equivalentes STX/L e de 15 µg/L. Nesta portaria, estabelece-se também que se houver contagem de cianobactérias acima de 20.000 células/ml (2mm<sup>3</sup>/L de biovolume) no ponto de captação de água para abastecimento, deve ser realizada análise semanal de cianotoxinas na água, na saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos.

Devido à escassez de informações, não foram estabelecidos valores para as demais cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999; FERNANDES *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Saxitoxinas (Paralytic Shellfish Toxins – PST)

Saxitoxinas são alcalóides carbamatos com ação neurotóxica, também conhecidas como Paralytic Shellfish Toxins (PST – toxinas paralisantes de mariscos) devido à sua ocorrência e associação com frutos do mar. 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; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; CALIJURI *et al.*, 2006).

As PST bloqueiam o poro extracelular de canais de sódio regulados por voltagem, impedindo assim a propagação da despolarização e transmissão do impulso nervoso (CESTÉLE; CATTERALL, 2000; PATOCKA, 2001; FERNANDES *et*

*al.*, 2005; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Trabalhos mostram que as saxitoxinas agem também em canais de  $K^+$  hERG e canais de  $Ca^{+2}$  tipo L (WANG; SALATA; BENNETT, 2003; SU *et al.*, 2004).

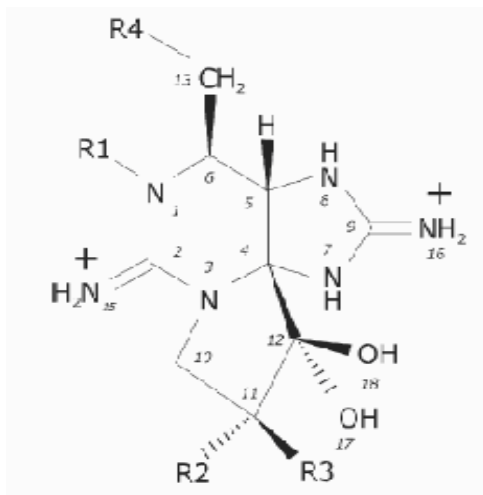
As PST (FIGURA 3) são uma família de mais de 20 moléculas, e podem ser divididas em 4 grupos (KAEBERNICK; NEILAN 2001; BRIAND *et al.*, 2003):

a) Saxitoxinas – saxitoxina, decarbamoilsaxitoxina, neosaxitoxina; decarbamoilneosaxitoxina.

b) Goniautoxinas - 1 a 6, e decarbamoilgoniautoxinas 1 a 4.

c) C-toxinas –1 a 4.

d) Variedades identificadas em cepas americanas de *Lyngbya wollei* –1 a 6.



R1	R2	R3	R4	Toxin
H	H	H	COCNH2	STX
H	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCNH2	GTX2
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCNH2	GTX3
CH	H	H	COCNH2	neoSTX
CH	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCNH2	GTX1
CH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCNH2	GTX4
H	H	H	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX5
H	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C1
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C2
CH	H	H	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX6
CH	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C3
CH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C4
H	H	H	OH	dcSTX
H	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	dcGTX2
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	dcGTX3
CH	H	H	OH	dcneoSTX
CH	CSC <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	dcGTX1
CH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	dcGTX4

FIGURA 3 – ESTRUTURA DAS PST. STX – Saxitoxina, GTX – Goniautoxinas, C - C-toxinas, neoSTX – neosaxitoxina, dcSTX – Decarbamoilsaxitoxina. FONTE: BLANCO; REYERO; FRANCO, 2003.

As PST duplamente sulfatadas (C-toxinas) são menos potentes do que aquelas com apenas um grupamento sulfato (goniautoxinas), sendo as não sulfatadas (saxitoxinas) altamente tóxicas (JONES; NEGRI 1997).

Pouco se sabe sobre a degradação das PST em água doce ou marinha. Jones e Negri (1997) descrevem a persistência das PST por 90 dias quando incubada em água doce a 25°C. A primeira reação de transformação observada foi

desulfocarbamoilação das C-toxinas predominantes, para dc-GTXs, provocando assim um aumento inicial na toxicidade da amostra. A incubação das PST em água de drenagem de irrigação resultou num aumento de seis vezes na toxicidade após 10 dias, com a solução permanecendo mais tóxica do que a amostra original por mais de 60 dias. A dc-GTX assim formada e a GTX originalmente presente na amostra, degradaram-se lentamente durante os 90 dias de incubação. Resultados similares foram obtidos quando as PST foram incubadas em água deionizada estéril, mas a formação de dc-GTX procedeu numa taxa mais lenta do que na água de drenagem. Outra reação importante foi a lenta epimerização dos  $\beta$ -epímeros (menos estáveis – C2 e GTX3) para  $\alpha$ -epímeros (C1, GTX2). Quando as PST foram incubadas a 90°C, os mesmos processos e reações foram observados. Os autores sugerem que o aumento da degradação observada na água de rio e de drenagem é provavelmente um efeito catalítico mediado por compostos particulados ou dissolvidos presentes nas amostras de água, mas não um processo mediado por bactérias aquáticas.

Os sinais clínicos de intoxicação humana por PST incluem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia. Os sintomas podem começar 5 minutos após a ingestão e a morte pode ocorrer entre 2 a 12 horas. Em casos de intoxicação com dose não letal, geralmente os sintomas desaparecem em 1 a 6 dias (CARMICHAEL, 1994). Em gatos, altas doses de STX por via intravenosa provocou queda drástica na pressão arterial, falência do miocárdio e parada cardíaca; enquanto a administração por via oral de 70 $\mu$ g/kg de GTX 2/3 levou a pressão arterial a 70% daquela do controle nos primeiros 90 minutos, e a 25% do controle em 270 min, levando o animal a óbito (ANDRINOLO; MICHEA; LAGOS *et al.*, 1999; ANDRINOLO *et al.*, 2002).

Internacionalmente, o limite estabelecido de PST em mariscos é de 80  $\mu$ g de equivalente STX/100g de carne. As goniautoxinas, especialmente os epímeros GTX 2/3 e GTX 1/4 são as PST mais abundantes em amostras de moluscos no Chile – 75-80% do total de STX (ANDRINOLO *et al.*, 2002).

A DL50 (via intraperitoneal) em camundongos para saxitoxina purificada é de 10  $\mu$ g/kg de peso corporal, enquanto que por consumo oral a DL50 é de 263  $\mu$ g/kg de peso corporal (CHORUS; BARTRAM, 1999; PATOCKA, 2001; FERNANDES *et al.*, 2005).

A respeito da toxicocinética das PST em animais, a maior parte dos trabalhos tem apresentado dados em moluscos, enquanto em peixes e mamíferos o conhecimento ainda é relativamente escasso. Experimentos com gatos mostraram que uma dose oral dos epímeros GTX 2/3 é completamente absorvida a nível intestinal e sua excreção envolve filtração glomerular (ANDRINOLO *et al.*, 2002). Em ratos, 72% da dose de [3H] saxitoxinol (um análogo sintético da STX) administrada por via intravenosa, parece ter sido excretada pela urina, enquanto 28% permaneceu em tecidos do rato, sendo que sua ligação ao músculo parece ser irreversível (HINES; NASEEM; WANNEMACHER, 1993; NASEEM, 1996).

Estudos indicam que a capacidade de acúmulo e biotransformação das PST varia consideravelmente entre as diferentes espécies animais (HONG; LAM; HSIEH, 2003; PEREIRA *et al.*, 2004; FAST *et al.*, 2006; KWONG *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2008). Apesar da sua importância, as características das enzimas envolvidas no metabolismo das PST são pouco conhecidas, devido à dificuldade de se isolar as toxinas e porque a STX e seus análogos são compostos com potencial bélico e cuja manufatura, uso, transferência e reuso são estritamente controlados pela Organização para Proibição de Armas Químicas (Chemical Weapons Convention, Setembro de 1998, Holanda).

Naseem (1996) relatou que houve considerável variação no metabolismo do saxitoxinol entre órgãos e tecidos de ratos e diversos produtos não identificados de degradação metabólica foram detectados no cérebro e outros tecidos. Ensaio *in vitro* mostraram que no molusco *Protothaca staminea*, a glândula digestiva e brânquias apresentaram a maior capacidade de biotransformação de PST (FAST *et al.*, 2006). Garcia *et al.* (2008) relataram oxidação e glucoronidação de GTX 3 e 2 quando incubadas com a fração microssomal de fígado humano, fornecendo uma rota de metabolismo e excreção destes compostos em humanos. Entretanto, incubação dos mesmos epímeros GTX 2/3 na presença de sobrenadante de fígado de gato ou rato não mostrou nenhuma transformação química ou enzimática (ANDRINOLO *et al.*, 2002; HONG; LAM; HSIEH, 2003). Recente estudo relata que bactérias isoladas do trato digestivo de moluscos (*Mytilus edulis*) mostraram habilidade para reduzir a toxicidade de uma mistura de PST *in vitro* (DONOVAN *et al.*, 2008).

Conhecimento sobre quais toxinas são depositadas em quais tecidos e como elas são biotransformadas em cada nível trófico pode ser crítico para determinar o

risco à saúde pública associado ao consumo de diferentes espécies de organismos aquáticos e seus tecidos comestíveis (DEEDS *et al.*, 2008).

## 2.4 BIOMONITORAMENTO e BIOMARCADORES

Até a primeira metade do século XX, o diagnóstico e o monitoramento de áreas passíveis de contaminação eram realizados com base em análises químicas de produtos individuais. Os padrões para cada substância e/ou grupos de substâncias eram estabelecidos com base nos testes de toxicidade que quantificavam apenas a sensibilidade dos organismos utilizados a tais substâncias. No início da década de 1980, introduziu-se o conceito de biomonitoramento, como um conjunto de técnicas através das quais se mede a toxicidade total de um efluente e não a toxicidade possível de cada um de seus constituintes químicos (PROSPÉRI; NASCIMENTO, 2008). A partir daí, o conceito de biomonitoramento se expandiu, envolvendo o uso regular e sistemático de organismos vivos como indicadores de mudanças no ambiente ou qualidade da água (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; PROSPÉRI; NASCIMENTO, 2008).

Em estudos de biomonitoramento com frequência é utilizada a análise de biomarcadores: 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). O uso de biomarcadores nas avaliações de risco apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de exposições potencialmente tóxicas bem antes que efeitos adversos reais ocorram (NASCIMENTO; PEREIRA; LEITE *et al.*, 2008; PROSPÉRI; NASCIMENTO, 2008). O estudo de biomarcadores atualmente está incorporado em diversos programas de monitoramento da poluição na Europa e Estados Unidos. Diversas moléculas biológicas e atividade de enzimas indicam a exposição de um organismo a poluentes (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude da resposta de um organismo a um poluente (biomarcadores de efeito) (RUAS *et al.*, 2008).

## 2.5 BIOINDICADOR

Os habitantes de um ecossistema podem ser precisos indicadores do estado desse ambiente, já que estão sujeitos a uma grande gama de influências químicas e físicas. De acordo com Markert, Breure e Zechmeister (2003) um bioindicador é um organismo (ou uma parte de um organismo ou uma comunidade de organismos) que contém informações sobre a qualidade do ambiente.

Nesse contexto, os peixes são largamente utilizados para descrever características de sistemas aquáticos e para obter informações sobre alterações do habitat por diversas razões; dentre elas podemos numerar: intenso contato com a água, tamanho adequado para realização de diversos procedimentos analíticos, relativa longevidade, distribuição em diferentes níveis tróficos, facilidade de captura, algumas espécies tem ampla distribuição, etc (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

Neste estudo a espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* (QUOY e GAIRMAD, 1824) foi utilizada por ser uma espécie endêmica e com baixa vulnerabilidade, além da maior facilidade de captura e disponibilidade no Reservatório Alagados. Outros estudos já indicam seu uso como bioindicador (BENINCÁ, 2006; RUAS *et al.*, 2008; WILHEM FILHO *et al.*, 2001).

O *G. brasiliensis*, popularmente conhecido como Cará ou Acará, pertence à família Cichlidae, subfamília Geophaginae, ordem Perciforme, classe Actinopterygii. É um peixe de pequeno porte, atingindo até 25cm de comprimento, territorialista, que tem predileção por ambientes lânticos, de fundo lodoso (MAGALHÃES, 1931; FISHBASE, 2008). *G. brasiliensis* é uma espécie não migratória, com desova em março e de setembro a janeiro e que mostra cuidado parental, construindo ninhos e cuidando da prole (MAGALHÃES, 1931; SUZUKI; AGOSTINHO, 1997). Possui hábito bentopelágico, alimentando-se de pequenos invertebrados, vegetais, algas, detritos e sedimento (HAHN *et al.*, 1997; FISHBASE, 2008). Esta espécie distribui-se pelo leste e sul do Brasil (SHIABATTA; PINHEIRO DIAS, 2006).

## 2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### 2.6.1 Biomarcador de Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE)

Com relação às funções neurais, as enzimas de interesse como biomarcadores são as colinesterases. Conhecem-se dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE), e aquela com afinidade pela butirilcolina (BchE), também conhecida como esterase não específica ou pseudocolinesterase. O cérebro de peixes contém AChE, mas não BchE, enquanto em tecido muscular encontram-se ambas, AChE e BchE (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, formando colina e ácido acético. Sua inibição é o mecanismo de ação de diversos agentes tóxicos, mais especificamente organofosforados e carbamatos. Porém outras substâncias parecem também inibir essa enzima, como chumbo, substâncias produzidas por *Streptomyces antibioticus*, anatoxina-a(s), etc (WIEGAND; PFLUGMACHER 2005; MONTSERRAT *et al.*, 2007).

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

### 2.6.2 Biomarcadores de Biotransformação

O fígado é o principal órgão onde ocorre a biotransformação de xenobióticos na maioria das espécies animais. A biotransformação é uma etapa fundamental na eliminação de substâncias lipofílicas do organismo, e consiste na conversão de compostos apolares em compostos polares, mais facilmente excretados. As reações de biotransformação são divididas em duas fases. Durante a fase I, o xenobiótico pode sofrer uma série de reações de oxidação, redução, hidrólise. Na fase II, o



xenobiótico, que pode ou não ter passado pela fase I do metabolismo, é conjugado, através de reações catalisadas por enzimas, a moléculas de alta polaridade mais facilmente excretáveis (FLORIO, 2002; SCHLENK *et al.*, 2008).

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

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. Estas enzimas localizam-se principalmente no retículo endoplasmático liso e mitocôndrias de células hepáticas, renais, cérebro e outros órgãos (BUHELLI; 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 (SCHLENK *et al.*, 2008).

A atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é uma das reações catalizadas pela subfamília CYP1A1. Esta enzima tem como substrato a 7-etoxiresorufina, e através de uma O-desalquilação, ocorre a formação de resorufina, que pode ser medida espectrofotometricamente (BUHELLI; FENT, 1995). Esta reação ocorre geralmente em níveis muito baixos ou indetectáveis em animais controle, mas é altamente induzida por tratamento com alguns agentes tóxicos (HUGGETT *et al.*, 1992), como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), pentaclorobifenis (PCBs), dibenzo p-dioxinas policloradas (PCDDs) e policlorados dibenzofuranos (PCDFs) (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; HUGGETT *et al.*, 1992; BUCHELI; FENT, 1997; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; LU; WANG; ZHU, 2008). Por outro lado, forte e significativa redução da atividade de EROD foi observada em peixes expostos a organotinas, benzeno, cádmio e acrilamida (BUCHELI; FENT 1997, VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

### 2.6.2.2 Glutationa S-transferase (GST)

A glutaciona S-transferase (GST) representa uma importante família de isoenzimas pertencentes à fase II do metabolismo. São assim denominadas pelo seu papel como catalisadoras da conjugação de vários compostos eletrofílicos ou oriundos da fase I, com o tripeptídeo glutaciona reduzida (GSH). Além disso, ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (HUGGETT *et al.*, 1992). Assim, a toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada pela indução da atividade da GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Algumas isoformas de GST podem também combater o dano por estresse oxidativo pela atividade peroxidase dependente de GSH, enquanto outras isoformas conjugam aldeídos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados reativos produzidos durante peroxidação da membrana lipídica (LIEBLER; REED, 1997; TRUTE *et al.*, 2007).

A GST parece estar presente em muitas espécies animais, senão todas. O fígado é a maior fonte de GST em vertebrados. Apesar de algumas isoformas microsossomais de GST terem sido descritas, a atividade de GST é principalmente localizada no citosol (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Elevação na atividade da GST hepática tem sido relatada em muitos estudos após exposição de peixes a fungicidas, formulação comercial de glifosato, PAHs, PCBs, organoclorados (OCPs) e PCDDs (ALMLI *et al.*, 2003; BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005; YING *et al.*, 2007; LU; WANG; ZHU, 2008; CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009), mas a maioria dos estudos não mostram nenhuma alteração significativa. Por outro lado, redução significativa da atividade da GST também foi observada em peixes expostos a PCDDs, pesticidas ou PAHs, e em algumas espécies de peixes em ambientes poluídos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

### 2.6.3 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

A maioria do oxigênio molecular consumido pelos animais é reduzido a água acoplado à oxidação de alimento e produção de energia. A redução parcial resulta na formação do que tem sido denominado espécies reativas de oxigênio (EROs) ou oxirradicais, e compreendem espécies radicais ou não radicais. Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. As formas de EROs incluem radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil (OH), radical peroxil ( $RO_2$ ), radical alcoxil (RO) e radical hidroperoxil ( $HO_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ , espécie reativa de nitrogênio) (HWANG; KIM, 2007; NORDBERG; ARNÉR, 2001; LIVINGSTONE, 2001).

A formação de EROs ocorre a partir de diversas fontes e processos endógenos, incluindo certas enzimas, auto-oxidação, transporte de elétrons da membrana nuclear (MYERS, 1997). São continuamente produzidos em animais, e podem reagir com a maioria das biomoléculas e danificar lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (HWANG; KIM, 2007; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Entretanto, alguns papéis fisiológicos benéficos das EROs tem sido descritos em diferentes áreas, incluindo sinalização intracelular e regulação do estado redox (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A taxa de produção de EROs pode elevar-se na presença de diversos xenobióticos naturais e produzidos pelo homem, como contaminantes ambientais (MASON, 1997; LIVINGSTONE, 2001). Numerosos mecanismos de defesa celular existem para prevenir danos causados por EROs, mas um desequilíbrio na produção dessas moléculas e os sistemas antioxidantes podem levar a uma situação denominada estresse oxidativo (HWANG; KIM, 2007).

Os sistemas antioxidantes examinados em organismos aquáticos compreendem (LIEBLER; REED, 1997; LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS *et al.*, 2006):

- a) hidrossolúveis: ácido ascórbico (vitamina C), carotenos, glutathiona reduzida (GSH);
- b) lipossolúveis: retinol (vitamina A),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E);
- c) enzimas antioxidantes específicas: superóxido-dismutase (SOD) catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPX), etc.

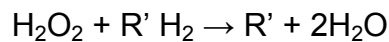
Diversas moléculas podem alterar o balanço pró-oxidantes/antioxidantes, tornando o organismo suscetível ao estresse oxidativo (MONTSERAT *et al.*, 2007). As medidas em sistemas biológicos expostos a poluentes, geralmente detectam decréscimo nos níveis de enzimas antioxidantes, mas alguns aumentos podem ocorrer sob certas condições (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

### 2.6.3.1 Catalases (CAT)

As catalases (CAT) são enzimas contendo um grupamento heme que localizam-se principalmente nos peroxissomos de células eucarióticas, onde facilitam a eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela seguinte reação (LIEBLER; REED, 1997; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003):



As catalases também atuam na detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada de peróxido de hidrogênio:



Um dos papéis antioxidantes da catalase é reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via reação de Fenton, catalizada por íons de cobre e ferro (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Uma extensa gama de xenobióticos, incluindo drogas hipolipemicas, herbicidas, inseticidas, lubrificantes, etc, são conhecidos como indutores da proliferação de peroxissomos no fígado de mamíferos. Entretanto, a proliferação de peroxissomos pode mostrar diferentes efeitos sobre cada enzima encontrada nessa organela, podendo suas atividades estar ou não elevadas (FAHIMI; CAJARAVILLE, 1995).

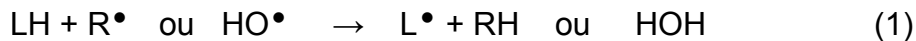
Aumentos na atividade da CAT hepática foram observados em alguns experimentos com peixes expostos a PCBs, PAHs, paraquat, benzopireno, ciprofribato e muitos estudos a campo, mas a maioria dos estudos laboratoriais não puderam demonstrar nenhuma alteração significativa (FAHIMI; CAJARAVILLE, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; YING *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Uma redução significativa da atividade da CAT foi observada em alguns

estudos laboratoriais após exposição a PAH, dinitro-ortocresol (DNOC), cádmio ou aminotriazol (BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

### 2.6.3.2 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. A peroxidação lipídica é iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metil (-CH<sub>2</sub>-) de um ácido graxo polinsaturado. Oxirradicais, particularmente ·OH, podem realizar essa abstração (SEVANI; MCLEOD, 1997; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Início da peroxidação lipídica:



LH = lipídeo polinsaturado

Propagação da lipoperoxidação:



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 LOOH resultante pode facilmente se decompor em espécies reativas, sendo muitos desses agentes tóxicos e mutagênicos. As membranas lipídicas peroxidadas tornam-se rígidas e perdem sua permeabilidade e integridade (SEVANI; MCLEOD, 1997; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

A lipoperoxidação tem sido utilizada com sucesso como uma medida de estresse oxidativo induzido por xenobióticos, em espécies expostas *in vivo* a uma variedade de substâncias químicas como metais (ferro, cádmio, mercúrio e cobre), paraquat, malation, deltametrina e glifosato (KELLY *et al.*, 1998; SAYEED *et al.*,

2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006; GLUSCZAK *et al.*, 2007; HUCULECI *et al.*, 2008).

## 2.7 BIOMARCADOR GENÉTICO

Genotóxicos produzem modificações químicas ou físicas do DNA, comumente medidas como adutos de DNA ou quebras de DNA, respectivamente (NACCI; CAYULAB; JACKIM, 1996). A exposição de um organismo a substâncias genotóxicas pode induzir uma cascata de eventos. Inicialmente pode ocorrer uma alteração estrutural do DNA, e conseqüentemente, o processamento e expressão do dano do DNA através de produtos modificados. Dessa maneira, pode-se desencadear conseqüências biológicas em células, órgãos, organismo e finalmente em nível de comunidade e população (LEE; STEINERT, 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

Exposição de organismos aquáticos a substâncias e processos genotóxicos, podem produzir efeitos como câncer, teratogênese e embriotoxicidade (NACCI; CAYULAB; JACKIM, 1996; VALKO *et al.*, 2006). O dano de DNA é constantemente induzido e reparado em animais, permitindo um equilíbrio. Assim, a observação de danos genéticos indica que tal equilíbrio foi alterado (VOCK *et al.*, 1998 citado por OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Diversas substâncias foram relacionadas a danos em DNA de organismos aquáticos, tecidos isolados ou tipos celulares, podendo ser agrupados em quatro classes (LEE; STEINERT, 2003):

- 1) que agem diretamente no DNA
- 2) cujos metabólitos causam danos no DNA
- 3) que causam produção de EROs que podem danificar o DNA.
- 4) que inibem a síntese e reparo do DNA.

Muitas substâncias como PCBs, PAHs, pentaclorfenol, deltametrina, monocrotofos, atrazin e a formulação comercial de glifosato, tem sido relacionadas com genotoxicidade em animais aquáticos (PEITL JR; SAKAMOTO-HOJO; CÓLUS, 1996; LEE; STEINERT, 2003; ANSARI *et al.*, 2008; POLETTA *et al.*, 2008).

O ensaio cometa, também conhecido como SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, pois se mostrou rápido e sensível para detectar quebras de DNA e locais lábeis por álcalis (LEE; STEINERT, 2003). O teste de cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação (GONTIJO; TICE, 2003).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os fragmentos maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então uma figura semelhante a um cometa.

## 2.8 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Biomarcadores morfológicos/histopatológicos são lesões que sinalizam efeitos de exposições, anteriores ou em andamento, a um ou mais agentes tóxicos. (HUGGETT *et al.*, 1992).

Mudanças teciduais agudas são vistas quando os níveis de contaminantes são suficientemente altos. Quando a concentração do agente tóxico é suficiente para gerar apenas injúria celular, mas não a morte, mudanças subletais (adaptativas) podem ser observadas nas células afetadas – é o caso das exposições crônicas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A presença de parasitos pode representar um sinal de estresse ambiental, e alguns autores sugerem que uma maior incidência de parasitos pode estar relacionada com um decréscimo na resistência imunológica dos animais (AKAISHI, 2003; VALDEZ-DOMINGOS, 2003; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005;).

A ocorrência de neoplasias em animais de vida livre é um fenômeno bem conhecido que tem sido freqüentemente usado como indicador de carcinógenos no meio ambiente em programas de biomonitoramento (WESTERN *et al.*, 2002).

Em peixes, os órgãos mais comumente estudados neste tipo de abordagem são brânquias, pele, fígado e rim anterior (BERNET *et al.*, 1999).

A pele e brânquias são superfícies que estão em contato direto e permanente com contaminantes. As brânquias são extremamente importantes na respiração, osmoregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de nitrogênio (HEATH, 1995 citado por SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Algumas lesões em brânquias, dentre elas a fusão das lamelas e aneurismas, podem ser interpretadas como um resultado de efeitos agudos de xenobióticos (ZODROW; STEGEMAN; TANGUAY, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Sendo o fígado o principal órgão de metabolismo de xenobióticos, e capaz de acumular diversas substâncias, seu estudo histopatológico é útil como biomarcador. Diversos estudos em peixes mostram a ocorrência de lesões hepáticas como necrose após exposição crônica a contaminantes. Também degeneração vacuolar, atrofia, depósitos, hemorragia, alterações nucleares têm sido relatadas neste tecido (BERNET *et al.*, 1999; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2008; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

A infiltração leucocitária representa um sinal de processo inflamatório, sendo associado a múltiplas causas (BERNET *et al.*, 1999). Centros de melanomacrófagos (CMM), também conhecidos como agregados de macrófagos, são grupos de células pigmentadas (melanina, lipofuscina ou hemosiderina são os pigmentos mais comuns) encontradas em tecidos de vertebrados heterotérmicos. Muitos autores sugerem que a análise histopatológica de CMM pode ser indicador sensível da saúde dos peixes ou condições ambientais estressantes (CAMARGO; MARTINEZ, 2007; LEKNES, 2007; HINTON *et al.*, 2008). O papel dos CMM no fígado ainda não está bem elucidado, mas uma hipótese é que a melanina dos macrófagos seja para neutralizar os radicais livres liberados como resultado do catabolismo de ácidos graxos derivados da fagocitose de membranas celulares a baixas temperaturas. Outra sugestão é que a melanina deve ser importante na produção de compostos bactericidas, especialmente peróxido de hidrogênio. A lipofuscina parece envolver peroxidação de lipídios poliinsaturados de membranas celulares. O aumento do conteúdo de hemosiderina (derivada do catabolismo da hemoglobina) deve provir do aumento do catabolismo de eritrócitos danificados ou do aumento da retenção de ferro pelos melanomacrófagos como um mecanismo de proteção (AGIUS; ROBERTS, 2003; HINTON *et al.*, 2008).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE MATERIAL

Foram realizadas amostragens de peixes e água do Reservatório Alagados nos dias 7 de novembro de 2007 (primavera) , 21 de fevereiro (verão) e 20 de maio (outono) de 2008. O localização dos pontos de coleta no reservatório (P1 e P2) são mostrados na Figura 4. Um grupo de peixes foi sacrificado no mesmo dia da amostragem de água e no local (grupos denominados “Local”) e outro grupo (grupos denominados “Depuração”) foi transportado, em caixas com água do reservatório e aeração constante, ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR. 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. 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 e terceiro arco branquial esquerdo para histopatologia;
- fígado, cérebro e músculo para análise de biomarcadores bioquímicos;
- músculo para análise química de PST;
- sangue para realização do ensaio cometa.

As coletas de peixes foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e o documento pode ser conferido através do código de autenticação 94354735, por meio da página do IBAMA/SISBIO na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).



FIGURA 4 – MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. Em destaque mapa do Reservatório Alagados, com os pontos de coleta de água (P1 e P2) e peixes (P2).

### 3.2 ANÁLISE DA ÁGUA

Em todas as datas o pH, temperatura e oxigênio dissolvido da água na zona eufótica (50 cm abaixo da superfície da água) do ponto mais profundo do Reservatório (P1) e à margem do Reservatório (P2, local de coleta dos peixes) foram medidos através de pHâmetro e oxímetro portáteis. As medidas foram sempre realizadas por volta das 11 horas da manhã.

#### 3.2.1 Análise quali e quantitativa do fitoplâncton

Amostras de 500 ml de água foram coletadas na zona eufótica de P1 e P2 por volta das 11h, em todas as datas de coleta. As amostras de água foram preservadas com adição de solução de lugol. As análises do fitoplâncton foram realizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), segundo método de Utermöhl

(1958).

### 3.3 ANÁLISE DE PST EM ÁGUA E MÚSCULO

A Portaria MS 518/2004 recomenda a análise da concentração de PST pelos métodos propostos pela OMS. De acordo com a OMS, o método de Oshima (1995) é o mais utilizado (CHORUS; BARTRAM,1999). Os valores de concentração de cada tipo de PST determinados nas análises cromatográficas devem ser convertidos em equivalente de saxitoxina (equiv STX). Esta conversão é feita comparando-se a toxicidade de cada variante com a toxicidade da saxitoxina. Os valores de toxicidade foram obtidos através de bioensaio com camundongos utilizando-se as toxinas purificadas (HALL *et al.*,1990). A Tabela 1 apresenta os valores de toxicidade relativa para 14 tipos de PST.

