



SANDRA REGINA CARPES
ALVES



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Laboratório de Biomarcadores de
Contaminação Aquática

Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o Dr. Afonso Celso Dias
Bainy (Dep. Bioquímica)
Co-orientador: Prof^o Dra. Maria Risoleta
Freire Marques