TABELA 1 – VALORES DE TOXICIDADE RELATIVA DE ALGUMAS PST

TOXINA	TOXICIDADE RELATIVA (T <sub>i</sub> )
STX	1
GTX1	0,9940
neoSTX	0,7261
GTX4	0,6379
GTX3	0,5131
dcGTX3	0,3766
GTX2	0,3592
dcGTX2	0,1538
C2	0,0963
GTX6	0,0644
GTX5	0,0644
C4	0,0576
C3	0,0133
C1	0,0060

FONTE: HALL *et al.* (1990)

A concentração total expressa em  $\mu\text{g}$  de equiv STX/L de água ou /100g de músculo foi obtida através da seguinte equação:

$$\text{equiv. STX} = \sum C_i \times T_i$$

Onde:  $C_i$  = Concentração da toxina em microgramas por litro (ng/L) ou por 100g ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

$T_i$  = Toxicidade relativa da toxina

Amostras de água foram coletadas por volta das 11 horas na zona eufótica de P1 e P2 em todas as datas. As amostras foram mantidas sob refrigeração até chegada ao laboratório, quando então foram liofilizadas. O liofilizado de 500 ml de água foi resuspenso em ácido acético 0,5M e congelado até a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As amostras foram filtradas com filtros de celulose antes da análise por HPLC.

Para obtenção do músculo dos peixes para análise de PST, as escamas foram previamente retiradas e a pele lavada com água destilada. Após este procedimento a pele foi retirada e amostras de músculo axial dos peixes foram congeladas envoltas em papel alumínio até o momento da extração. Para extração, pools de aproximadamente 10g de músculo foram homogeneizados em 15 ml de HCl 0,1N. Os homogeneizados foram centrifugados a  $10.000 \times g$ , a  $19^\circ\text{C}$  por 10 minutos; seu sobrenadante foi filtrado com filtros de celulose e mantido sob refrigeração para posterior análise.

A análise de dois grupos de PST (STX e GTX) na água e no músculo foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com derivatização pós-coluna, segundo método de Oshima (1995). 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.

Foi utilizado 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. Utilizou-se uma coluna de sílica gel C18, de fase reversa (LiChroCART® 125-4) e duas fases móveis separadas, com fluxo de 0,8ml/min, para detectar diferentes grupos de PST: 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 acetonitrila (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 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

#### 3.4.1 Preparo das amostras para 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 50 mg 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 (fração S9) 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 tubos eppendorfs de 2 ml e centrifugados por 20 min a 4°C a 10.000 x g. Amostras de sobrenadante (fração S9) foram alíquotadas em tubos eppendorfs e armazenadas a -70° C para posterior realização das análises bioquímicas de lipoperoxidação, catalase, etoxiresorufina-O-deetilase, glutathione S-transferase e concentração protéica.

### 3.4.2 Atividade da 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 da fração S9 de músculo ou cérebro foram diluídas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 na proporção de 1:20 v/v, e pipetadas em 4 réplicas de 50 $\mu$ l na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 200 $\mu$ l de DTNB preparado a 0,75 mM em tampão fosfato 0,1M pH 7,5; e 50 $\mu$ l de iodeto de acetiltiocolina 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.

### 3.4.3 Atividade da EROD

A atividade da EROD foi determinada por espectrofluorimetria direta da resorufina, resultado da metabolização da 7-etoxiresorufina pela EROD (BURKE; MAYER, 1971; EGGENS; GALGANI, 1992). A leitura foi realizada durante 10 min, com comprimento de onda de excitação a 530nm e emissão a 590nm. Para a análise, 2 réplicas de 50 $\mu$ l da fração S9 de fígado foram incubadas por 5 min com 420 $\mu$ l de 7-etoxiresorufina (2,6 $\mu$ M em solução tampão TRIS 0,1M - NaCl 0,1M, pH 7,5). Na sequência, foram adicionados 30 $\mu$ l 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.

#### 3.4.4 Atividade da GST

O método baseia-se no trabalho proposto por Keen, Habig e Jakoby (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 absorbância.

Alíquotas de fração S9 do fígado foram diluídas (1:30 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 µmol de CDNB conjugado/min/mg proteína.

#### 3.4.5 Atividade da 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 de fração S9 do fígado foram diluídas (1:5 v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetadas em 3 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.

### 3.4.6 LPO

A lipoperoxidação é dada indiretamente pela concentração de hidroperóxido. O método é baseado na oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo  $\text{Fe}^{+3}$  - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG; HUNT; WOLF, 1992).

Alíquotas da fração S9 de fígado foram diluídas (1:2 v/v) em metanol e a seguir centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 10.000xg. O 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),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (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.

### 3.4.7 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 na fração S9 dos tecidos (cérebro, músculo e fígado) foi utilizado o teste 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. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm.

## 3.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS - HISTOPATOLOGIA



Foram coletados o terceiro arco branquial esquerdo e um fragmento de fígado de cada peixe. As amostras de tecido foram preservadas em solução fixadora ALFAC (85 ml de etanol 80%, 10 ml de formol e 5 ml de ácido acético glacial) durante 16 horas. A seguir, as amostras foram colocadas em um frasco com etanol 70%, e estocados em geladeira para posterior conclusão do preparo do material.

Os tecidos foram desidratados em uma bateria de etanol em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizados em Xilol para posterior inclusão e emblocagem em Paraplast (Sigma®). Realizou-se cortes dos blocos, na espessura de 5 µm, em Micrótomo LEICA RM 2145.

Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina, para serem analisados por microscopia ótica. As alterações histopatológicas foram avaliadas segundo protocolo proposto por Bernet *et al.* (1999). A cada lesão foi atribuído um fator de importância (Tabelas 2 e 3), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores para as alterações observadas em cada grupo, sendo: (0) Inalterado, (1) Ocorrência baixa (2) Ocorrência média, (4) Ocorrência moderada e (6) Ocorrência severa (lesão difusa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde : pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

TABELA 2 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM FÍGADO COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA

PADRÃO DE REAÇÃO	ALTERAÇÃO	FATOR DE IMPORTÂNCIA
Alterações regressivas	Depósitos citoplasmáticos	1
	Necrose	3
	Alterações de citoplasma (vacuolização)	1
	Diferenciação tecidual	1
Inflamação	Infiltração leucocitária	2
Neoplasia	Lesão pré-neoplásica e neoplasia benigna	2

FONTE: BERNET *et al.* (1999)

TABELA 3 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM BRÂNQUIA COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA

PADRÃO DE REAÇÃO	ALTERAÇÃO	FATOR DE IMPORTÂNCIA
Alterações progressivas	Hiperplasia	2
Inflamação	Infiltração leucocitária	2
Distúrbio circulatório	aneurisma	1
Neoplasia	Lesões pré-neoplásicas	2

FONTE: BERNET *et al.* (1999)

### 3.5.1 Análise dos centros de melano-macrófagos e macrófagos livres

Os centros de melano-macrófagos e macrófagos livres foram contados através de um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de 1 mm<sup>2</sup>, com 100 subdivisões de 0,01 mm<sup>2</sup> cada. Foram analisados, em objetiva de 10x, 15 campos escolhidos aleatoriamente em lâmina de fígado corada em Hematoxilina-Eosina. Havendo menos de 5 células pigmentadas, contou-se o número de melano-macrófagos livres e havendo 5 ou mais células pigmentadas

considerou-se um centro de melano-macrófagos. Os resultados da contagem foram expressos em melano-macrófagos ou centro de melano-macrófagos por  $\text{mm}^2$ .

### 3.6 BIOMARCADOR GENÉTICO - ENSAIO COMETA

O método seguido foi o proposto por Singh *et al.* (1988). Uma amostra de sangue de peixes foi coletada com o auxílio de um tubo de microhematócrito heparinizado e adicionado 1ml de soro fetal bovino. O material foi refrigerado no escuro por 24h. Um volume de 20  $\mu\text{l}$  desta solução foi misturado com 120  $\mu\text{l}$  de agarose de baixo ponto de fusão. Desta mistura, 15  $\mu\text{l}$  foram depositados sobre uma lâmina previamente preparada com uma camada de agarose normal e então cobriu-se a lâmina com lamínula. Após 10 minutos em geladeira a lamínula foi retirada cuidadosamente e as lâminas foram colocadas em uma cubeta com solução de lise e mantidas em geladeira e no escuro por 7 dias. Após este tempo as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e cobertas com solução para eletroforese ( $\text{pH}>13$ ) por 30 min antes de ser iniciada a eletroforese.

A eletroforese foi realizada em 25 V com 300 mA por 25 min a uma temperatura de 4 °C. Concluída a eletroforese, colocou-se sobre as lâminas tampão de neutralização (0,4M Tris,  $\text{pH}$  7,5), durante 5 min, 3 vezes. As lâminas secaram em temperatura ambiente e depois foram fixadas em etanol 95% por 5 minutos. Nesta condição as lâminas puderam ser estocadas em geladeira até o momento da análise, sendo coradas com 20 $\mu\text{l}$  de Brometo de Etídeo (10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) e cobertas com lamínula. Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram observadas em aumento de 400x usando microscópio de epifluorescência Leica DMLS2 equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo/lâmina, sendo o dano em cada nucleóide classificado de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética: 0 – sem dano; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano grande; 4 – dano máximo. Multiplicando-se o número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe, calculou-se um escore de dano genético para cada indivíduo (KOBAYASHI *et al.*, 1995).

### 3.7 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 contagem de centros de melanomacrófagos e o comprimento total dos peixes. A correlação entre a atividade de AchE muscular e cerebral e o comprimento total dos peixes foi realizada através da análise de correlação de Pearson. Os dados do ensaio Cometa, os índices de lesão histopatológica e as concentrações de PST em músculo foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. 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

Os resultados das medidas de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água do reservatório são apresentados na Tabela 4. Amostras de água para análise de fitoplâncton foram coletadas próximo à barragem (P1) e à margem do reservatório (P2). Optou-se por apresentar apenas os resultados da análise de fitoplâncton de P1, por sua maior representatividade, visto que não houve diferença na contagem de cianobactérias nem de fitoplâncton total; apenas observou-se maior diversidade de organismos no ponto de maior profundidade do reservatório (P1), como era de se esperar. Os resultados das análises de fitoplâncton em Novembro de 2007 (primavera), Fevereiro (verão) e Maio (outono) de 2008 são mostrados nas Tabelas 5, 6 e 7 respectivamente. A porcentagem de cianobactérias em relação à contagem total de fitoplâncton foi de cerca 40% na primavera e cerca 88% no verão e outono.

Foi detectada a presença somente de goniautoxinas (GTX) em todas as amostras de água analisadas, sendo os resultados apresentados na Tabela 8. A concentração de PST na água (média de P1 e P2) foi de 5,15 ng de equiv STX/L na primavera, de 43,84 ng de equiv STX/L no verão e de 50,78 ng de equiv STX/L no outono.

TABELA 4 – TEMPERATURA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS TRÊS ÉPOCAS DE ESTUDO (MÉDIA DE P1 E P2)

	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO
Temperatura da água (°C)	23,5	26,9	16,8
Oxigênio dissolvido (mg/l)	8,5	9,5	6,2
pH	8,2	8,6	7,4

TABELA 5 – ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA E AFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NA PRIMAVERA DE 2007

ORGANISMO	CÉLS/ML	
	Zona eufótica	Zona afótica
<b>CIANO BACTERIAS</b>		
<i>Aphanizomenom sp.</i>		2.567
Chroococcales não identificado	151	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	27.180	42582
<i>Leptolyngbya spp.</i>	906	1.359
<b>SUBTOTAL</b>	<b>28.237</b>	<b>46.508</b>
<i>Closteriopsis spp.</i>	151	
<i>Desmodesmus spp.</i>	302	
<i>Desmodesmus acuminatus</i>		302
<i>Scenedesmus spp.</i>	302	
<i>Treubaria spp.</i>	151	
<i>Mougeotia spp.</i>	28.690	25.066
<i>Aulacoseira ambigua</i>	906	1.208
<i>Aulacoseira granulata</i>	2.869	1.661
<i>Fragillaria spp.</i>	755	
<i>Synedra spp.</i>	151	151
<i>Urozolenia eriensis</i>	302	
<i>Trachelomonas spp.</i>	453	906
<b>TOTAL</b>	<b>63.269</b>	<b>75.802</b>

TABELA 6 – ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO VERÃO DE 2008

ORGANISMO	CÉLS/ML
<b>CIANO BACTÉRIAS</b>	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	120.800
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	5.436
<i>Planktolyngbya spp.</i>	9.060
<b>SUBTOTAL</b>	<b>135.296</b>
<i>Aulacoseira granulata</i>	453
<i>Fragillaria spp.</i>	151
<i>Staurastrum spp.</i>	302
<i>Mougeotia spp.</i>	2.718
<i>Monoraphidium minutum</i>	151
<i>Schroederia spp.</i>	151
Fitoflagelado não identificado	151
<i>Clamydomonas spp.</i>	151
<i>Rhodomonas lacustris</i>	151
<b>TOTAL</b>	<b>139.675</b>

TABELA 7 – ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON NA ZONA EUFÓTICA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO OUTONO DE 2008

ORGANISMO	CÉLS/ML
<b>CIANOBACTÉRIAS</b>	
<i>Cylindrospermopsis raciborkii</i>	113.627
<i>Planktolyngbya spp.</i>	3.171
<b>SUBTOTAL</b>	<b>116.798</b>
<i>Aulacoseira ambigua</i>	2.718
<i>Synedra sp.</i>	151
<i>Urosolenia erensis</i>	151
<i>Fragillaria spp.</i>	604
<i>Closterium spp.</i>	151
<i>Cosmarium spp.</i>	151
<i>Mougeotia spp.</i>	3.473
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	151
<i>Scenedesmus sp.</i>	604
Fitoflagelado não identificado	151
<i>Clamydomonas spp.</i>	302
<i>Peridinium sp.</i>	151
<b>TOTAL</b>	<b>125.556</b>

TABELA 8 – PST ENCONTRADAS NA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS, NAS 3 DATAS DE COLETA, EM P1 E P2

	equiv STX (ng/L)	Concentração total de PST (ng/L)	PORCENTAGEM NO TOTAL DE PST (% ng/L)			
			GTX 2	GTX3	GTX4	GTX5
Primavera						
P1	4,60	38,25	13,69	7,68	<LD <sup>a</sup>	78,61
P2	5,69	9,71	58,7	41,29	<LD <sup>a</sup>	<LD <sup>a</sup>
Verão						
P1	48,81	82,76	27,45	12,04	56,74	3,75
P2	38,87	63,50	27,85	13,32	58,81	<LD <sup>a</sup>
Outono						
P1	18,11	37,39	54,15	27,89	15,19	2,75
P2	83,44	117,21	<LD <sup>a</sup>	5,40	93,17	1,41

<sup>a</sup> LD = limite de detecção

#### 4.2 ANÁLISE DE PST EM MÚSCULO

Foram detectadas apenas goniautoxinas (GTX) no músculo dos peixes das três épocas de coleta (TABELA 9). GTX5 foi o análogo de STX predominante, representando cerca de 100% da concentração total de PST em todos os grupos. Outros análogos (GTX 2, 3 e 4) também foram detectados mas em concentrações muito baixas. O grupo depuração de outono não pôde ser analisado.

A ausência das demais PST 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.

Na análise estatística, não houve diferença significativa na concentração de PST entre os grupos Local dos períodos estudados. Apenas na primavera observou-se diferença significativa na concentração de PST entre o grupo Local e Depuração, sendo que o segundo mostrou uma concentração cerca de 5 vezes maior do que o primeiro.

TABELA 9 – PST EM MÚSCULO DE *Geophagus brasiliensis* DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS TRÊS DATAS DE COLETA: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO

	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO
	Local (7 pools, n=24)	Depuração (4 pools, n=24)	Local (5 pools, n=25)	Depuração (4 pools, n=20)	Local (2 pools, n=15)
equiv STX ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	1,22 $\pm$ 0,87	6,59 $\pm$ 0,79	1,97 $\pm$ 0,93	0,78 $\pm$ 0,11	1,54 $\pm$ 0,05
Concentração total de PST ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	2,21 $\pm$ 1,56	10,23 $\pm$ 1,23	3,06 $\pm$ 1,45	1,218 $\pm$ 0,17	2,40 $\pm$ 0,09
PST	GTX 3, 4 e 5	GTX 2, 3 e 5	GTX 3 e 5	GTX 3 e 5	GTX 3 e 5

#### 4.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A atividade da AchE no músculo dos peixes foi significativamente superior no grupo Local da verão com relação ao grupo Local das duas outras estações estudadas. Na primavera e verão, observou-se uma redução na atividade da AchE muscular após os 20 dias de depuração. No outono não houve diferença significativa entre os grupos Local e Depuração (FIGURA 5A).

A atividade da AchE cerebral não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Local das três datas de estudo. Na primavera, observou-se um aumento na atividade da AchE cerebral no grupo Depuração comparado ao grupo sacrificado no dia da coleta (grupo Local). Não houve diferença entre os grupos Local e Depuração das demais estações (FIGURA 5B).



Houve diferença estatisticamente significativa no comprimento dos peixes entre os grupos Local, sendo os peixes maiores na seguinte seqüência (média±erro padrão): primavera (14.05±0.67cm) > verão (11.93±0.29cm) > outono (9.92 ± 0.49cm). Não houve diferença estatisticamente significativa no tamanho dos peixes entre os grupos Local e respectivos grupos Depuração. No teste de correlação entre a atividade da AchE muscular e o comprimento total dos peixes, o único grupo que mostrou uma correlação negativa significativa foi o grupo Local da primavera ( $r=-0,6497$ ). Não houve correlação significativa entre a atividade da AchE cerebral e o comprimento total dos peixes em nenhum grupo.

A atividade da GST mostrou-se superior no grupo Local do verão com relação aos demais meses. Não houve diferença entre os grupos Local e Depuração dos três períodos de estudo (FIGURA 5C).

A atividade da EROD foi maior no grupo Local do outono com relação à primavera e verão. Na comparação entre grupos Local e Depuração, houve diferença apenas no outono, tendo a atividade se reduzido após os 20 dias em água limpa (FIGURA 5D).

A atividade da CAT não apresentou diferença entre os grupos Local das três datas de estudo. Na comparação entre os grupos Local e Depuração de cada período, apenas no verão observou-se diferença, sendo que a atividade elevou-se após os 20 dias em água limpa (FIGURA 5E).

A LPO foi menor no outono comparado ao verão, mas não houve diferença entre primavera e verão nem entre primavera e outono. Na comparação entre os grupos Local e Depuração, na primavera houve uma redução e no verão um aumento na LPO após os 20 dias em água limpa. No outono não houve diferença significativa entre o grupo Local e Depuração (FIGURA 5F).

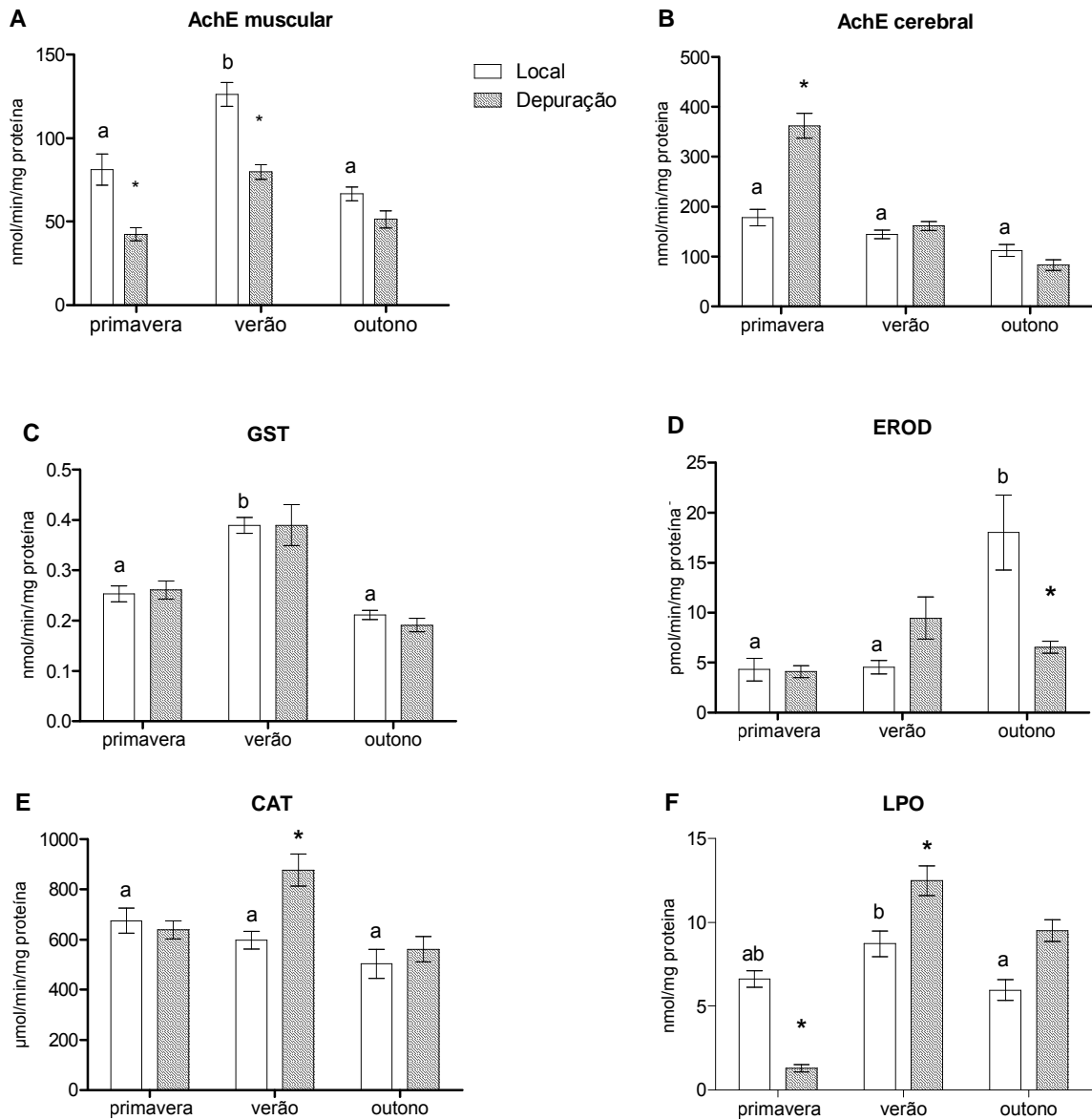


FIGURA 5 – BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Geophagus brasiliensis* DO RESERVATÓRIO ALAGADOS. Os resultados são expressos em Média±erro padrão. Diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre grupos Local. Asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre grupo Local e respectivo grupo Depuração. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. A - Atividade específica da AchE em músculo (nmol de tiocolina/min/mg de proteína). B - Atividade específica da AchE em cérebro (nmol de colina/min/mg de proteína). C - Atividade específica da GST no fígado (nmol de CDNB conjugado/min/mg de proteína). D - Atividade específica da EROD no fígado (pmol de resorufina/min/mg proteína). E - Atividade específica da CAT no fígado ( $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado/min/mg de proteína). F - LPO no fígado (nmol/mg de proteína).

#### 4.4 BIOMARCADOR GENÉTICO

No verão e no outono o escore de dano genético nos peixes do grupo Local foi significativamente maior do que no grupo Local da primavera, não havendo, entretanto, diferença entre os dois primeiros grupos. O período de depuração mostrou redução do escore de dano genético apenas nos peixes coletados no verão. Não houve diferença significativa entre os grupos Local e Depuração da primavera e outono. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10. O gráfico dos escores de dano genético foi realizado com as médias e erro padrão para melhor visualização dos resultados (FIGURA 6).

TABELA 10 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS ESCORES DE DANO GENÉTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis* NOS TRÊS PERÍODOS DE ESTUDO: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO

	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO	
	Local	Depuração	Local	Depuração	Local	Depuração
n=	24	24	24	20	15	7
Escore mínimo	18,00	52,00	121,0	103,0	138,0	139,0
Escore máximo	233,0	166,0	270,0	184,0	251,0	213,0
Mediana	120,0	118,0	215,0	151,0	199,0	167,0
Percentil 25%	85,75	91,50	185,0	128,0	191,0	139,0
Percentil 75%	169,8	137,5	244,3	161,3	216,0	199,0
Média	124,9	113,6	211,0	146,7	198,7	171,6
Desvio Padrão	54,53	33,11	41,21	21,90	28,88	29,22
Erro Padrão	11,13	6,758	8,413	4,898	7,456	11,05

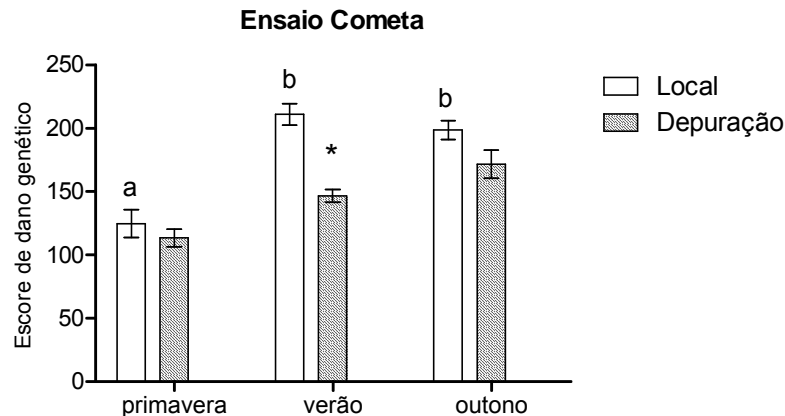


FIGURA 6 - ESCORES DE DANO GENÉTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis*. Os resultados são apresentados em Média± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos Local. Asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação dos grupos Depuração com respectivo grupo Local. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

#### 4.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Diversas alterações histológicas foram observadas nas brânquias e fígado dos peixes do Reservatório Alagados (FIGURAS 7 a 11), que contribuíram para um notável índice de lesão histopatológica em todos os grupos. Entretanto, não houve diferença significativa nos índices de lesão histológica de fígado e brânquias entre os grupos Local nem entre os grupos Local e Depuração de todas as épocas de estudo (FIGURA 12).

Hiperplasia do epitélio lamelar (parcial ou com fusão lamelar) foi a lesão de maior prevalência nas brânquias em todos os grupos. Lesões pré-neoplásicas foram observadas no grupo Depuração da primavera e Local e Depuração do verão. Diversos parasitos não identificados foram observados em todos os grupos. Infiltração leucocitária foi observada no grupo Local do verão. Nas brânquias do grupo Local da primavera e verão, foi observada a ocorrência de aneurisma e de aglomerados de células nucleadas, com citoplasma eosinófilo, ainda não identificadas.

No fígado, necrose e CMM foram as alterações de maior prevalência em todos os grupos. Resposta inflamatória e parasitos também foram observados em todos os grupos. Na primavera e verão observou-se diferenciação tecidual, vacuolização e depósitos citoplasmáticos amarronzados. Os mesmos depósitos foram observados no grupo Depuração do outono. No outono observou-se lesões pré-neoplásicas e neoplasia. A prevalência em cada grupo das lesões citadas são mostradas na Tabela 11.

A contagem de CMM foi maior no grupo Local da primavera com relação ao verão e outono. Não houve diferença significativa entre os grupos Local e Depuração de cada época de estudo (FIGURA 13).

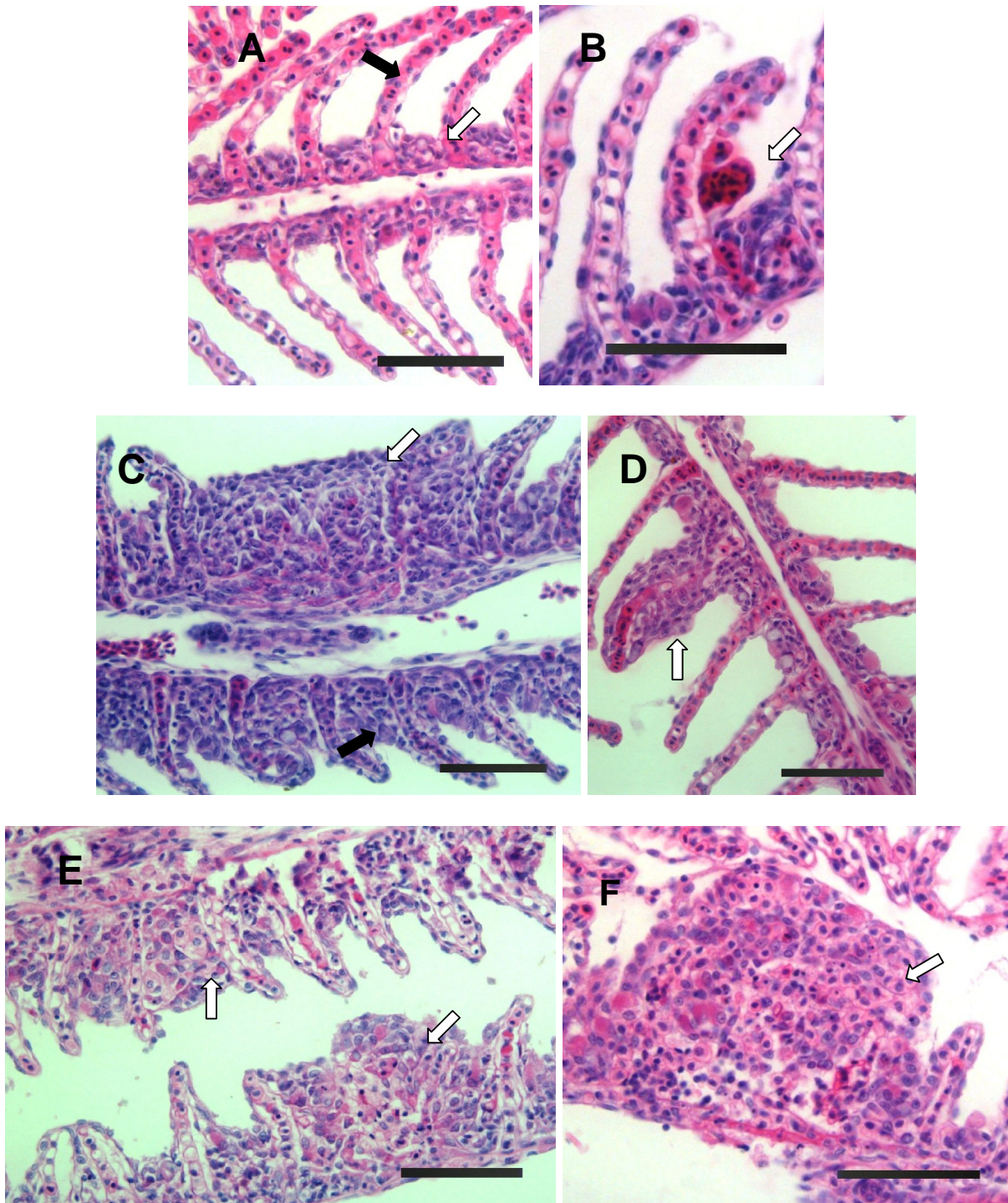


FIGURA 7 – CORTES HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIA DE *Geophagus brasiliensis*. A – Brânquia sem alterações, lamela primária (⇨) e lamela secundária (⇦). B - Aglomerado de células não identificadas (⇨). C - Hiperplasia de epitélio com fusão lamelar total (⇨) e parcial (⇦). D – Hiperplasia de epitélio em lamela secundária (⇨). D e E – Lesões pré-neoplásicas (⇨). Coloração H.E. Barra preta = 100µm.

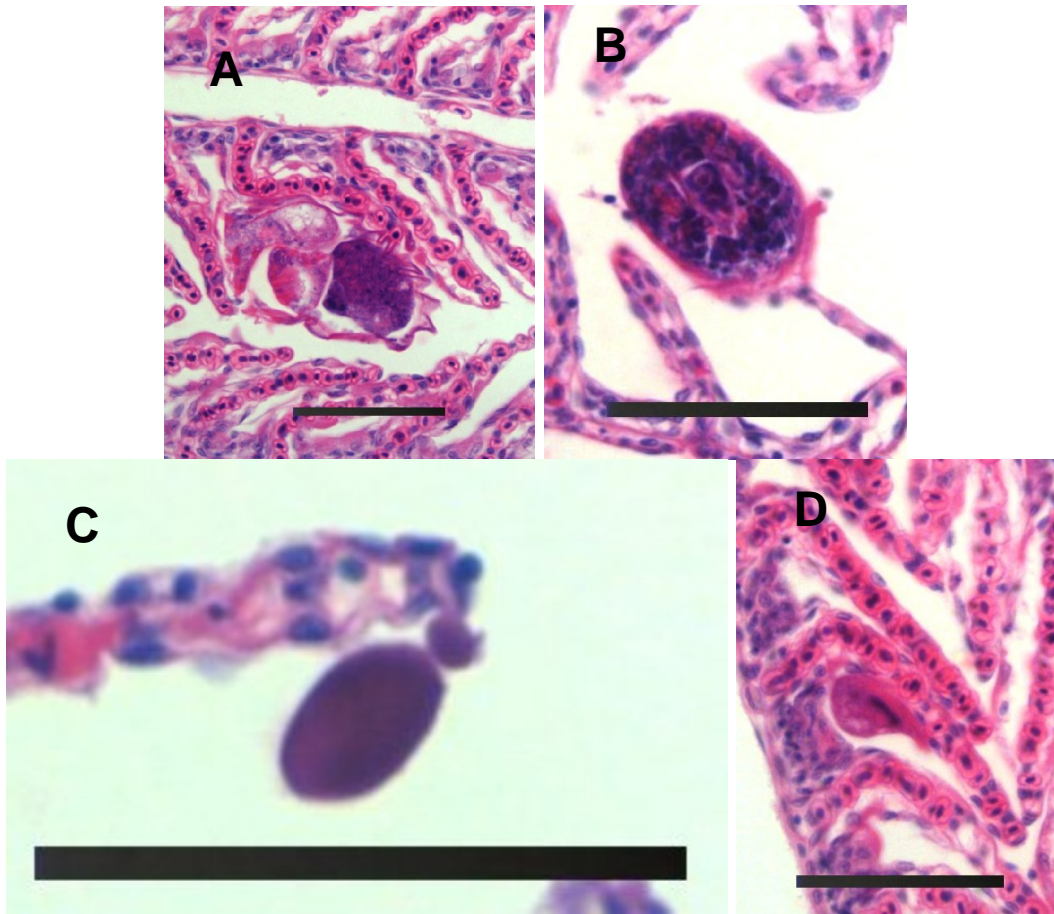


FIGURA 8 – CORTES HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIA DE *Geophagus brasiliensis*. A, B, C e D – Ectoparasitos. Coloração H.E. Barra preta = 100 $\mu$ m.



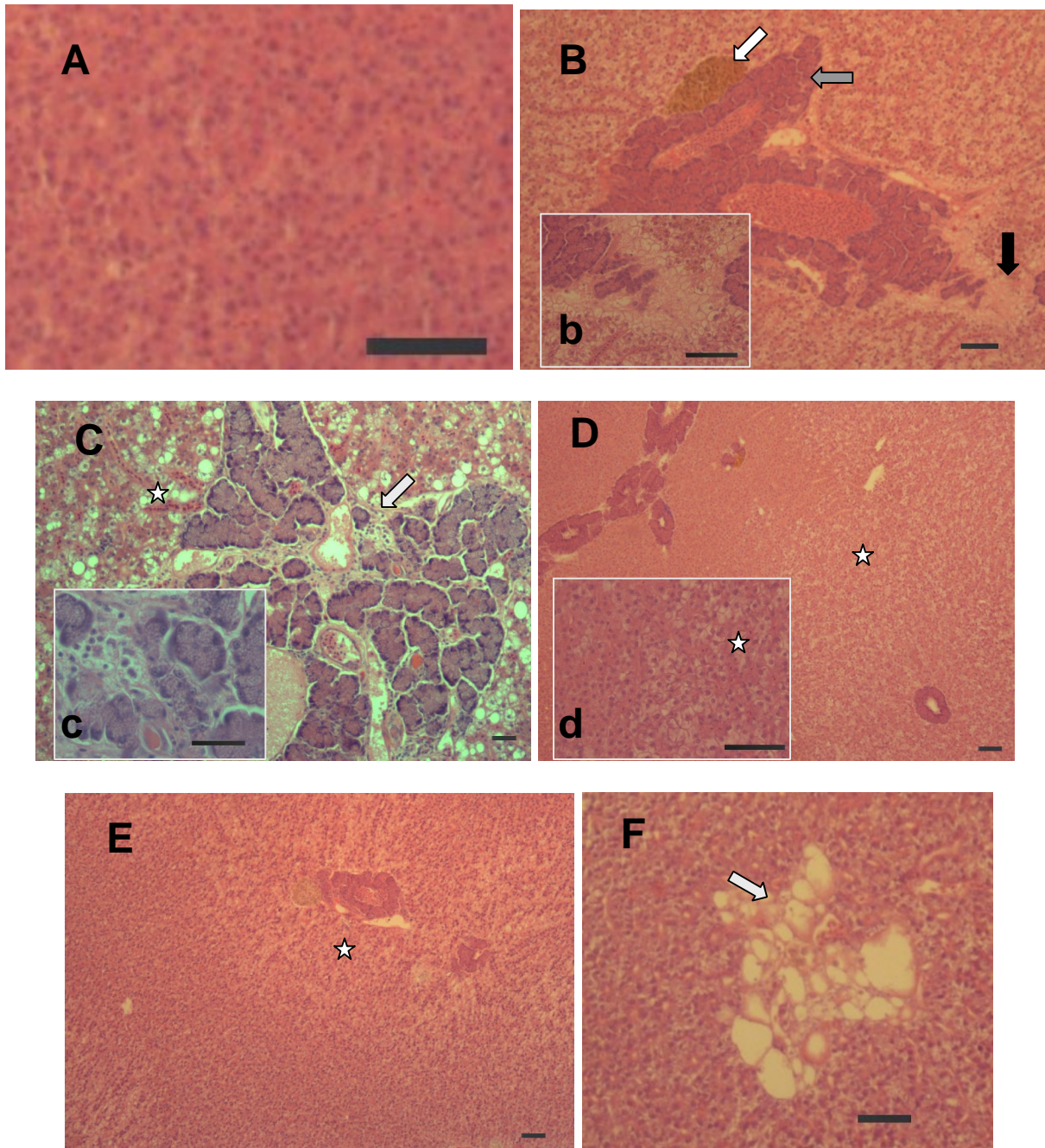


FIGURA 9 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis*. A - Fígado sem alteração. B – Tecido pancreático sem alteração (⇨), centro de melanomacrófagos (⇨), área de diferenciação tecidual (⇨) mostrada em detalhe em b. C - Vacuolização em hepatócitos (☆), diferenciação tecidual em tecido pandreático (⇨) mostrado em detalhe em c. D – Área com alteração de hepatócitos (☆) mostrada em detalhe em d. E - Área com alteração de hepatócitos (☆). F – Área de diferenciação tecidual (⇨). Coloração H.E. Barra preta = 100µm.



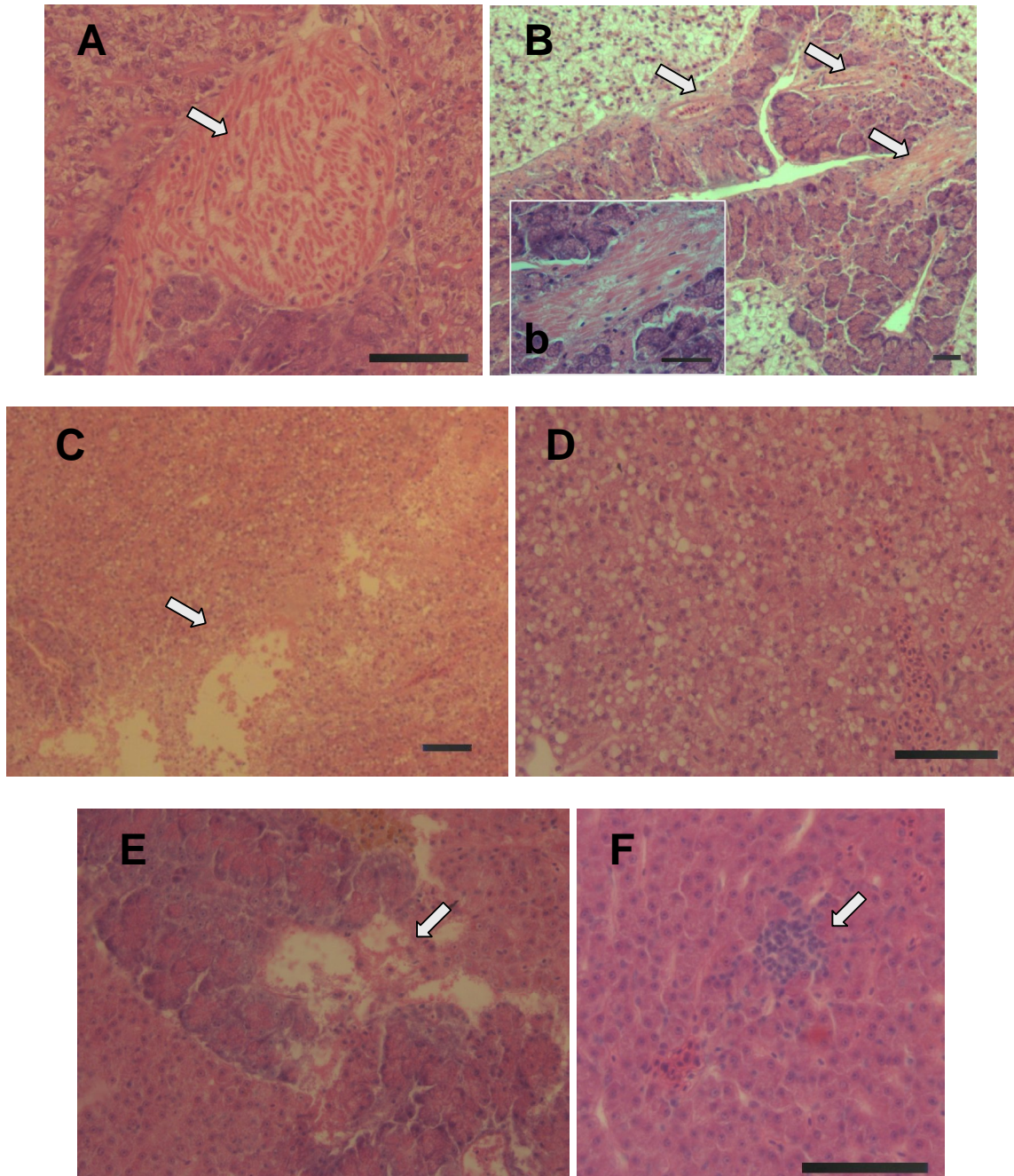


FIGURA 10 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis*. A – Área de diferenciação tecidual (⇒). B – Áreas de diferenciação tecidual (⇒), mostrada em detalhe em b. C – Área de necrose de hepatócitos (⇒). D – Vacuolização em hepatócitos. E – Área de necrose em tecido pancreático (⇒). F - Infiltração de leucócitos. Coloração H.E. Barra preta = 100 $\mu$ m.

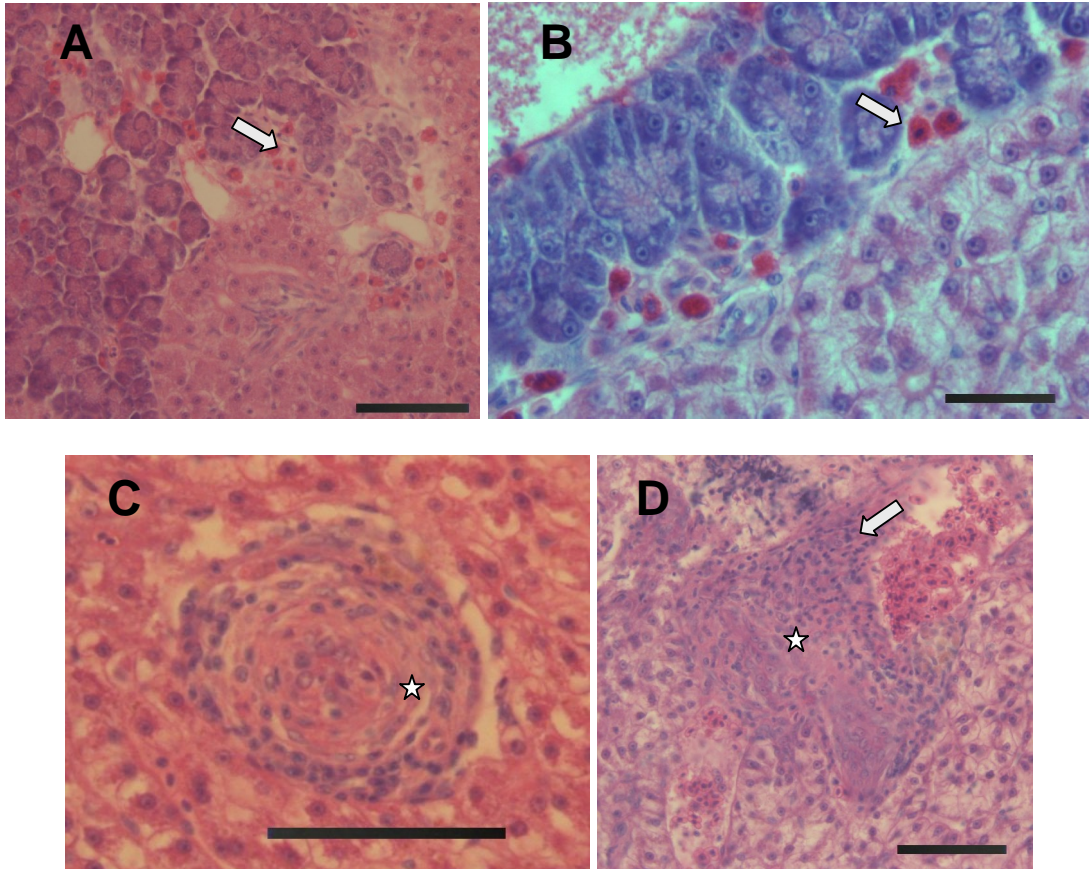


FIGURA 11 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis*. A – Parasitos unicelulares (coccídeos) (⇒). B – Células não identificadas (⇒). C – Neoplasia encapsulada (☆). D – Lesão pré-neoplásica (☆) com infiltração leucocitária (⇒). Coloração H.E. Barra preta = 100µm.

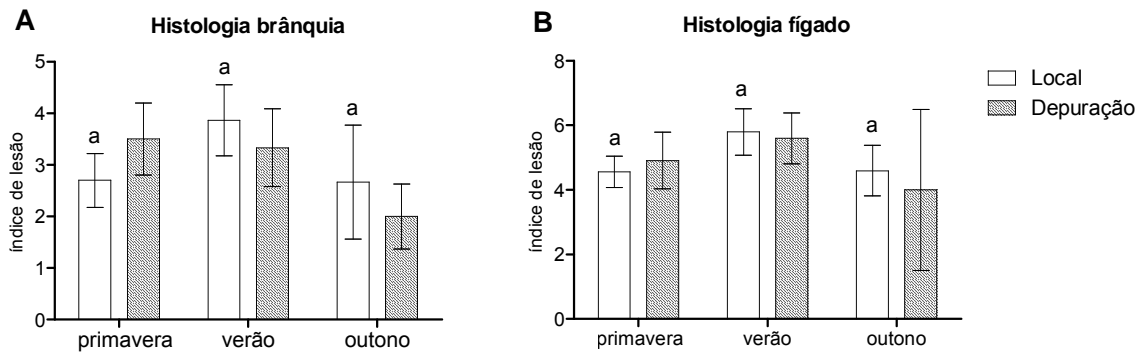


FIGURA 12 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE *Geophagus brasiliensis* DO RESERVATÓRIO ALAGADOS. Os resultados são apresentados em Média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na comparação entre os grupos Local. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. A - Índices de lesão em brânquias. B - Índices de lesão em fígado.

TABELA 11 – PREVALÊNCIA (%) DAS ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM FÍGADO E BRÂNQUIAS DE *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NOS TRÊS PERÍODOS DE ESTUDO: GRUPOS LOCAL E DEPURAÇÃO

	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO	
	Local	Depuração	Local	Depuração	Local	Depuração
<b>Lesões Fígado</b>	n=23	n=23	n=20	n=20	n=15	n=6
Necrose	69,56	73,91	80	65	73,33	50
Infiltração leucocitária	8,69	21,73	30	20	40	16,66
CMM	91,30	95,65	85,00	85	86,66	83,33
Vacuolização	4,34	0	5	10	0	0
Depósitos citoplasmáticos	60,86	34,78	35	50	0	33,33
Lesões pré neoplásicas e neoplasias	0	0	0	0	13,33	16,66
Parasitos	17,39	13,04	35	60	13,33	16,66
Diferenciação tecidual	30,43	8,69	10	15	0	0
<b>Lesões Brânquias</b>	n=20	n=18	n=22	n=12	n=9	n=5
Hiperplasia epitelial parcial	85	77,77	68,18	83,33	33,33	20
Hiperplasia epitelial com fusão lamelar	30	61,11	50	66,66	44,44	80
Lesões pré-neoplásicas	0	16,66	9,09	8,33	0	0
Aneurisma	10	0	4,54	0	0	0
Aglomerção de células não identificadas	35	0	13	0	0	0
Infiltração leucocitária	0	0	9,09	0	0	0
Parasitos	30	11,11	36,36	25	33,33	20

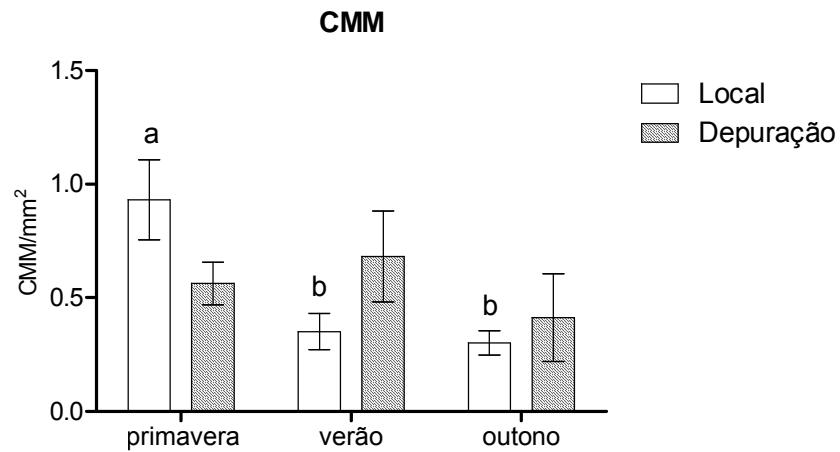


FIGURA 13 – CONTAGEM DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* DO RESERVATÓRIO ALAGADOS. Os resultados são apresentados em Média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos Local. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PST

A contagem de cianobactérias na água em novembro (primavera) de 2007, fevereiro (verão) e maio (outono) de 2008 estava acima do limite de 20.000 céls/ml, proposto pela OMS para águas de contato primário e estabelecido como limite aceitável no ponto de captação de água para consumo humano, pela Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde. No verão e outono *Cylindrospermopsis raciborskii* foi o organismo predominante durante as florações. Na primavera, entretanto, observou-se uma codominância de *C. raciborskii* com a alga verde *Mougeotia sp.*.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* foi feito por Palmer (1969, citado por TUCCI; SANT'ANNA, 2003) para o Lago Paranoá em Brasília, que na época identificou a população encontrada como *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. Em 1999, foi publicada a primeira evidência de cepas de *C. raciborskii* produtoras de PST 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 PST em amostras de água tornou-se de extrema importância, visto que em vários mananciais de abastecimento, desde a região nordeste até a região sul do país, florações de *C. raciborskii* têm sido registradas (LAGOS *et al.*, 1999; CHELLAPA; MEDEIROS COSTA, 2003; TUCCI; SANT'ANNA, 2003; YUNES *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2005; SPERLING; FERREIRA; GOMES, 2008).

*C. raciborskii* difere das demais cianobactérias por duas razões. Primeiro, ela tipicamente não forma florações superficiais, geralmente a densidade máxima de células desta cianobactéria ocorre a 2-3m abaixo da superfície. Segundo, *C. raciborskii* não produz os compostos orgânicos voláteis que causam o sabor e odor que estão comumente associados com florações de algas (JONES; SAUTER, 2005). Tais características permitem que as pessoas não desconfiem ao consumir água de um local com floração desta cianobactéria.

Na primavera, foi possível analisar o fitoplâncton de amostras de água da zona eufótica e afótica em P1. Pôde-se observar que na zona afótica, a contagem

de *C. raciborskii* foi quase o dobro do que na zona eufótica, fato explicável pela característica dessa cianobactéria preferencialmente não se distribuir na superfície do corpo d'água. Visto que nas demais datas de amostragem foi realizada a análise de fitoplâncton apenas na zona eufótica, pode ser que na zona afótica a contagem de cianobactérias seja superior à constatada.

Observou-se que as contagens de cianobactérias seguiram o comportamento observado em anos anteriores: iniciando-se a floração na primavera, intensificando-se no verão e perdurando até o início do inverno. Apesar de elevada, a contagem de cianobactérias nos períodos analisados, não atingiu níveis tão altos como os relatados no ano de 2006, quando se constatou 538.617 céls/ml em pleno mês de julho (IAP, 2007). Não é possível afirmar se a menor intensidade da floração deveu-se à redução da eutrofização do ambiente aquático ou a um comportamento climático diferente nos períodos em questão. Assim, a continuação do monitoramento do Reservatório Alagados faz-se extremamente necessária.

A análise química da água e músculo de peixes do Reservatório Alagados acusou a presença de PST na primavera de 2007, verão e outono de 2008. Enquanto a contagem de *C. raciborskii* elevou-se cerca de quatro vezes no verão com relação à primavera, a concentração de PST (em equiv STX/L) na água elevou-se aproximadamente oito vezes.

A concentração de PST na água apresentou-se nas três datas abaixo do limite de 3 µg equiv STX/L sugerido por Fitzgerald *et al.* (1999), e adotado pela legislação brasileira para água de consumo humano. As concentrações de PST encontradas no músculo dos peixes também apresentaram-se em todos os grupos abaixo do valor limite de 80µg de equiv STX/100g estabelecido internacionalmente para mariscos. Não encontramos na literatura informações sobre as conseqüências de uma exposição crônica a PST, a baixas concentrações, e a OMS considera que não há ainda dados suficientes para estabelecer um limite seguro de ingestão de PST (CHORUS; BARTRAM, 1999). Assim, as concentrações encontradas neste trabalho devem servir de alerta para as autoridades de saúde pública.

As PST podem sofrer bioacumulação em diferentes organismos aquáticos, inclusive peixes, e casos de intoxicações em humanos que consumiram peixes inteiros contendo PST foram relatados em 1976 em Brunei e em 1983 na Indonésia (WHITE, 1981; DEEDS *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram que os peixes *G. brasiliensis* do Reservatório Alagados acumulam PST no músculo durante florações



de *C. raciborskii*, constituindo, portanto uma fonte de contaminação quando consumidos. Neste trabalho, a concentração total de PST e de equiv STX no músculo dos peixes, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Local das três datas de estudo, apesar da diferença na contagem de *C. raciborskii* e na concentração de PST na água entre as épocas de coleta.

A contagem de cianobactérias nas épocas analisadas, apesar de elevada, não foi tão alta quanto em outras. Em dezembro de 2006, por exemplo, a contagem de cianobactérias na água foi de 867,721 céls/ml, sendo *C. raciborskii* o organismo predominante (IAP, 2007). Assim, o perfil de contaminação pode ser diferente e o consumo dos peixes e da água local pode representar um maior risco para a saúde humana.

Mesmo sendo aparentemente baixa a concentração de PST na água e músculo dos peixes analisados, não podemos deixar de pensar na possibilidade de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar. Este fenômeno já é bem conhecido em diversos xenobióticos como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), PCBs, toxafeno, metilmercúrio e arsênico (NORSTROM; MUIR, 1994; SUEDEL *et al.*, 1994; GRAY, 2002; DEFOREST; BRIX; ADAMS, 2007). Quando isso ocorre, o efeito de um poluente pode ser mais potente em organismos de topo de cadeia, e assim gerar impactos ecológicos ou de saúde pública. Não foram encontrados dados referentes à biomagnificação das PST, mas estudos mostram que as PST são transferidas através de predação e acumuladas em organismos carnívoros (ITO *et al.*, 2004; JIANG; NIU; XU, 2006, 2007).

Diversos trabalhos mostram haver diferenças no perfil das toxinas acumuladas entre os organismos aquáticos de uma mesma área e com relação às toxinas dos organismos produtores (BLANCO; REYERO; FRANCO, 2003; SAGOU *et al.*, 2005; SAMSUR *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2006; JIANG; NIU; XU *et al.*, 2007; SEPHTON *et al.*, 2007; DEEDS *et al.*, 2008). Neste trabalho, GTX 5 foi a toxina predominante no músculo dos peixes, representando praticamente 100% do total em todos os grupos analisados. Com exceção da análise de P1 na primavera, GTX 5 não foi a toxina predominante na água, compondo em geral menos de 4% do total de PST. A maior parte da quantidade de PST encontrada na água foi composta por GTX 2, 3 e 4, cujas toxicidades relativas são maiores que a GTX 5 (OSHIMA, 1992 citado por JONES; NEGRI, 1997). Em fevereiro, mais de 50% da concentração de

PST era composta por GTX 4, o subtipo mais tóxico dentre as toxinas detectadas, cerca de 11 vezes mais tóxico que GTX 5 (HALL, 1990; OSHIMA, 1992 citado por JONES; NEGRI, 1997). Kwong *et al.* (2006) relatam diferenças na toxicocinética de cada PST em moluscos e que em peixes pode haver conversão de um análogo em outro. Diferenças na absorção das diferentes PST, na sua distribuição, biotransformação e/ou excreção ou mesmo metabolismo pela flora gastrointestinal poderiam explicar a diferença no perfil de toxinas encontrado neste trabalho entre a água e o músculo dos peixes.

Diferenças têm sido relatadas na distribuição das PST em mariscos, nos diferentes tecidos (PEREIRA *et al.*, 2004; SEPHTON *et al.*, 2007; DEEDS *et al.*, 2008). Assim, há a possibilidade de que a concentração de PST em outros tecidos, por exemplo, visceral, dos peixes analisados fosse diferente ou mesmo superior do que a constatada. Entretanto, o tecido muscular foi escolhido para este estudo devido a ser a parte consumida pela população local.

A capacidade de acúmulo de PST, os componentes tóxicos retidos e o tempo de depuração variam consideravelmente entre espécies de bivalvos. A maioria das espécies pode eliminar as PST em semanas (DEEDS *et al.*, 2008). Um padrão de depuração bifásica (acentuada no início e mais lenta depois) com taxas de depuração de 0,7 a 6,9% ao dia já foi relatado em bivalvos (PEREIRA *et al.*, 1994; SEPHTON *et al.*, 2007). Nossos resultados mostram que 20 dias em água limpa não foram suficientes para depuração significativa das PST presentes no músculo de *G. brasiliensis* do Reservatório Alagados. Em outras palavras, mesmo 20 dias após o término de uma floração de *C. raciborskii*, ainda poderiam ser detectadas toxinas no músculo dos peixes. Nassen (1996) relatou que ratos expostos ao saxitoxinol não mostraram redução significativa de sua concentração no músculo após 48h, sugerindo que a ligação dessa toxina ao músculo é irreversível. Outra hipótese seria a de que no nosso estudo a concentração de PST acumulada seja muito baixa para ativar mecanismos de depuração dessas toxinas nos peixes.

Na primavera a concentração de PST no músculo dos peixes do grupo Depuração foi maior que no grupo Local. Pode-se pensar que os dois grupos desse período estivessem representados por animais de idades diferentes, e isso acarretaria em diferente tempo de exposição e, portanto, diferente absorção e acúmulo de PST; justificando assim o aparente aumento na concentração de PST após o período em água limpa. Não foi possível verificar a idade dos animais neste



estudo, mas supondo que o tamanho dos peixes estivesse relacionado à idade dos mesmos, esta hipótese pareceria não justificar os resultados obtidos; visto que não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao comprimento total dos peixes. Assim, estudos adicionais precisam ser realizados.

## 5.2 BIOMARCADORES

Nossos resultados mostram haver variação sazonal na saúde dos peixes do Reservatório Alagados, evidenciada pelo diferente comportamento dos biomarcadores nas três estações estudadas. A transferência dos peixes para um ambiente limpo mostrou também diferentes respostas quanto ao estado oxidativo, metabólico, genético e morfológico entre as estações.

Não houve diferença na atividade da CAT entre os três grupos Local, mas a falta de valores de referência para a espécie dificulta sabermos se os valores encontrados são normais ou estão alterados. Comparando a grupos controle de outras espécies de peixe de água doce, a LPO neste estudo parece estar elevada em todos os períodos (GUILOSKI, 2008; ROSSI, 2008), indicando a ocorrência de estresse oxidativo.

Substâncias reativas, como EROs, podem danificar lipídios, proteínas e ácido nucléico e assim causar danos teciduais (HWANG; KIM, 2007; VALAVANIDIS *et al.*, 2006; LIVINGSTONE, 2001; MONTSERRAT *et al.*, 2007). Nas brânquias de todos os grupos, a lesão histológica de maior prevalência foi a hiperplasia de epitélio. Dependendo do tipo, lesões em brânquias podem ser interpretadas como resultado de efeitos agudos de xenobióticos (ZODROW; STEGEMAN; TANGUAY, 2004). A hiperplasia de epitélio funciona como mecanismo de defesa, dificultando o acesso de poluentes à corrente sanguínea, mas prejudica também a realização de trocas gasosas (MCDONALD; WOOD, 1993; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). A maioria das lesões em brânquias causadas por exposições subletais afetam o epitélio lamelar (HINTON; LAURÉN, 1990 citado por CAMARGO; MARTINEZ, 2007); entretanto, algumas alterações em vasos sanguíneos podem ocorrer quando os peixes sofrem um tipo mais severo de

estresse. A formação de um aneurisma é uma lesão severa de difícil recuperação que está relacionada à ruptura da célula pilar; devido a um maior fluxo sanguíneo ou mesmo por ação direta de contaminantes sobre essas células (HEATH, 1987 citado por CAMARGO; MARTINEZ, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2004). Neste estudo, observou-se a ocorrência de aneurismas nos grupos Local da primavera e verão.

CMM foram encontrados no fígado em todos os grupos, numa prevalência muito semelhante, e acompanhando a elevada ocorrência de necrose. O período em água limpa não mostrou favorecer a redução da prevalência dessas alterações. A necrose é considerada uma lesão irreversível, associada com exposição crônica a poluentes (BERNET *et al.*, 1999) e pode advir de diferentes mecanismos como ruptura lisossomal, hipóxia tecidual, distúrbio na síntese protéica e metabolismo de carboidratos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2005; HINTON *et al.* 2008).

A função dos CMM no fígado de peixes permanece incerta, mas alguns estudos sugerem que estejam relacionados a detoxificação e reciclagem de compostos endógenos e exógenos (AGIUS; ROBERTS, 2003; LEKNES, 2007; HINTON *et al.*, 2008). Por outro lado, alguns estudos relacionam mudanças nos CMM com a idade e privação alimentar (HUR *et al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2007). Neste estudo, a maior concentração de CMM ocorreu na primavera, aparecendo numa concentração duas vezes maior do que no outono. A primavera, a princípio, não é uma época de privação alimentar e o período de 20 dias em água limpa não mostrou alteração significativa na concentração de CMM, apesar da mudança da dieta (fornecimento de ração comercial). Benincá (2006), analisando fígado de *G. brasiliensis* de uma área referência no verão, descreve concentração de 0,001 CMM/mm<sup>2</sup>, uma concentração muito abaixo da encontrada no nosso estudo. Assim, nossos resultados sugerem que a variação na concentração de CMM no fígado de *G. brasiliensis* do Reservatório Alagados, pode estar relacionada a diferenças no aporte e bioacumulação de contaminantes.

Na primavera, houve redução estatisticamente significativa da LPO após os 20 dias de depuração. Isso pode indicar uma redução de agentes pró-oxidantes nos peixes, por depuração de xenobióticos com ação oxidante ou mesmo cujo metabolismo estaria gerando EROs. Entretanto, esse período parece não ter sido

suficiente para reduzir a concentração de CMM e os agentes que estariam promovendo quebras no DNA dos eritrócitos.

Exposição de organismos aquáticos a substâncias e processos genotóxicos (como estresse oxidativo) podem produzir efeitos como neoplasia (NACCI; CAYULAB; JACKIM, 1996; WESTERN *et al.*, 2002). Na primavera, e também no verão, observou-se a ocorrência de diferenciação tecidual: uma alteração que tem sido sugerida como estágio inicial na formação de neoplasias hepáticas (HINTON *et al.*, 1992).

Na primavera e verão, observou-se também a ocorrência de vacuolização e depósitos citoplasmáticos em hepatócitos. Vacúolos no citoplasma podem conter lipídeos e glicogênio, que estão relacionados à função metabólica do fígado. Aumento da vacuolização pode ser sinal de um processo degenerativo por dano ao metabolismo (PACHECO; SANTOS, 2002; ARELLANO; STORCH; SARAQUESTE, 1999). A formação de grânulos amarelo-amarronzados no citoplasma de hepatócitos já foi relacionada à estagnação de bile em alguns estudos, uma condição fisiopatológica causada pela falta de metabolismo e excreção da bile. (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; PACHECO; SANTOS, 2002; FANTA *et al.*, 2003). O armazenamento de produtos metabólicos pelos hepatócitos é sabidamente afetado por fatores como disponibilidade de alimento e ciclo reprodutivo do animal em estudo (STENTIFORD *et al.*, 2003). O período reprodutivo do *G. brasiliensis* no Brasil ocorre de setembro a janeiro (MAGALHÃES, 1931; SUZUKI; AGOSTINHO, 1997). Assim, a vacuolização e depósitos citoplasmáticos observados neste estudo podem estar relacionados com o ciclo reprodutivo desses animais. De qualquer forma, uma possível relação com poluentes não pode ser descartada.

No grupo Local do verão, a atividade da EROD e da CAT mantiveram-se igual ao da primavera e observou-se elevação da LPO e nas atividades da GST e AchE muscular. Estudos mostraram que alguns xenobióticos são capazes de inibir a atividade da CAT (BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e a atividade da GST pode estar elevada no verão para compensar a atividade da CAT. Devido ao papel que as GSTs têm na conjugação de espécies reativas e outros eletrófilos, a indução desta enzima pode ser considerada benéfica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nesta estação, observou-se também elevação do índice de dano genético, e lesões pré-

neoplásicas foram observadas nas brânquias de 9% dos indivíduos do grupo Local e 8% do grupo Depuração.

Ainda no verão, observou-se elevação na concentração de LPO e atividade de CAT no grupo Depuração, comparado ao respectivo grupo Local. Ferreira, Moradas-Ferreira e Reis- Henrique (2007) também encontraram, após 1 mês de depuração, aumento da atividade da CAT em tainhas capturadas de um rio contaminado, e sugerem que este aumento esteja relacionado ao período sem consumo de alimento durante os primeiros dias de cativeiro. Alguns autores relatam a influência do jejum no estresse oxidativo com elevação de algumas enzimas antioxidantes, incluindo CAT (MORALES *et al.*, 2004). Neste estudo, tal efeito não foi observado após o período de Depuração na primavera e outono. Assim, supomos que o aumento do estresse oxidativo no grupo Depuração esteja relacionado a xenobióticos acumulados em tecidos dos peixes durante a vida livre e que, uma vez em água limpa, foram mobilizados e provocaram aumento na produção de EROs, conseqüente indução de danos oxidativos e de mecanismos antioxidantes. Além disso, Ferreira, Moradas-Ferreira e Reis-Henrique (2007) observaram que após 4 e 8 meses de depuração a atividade da CAT diminuiu significativamente, indicando a necessidade de um período de depuração mais longo para recuperação do estresse oxidativo induzido por poluentes. O período de 20 dias em água limpa no nosso estudo, entretanto, parece ter contribuído na depuração dos agentes genotóxicos ou no reparo do DNA no verão, baseando-se na redução no índice de dano genético nesse período.

No outono, o índice de dano genético manteve-se elevado como no verão e lesões pré-neoplásicas foram observadas no fígado de 13 e 16% dos indivíduos dos grupos Local e Depuração, respectivamente. A atividade da EROD foi maior nesta estação do que nas demais. Após o período de depuração, não foi observada alteração da atividade da CAT, GST e AchE nem nos níveis de LPO e de dano genético, mas houve uma redução na atividade da EROD. A atividade da EROD ocorre geralmente em níveis muito baixos ou indetectáveis em animais controle, mas é altamente induzida por tratamento com alguns agentes tóxicos (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; HUGGETT *et al.*, 1992; BUCHELI; FENT, 1997; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; LU; WANG; ZHU, 2008). Assim, no outono, o período de 20 dias em água limpa favoreceu a depuração dos agentes indutores da atividade da EROD, mas não dos agentes oxidantes.

Os aumentos nas atividades da GST e EROD, no nível de dano genético e LPO, e a ocorrência de lesões pré-neoplásicas coincidem com os períodos de maior concentração de PST e cianobactérias na água do reservatório, mas qualquer correlação seria precipitada porque ainda há poucos estudos sobre os efeitos das PST nestes biomarcadores.

As PST foram correlacionadas com aumento ou redução nas atividades de GST e EROD por alguns autores (GUBBINS *et al.*, 2000; HONG; LAM; HSIEH, 2003; CHOI *et al.*, 2006), mas não por outros (HONG; LAM; HSIEH, 2003; KOZLOWSKY-SUZUKI *et al.*, 2009). Além disso, a exposição a PST parece promover um aumento na LPO em moluscos (CHOI *et al.*, 2006; GALIMANY *et al.*, 2008). Estudos histopatológicos com PST são escassos, mas a exposição de moluscos a dinoflagelados produtores destas toxinas mostrou aumento na melanização e interferências no sistema imune (ESTRADA *et al.*, 2007; GALIMANY *et al.*, 2008). Lefebvre, Trainer e Scholz (2004) demonstraram que a exposição de embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) a STX resultou em anormalidades morfológicas. Entretanto, as alterações foram reversíveis após período em água livre de STX; levando os autores a concluir que as alterações podem ser atribuídas aos efeitos neurotóxicos da STX e não a geno ou citotoxicidade.

A concentração de PST no músculo dos peixes foi semelhante nas três épocas de amostragem e o comportamento dos biomarcadores variou consideravelmente (apesar também do perfil semelhante de cianobactérias e PST na água no verão e outono). Assim, acreditamos que a concentração de PST na água fosse baixa para causar por si só qualquer alteração nos parâmetros analisados. Além disso, na primavera, observou-se que o grupo Depuração apresentou no músculo uma concentração de PST maior que o grupo Local, mas não houve alteração significativa na atividade da GST, EROD e CAT, e houve redução do nível de dano genético, LPO e na atividade de AchE muscular. Possivelmente, a sazonalidade das alterações encontradas esteja relacionada a outros contaminantes.

A maior parte da Bacia Hidrográfica de Alagados é utilizada para atividades agropecuárias (NUCLEAM, 2002). Estudos de Miranda *et al.* (2008) com *Hoplias malabaricus* do lago Ponta Grossa, também impactado com as atividades descritas, mostraram a bioacumulação de 27 pesticidas diferentes e metabólitos no músculo e fígado. Entre os pesticidas utilizados na região estão formulações comerciais

contendo glifosato, imazetapir, diflubenzuron; organofosforados como monocrotofós, metamidofós e clorpirifós; triazóis e piretróides como deltametrina (NUCLEAM, 2002). Tais pesticidas têm sido relacionados a alterações nos biomarcadores aqui estudados. A mistura de xenobióticos que alcança o Reservatório Alagados deve ser complexa, e sua biodisponibilidade deve variar ao longo do ano. Assim, diferenças no perfil de contaminantes ativariam nos peixes o metabolismo por diferentes vias enzimáticas (GST e EROD) e poderiam explicar a sazonalidade das alterações observadas neste estudo.

A variação na biodisponibilidade dos contaminantes no reservatório pode estar relacionada ao calendário agrícola e ao clima. Em épocas de chuva pode haver um maior carreamento de pesticidas para os corpos d'água, e em períodos de seca, assim como em épocas de maior demanda energética e de água, deve ocorrer concentração dos poluentes no reservatório.

A atividade da AchE pode ser utilizada como biomarcador de contaminação por xenobióticos capazes de inibi-la, como organofosforados, carbamatos, deltametrina e/ou glifosato (GLUSCZAK *et al.*, 2007; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VELISEK *et al.*, 2007).

A falta de valores de referência para a atividade da AchE na espécie estudada dificultou a interpretação dos resultados. Os valores da atividade de AchE cerebral não variaram entre os grupos Local, e são comparáveis aos de animais controle de diversas outras espécies de peixes (STURM; SIVA DE ASSIS; HANSEN, 1999; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; TORRE; SALIBIAN; FERRARI, 2007; GUILOSKI, 2008); mas após o período de depuração na primavera, observou-se uma elevação dessa atividade. Isso sugere que a atividade da AchE cerebral em *G. brasiliensis* possa atingir valores maiores, e que possivelmente os contaminantes presentes no Reservatório Alagados tenham mantido-a reduzida nos demais grupos. No verão e outono essa elevação da atividade não foi observada após o período de 20 dias em água limpa. Uma diferença de contaminantes na água entre os períodos poderia explicar essa questão.

Por outro lado, quando considerada a atividade da AchE muscular nos peixes analisados neste estudo, aparentemente não houve inibição em nenhum período, mas não é possível estabelecer se a mesma sofreu um aumento no verão ou se nos demais períodos estaria diminuída. Em grupos controle de peixes de água doce, valores de atividade da AchE muscular de 64 a 430  $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína

já foram descritos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002, FERRARI *et al.*, 2007, GUIMARÃES; SILVA DE ASSIS; BOEGER, 2007). Benincá (2006) relata atividade de  $33,31 \pm 8,44$   $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em músculo de *G. brasiliensis* capturados numa área referência no verão, uma atividade menor do que a constatada em todos os grupos neste estudo.

Na primavera e verão observou-se redução na atividade da AchE muscular após 20 dias em aquários com água limpa. Resultados semelhantes já foram obtidos por Sturm, Silva de Assis e Hansen (1999). O motivo pelo qual a atividade de AchE pode apresentar-se superior em animais a campo quando comparado com animais mantidos em aquários ainda não está claro. A adrenalina, liberada em situações de estresse ambiental, pode elevar a síntese de AchE (PAVLOV; CHUIKO; SHABROVA, 1994). 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.

Sendo fevereiro parte da estação mais quente (temperatura da água  $26,9^{\circ}\text{C}$  - TABELA 4), é possível que o aumento observado nessa data nas atividades da GST e AchE muscular e LPO, esteja relacionado à temperatura da água. Porém, a influência de fatores abióticos nesses biomarcadores bioquímicos ainda não está bem elucidada. Variação sazonal da atividade da GST correlacionada com a temperatura da água foi descrita por alguns autores (NIYOGI *et al.*, 2001, WILHELM FILHO *et al.*, 2001), mas não por outros (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006; CAILLEAUD *et al.*, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2008; BEBIANNO *et al.*, 2007).

Com relação à AchE, alguns autores afirmam que o aumento da temperatura da água estaria relacionado ao aumento da sua expressão e atividade (BOCQUENÉ; GALGANI; TRUQUET, 1990; CAILLEAUD *et al.*, 2007). Mas há controvérsias, e outros autores consideram que a falta de variabilidade sazonal da AchE e da LPO fazem destes biomarcadores que podem ser utilizados indiferentemente em todas as estações (WILHELM FILHO *et al.*, 2001; SANCHEZ *et al.*, 2008).

Segundo Buchelli e Fent (1995) mudanças na temperatura podem acarretar em diferente mobilização dos contaminantes no sedimento ou disponibilidade para aquisição pela água ou cadeia alimentar. Além disso, alteração do metabolismo e

fisiologia dos animais poiquilotérmicos devem causar mudança na absorção dos contaminantes.

Por fim, o presente trabalho mostra que o Reservatório Alagados sofre impacto antropogênico, e em consequência ha variação sazonal na qualidade da água e reflexos na saúde dos peixes. Os nossos resultados indicam diversos efeitos na biota local que podem ser atribuídos não somente as cianotoxinas, mas também à exposição a diversos contaminantes. A bioacumulação de contaminantes pelos peixes pode representar um risco para o ecossistema e para o consumo humano, e, portanto, um programa de biomonitoramento deste corpo d'água se faz necessário.



## 6 CONCLUSÃO

Há contaminação da água e dos peixes *Geophagus brasiliensis* do Reservatório Alagados por goniautoxinas. Esta contaminação dos peixes persiste mesmo após 20 dias em água livre de toxinas.

Há variação sazonal na saúde dos peixes do Reservatório Alagados, mas não é possível afirmar se as alterações dos biomarcadores analisados estão relacionadas à floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* e às toxinas por ela produzidas. Pode estar ocorrendo também sazonalidade no aporte e biodisponibilidade de diversos xenobióticos neste corpo d'água.

Os resultados mostram maior alteração do estado oxidativo, metabólico e genético dos peixes no verão. O período de 20 dias em água limpa leva a diferentes respostas dos biomarcadores na primavera, verão e outono, sugerindo haver diferença no acúmulo e depuração de contaminantes nos três períodos.

Um biomonitoramento contínuo do Reservatório, com análise química mais detalhada dos contaminantes presentes na água e nos peixes poderá esclarecer o comportamento dos biomarcadores, e apontar as causas da sua alteração sazonal.

Estudos laboratoriais que avaliem o impacto de misturas complexas de xenobióticos (incluindo cianotoxinas) e mesmo a influência de fatores abióticos sobre os organismos aquáticos são úteis para melhor compreensão dos resultados obtidos em estudos a campo.

## REFERÊNCIAS

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

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 499–509, 2003.

AKAISHI, F.M. **Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax* sp. utilizando biomarcadores de contaminação**. 141 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

ALMLI, B. *et al.* Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). **Marine Environmental Research**, v. 54, (3-5), p. 237-240, 2002.

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

ANDRINOLO, D.; MICHEA, L. F.; LAGOS, N. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. **Toxicol**, v. 37, p.447-464, 1999.

ANDRINOLO, D. *et al.* Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. **Toxicol**, v. 40, p. 699-709, 2002.

ANSARI, R. A. *et al.* Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch. **Environmental Toxicology**, (*in press*), 2008.

ARELLANO, M. J.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and cooper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 62-72, 1999.

AZEVEDO, S. M. F. O. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

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**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. p. 433 -447.

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)**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BLANCO, J.; REYERO, M. I.; FRANCO, J. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicon**, v. 42, p. 777–784, 2003.

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.

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.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 274, de 29 de Novembro de 2000**. Disponível em:  
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 04/03/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 518 de 25 de Março de 2004**. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRIAND, J. F. *et al.* Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**, v. 34, p. 361-377, 2003.

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

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, p. 583-585, 1971.

CAILLEAUD, K. *et al.* Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A, v. 147, p. 841-849, 2007.

CALIJURI, M. S.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. dos. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Rima, 2006.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p. 78- 86, 1994.

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

CHELLAPPA, N. T.; MEDEIROS COSTA, M. A. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologica**, v. 24, p. S3-S10, 2003.

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.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G.. **Bioindicators and Biomonitoring**. Netherlands: Elsevier Science, 2003. p. 639-669.

CNUBBEN, N. H. P. *et al.* The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p. 141-152, 2001.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 57–63, 2009.

DEEDS, J. R. *et al.* Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. **Marine Drugs**, v. 6, p. 308-348, 2008.

DEFORREST, D. K.; BRIX, K. V.; ADAMS, W. J. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. **Aquatic toxicology**, v. 84, n. 2, p. 236-246, 2007.

DONOVAN, C. J. *et al.* Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins. **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 91-100, 2008.

EGGENS, M. L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.

ESTRADA, N. *et al.* Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 146, p. 502–510, 2007.

FANTA, E. *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 54, p. 119–130, 2003.

FASHIMI, H. D.; CAJARAVILLE, M. P. Induction of peroxisome proliferation by some environmental pollutants and chemicals in animal tissues. In: CAJARAVILLE, M. P. **Cell Biology in Environmental Toxicology**. Bilbao: University of Basque Country Press Service, 1995, p. 221-255.

FAST, M. D.; CEMBELLA, A. D.; ROS, N. W. In vitro transformation of paralytic shellfish toxins in the clams *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*. **Harmful Algae**, v. 5, p. 79–90, 2006.

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

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.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. *et al.* Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, p. 97–103., 2006.

FISHBASE. ***Geophagus brasiliensis*** - Pearl cichlid. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4751&genusname=Geophagus&speciesname=brasiliensis>> Acesso em: 17 de julho de 2008.

FITZGERALD, D. J.; CUNLIFFE, D. A. ; BURCH, M. D. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 203 – 207, 1999.

FLORIO, J. C. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. In: SPINOSA, H. S; GORNIK, S. L; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. p. 25-40.

GALIMANY, E. *et al.* Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. **Harmful Algae**, v. 7, p. 702–711, 2008.

GARCIA, C. *et al.* Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. **Toxicol**, v. 53, n. 2, p. 206-231.

GARCIA-SANTOS, S. *et al.* Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 376-381, 2007.

GLUSCZAK, L. *et al.* Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste de cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R., SALVATORE, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA. 2003. p.247-279.

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

GRAY, J. S. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. **Marine Pollutants Bulletin**, v. 45, p. 46-52, 2002.

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.

HAHN, N. S. *et al.* Dieta e atividade alimentar de peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo**: bases ecológicas para o manejo. Maringá: EDUEM, 1997. p. 141-162.

HALL, S. *et al.* The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. In: HALL, S.; STRICHARZ, G. (Eds.). **Marine toxins**: origin, structure and molecular pharmacology. Washington: American Chemical Society Symposium Series, v. 418, p. 29 – 65, 1990.

HINES, H. R.; NASEEM, S. M.; WANNEMACHER, R. W. [3] - saxitoxinol metabolism and elimination in the rat. **Toxicon**, v. 31, p. 905-908, 1993.

HINTON, D. E. *et al.* Histopathological biomarkers. In: HUGGETT, R.J. *et al.* (Eds.). **Biomarkers**: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. MI: Lewis Publishers, 1992. p. 155–210.

HINTON, D. E. *et al.* Liver toxicity. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds.). **Toxicology of fishes**. D.E. USA: CRC press, 2008. p. 327-400.

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.

HUCULECI, R. *et al.* Malathion-induced alteration of the antioxidant defence system in kidney, gill, and intestine of *Carassius auratus gibelio*. **Environmental Toxicology**, (in press), 2008.

HUGGETT, R. J. *et al.* **Biomarkers**: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress. USA: Lewis Publishers, 1992.

HUR, J. W. *et al.* Effects of starvation on kidney melano-macrophage centre in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 821-825, 2006.

HWANG, E.; KIM, G. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1-10, 2007.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba: Imprensa oficial, 2004.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Laudos técnicos de análise da água do Reservatório Alagados de 2003 a 2007. Curitiba, 2007.

ITO, K. *et al.* PSP-toxicification of the carnivorous gastropod *Rapana venosa* inhabiting the estuary of Nikoh River, Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 1116–1121, 2004.



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

JIANG, T. J.; NIU, D. W. T.; XU, Y. X. Transfer and metabolism of paralytic shellfish poisoning from scallop (*Chlamys nobilis*) to spiny lobster (*Panulirus stimpsoni*). **Toxicon**, v. 15; n. 48(8), p. 988-994, 2006.

JIANG, T. J.; NIU, D. W. T.; XU, Y. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). **Toxicon**, v. 50, p. 639–645, 2007.

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

JONES, W. W.; SAUTER, S. **Distribution and abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana lakes and reservoirs**. Bloomington: SPEA-Indiana University, 2005.

KAEBERNICK, M.; NEILAN B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-9, 2001.

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.

KELLY, S. A. *et al.* Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 7, p.375-384,1998.

KOBAYASHI, H. *et al.* A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communication**, v. 3, p. 103-115, 1995.

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.

KWONG, R. W. M. *et al.* The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 82-91, 2006.

LAGOS, N *et al.* The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, v.37, p. 1359-1373, 1999.

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

LEFEBVRE, K. A.; TRAINER, V. L.; SCHOLZ, N. L. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 159–170, 2004.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). **Acta Histochemica**, v. 109, p. 164-168, 2007.

LIEBLER, D. C.; REED, D. J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 141- 171.

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

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 194-199, 2008.

MAGALHÃES, A. C. **Monografia brasileira de peixes fluviais**. São Paulo: Graphicars, 1931.

MARKERT, B.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. Definitions, strategies and principles for bioindication/ biomonitoring of the environment. In: MARKERT, B.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and biomonitoring**. Netherlands: Elsevier Science, 2003. p. 3-39.

MARTINEZ, C. B. R. *et al.* Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 797–807, 2004.

MASON, R. P. Physical chemical determinants of xenobiotic free-radical generation: the Marcus theory of electron transfer. In: WALLACE, K. B. **Free Radical**

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 297-321.

MIRANDA, A. L. *et al.* Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: histopathological, physiological and immunological findings. **Environment International**, v. 34, p. 939–949, 2008.

MONTSERRAT, J. M. *et al.* 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.

MYERS, C. R. Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 25-44.

NACCI, D. E.; CAYULAB, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008. p. 413-432.

NASSEM, S. M. Toxicokinetics of [3H] saxitoxinol in peripheral and central nervous system of rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, p. 49-58, 1996.

NEGRI, A.P.; JONES, G. J.; HINDMARSH, M. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Toxicon**, v. 33, n. 10, p.1321-1329, 1995.

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.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1311, 2001.

NORSTROM, R. J.; MUIR, D. C. Chlorinated hydrocarbon contaminants in arctic marine mammals. **Science of Total Environmental**, v. 154, p. 107-128, 1994.

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

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 66, p.1284–1291, 2007.

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.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. *et al.* Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53–69, 2005.

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, 1995. p. 81-9

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in european eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 53, p. 331–347, 2002.

PATOCKA, J. The toxins of cyanobacteria. **Acta Medica**, v. 44, n. 2, p. 69-75, 2001.

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.

PEITL JR, P.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxicity activity of the inseticide nuvacron (monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. **Brazilian Journals of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 571-576, 1996.

PEREIRA, P. *et al.* Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Aquatic toxicology**, v. 68, p. 339-350, 2004.

POLETTA, G. L. *et al.* Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 95-102, 2008.

PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008. p.270-292.

RIOS, F. S. *et al.* Liver histopathology and accumulation of melano-macrophage centres in *Hoplias malabaricus* after long-term food deprivation and re-feeding. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 1393-1406, 2007.

ROSA, L. C. de la *et al.* Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. **Journal of Hepatology**, v. 44, n.5, p. 918-929, 2005.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup e Hexaron em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. 65 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RUAS, C. B. G. *et al.* Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 86-93, 2008.

SAGOU, R. *et al.* Comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*). **Toxicon**, v. 46, p. 612–618, 2005.

SAMSUR, M. *et al.* Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. **Toxicon**, v. 48, p. 323-330, 2006.

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.

SAYED, I. *et al.* Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 295-301, 2003.

SCHLENK, D. Biotransformation in Fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. USA: CRC press, 2008. p.153-234.

SEPHTON, D. H. *et al.* Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters and caged atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island, in Bay of Fundy. **Harmful Algae**, v. 6, n. 5, p. 745-758, 2007.

SEVANIAN, A.; MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 47-70.

SHIBATTA, O. A.; PINHEIRO DIAS, J. H. **40 peixes do Brasil**. Rio de Janeiro: Doiis, 2006.

SILVA, C. A. *et al.* Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 400– 409, 2009.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** 99 p. Dissertação (Doutorado em Ciências Naturais: Toxicologia ambiental) - Technische Universität Berlin, Berlin, 1998.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 112–120, 2008.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184 – 191, 1988.

SPERLING, E.; FERREIRA, A. C. S.; GOMES, L. N. L. Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs with respect to nutrient concentrations and bacteria growth. **Desalination**, v. 226, p 169–174, 2008.

STENTIFORD, G. D. *et al.* Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, p. 137–159, 2003.

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.

SU, Z. *et al.* Saxitoxin blocks L-Type  $I_{Ca}$ . **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 324–329, 2004.

SUEDEL, B. C. *et al.* Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 136, p. 21-89, 1994.

SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: EDUEM, 1997. p. 163-182.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2 ed. New York, 1995.

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**. 53 p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas: Fisiologia animal comparada) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2005.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.1, p. 97-112, 2003.

TRUTE, M. *et al.* Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 126-136, 2007.

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.

VALDEZ-DOMINGOS, F. X. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados súveis do petróleo em peixes**. 130 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2003.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

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.

VELÍSEK, J. *et al.* Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 297–301, 2007.

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



WANG, J.; SALATA, J.J.; BENNETT, P.B. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K channels. **The Journal of General Physiology**, v. 121, p. 583–598, 2003.

WESTERN, P.W. *et al.* Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 289-295, 2002.

WHITE, A. W. Marine zooplankton can accumulate and retain dinoflagellate toxins and cause fish kills. **Limnology and Oceanography**, v. 26, p. 103-109, 1981.

WIEGAND, C.; 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 acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 719-726, 2001.

YING, Y. *et al.* Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 145, p. 288–293, 2007.

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

YUNES, J. S. **Florações de algas (cianobactérias) nocivas: homem vítima ou culpado?** Cianonews. Disponível em: <<http://www.cianobactérias.furg.br>>. Abril/2002. Acesso em: 15/07/ 2008.

ZODROW, J. M.; STEGEMAN, J. J.; TANGUAY, R. L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorobibenzeno-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 25-38, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)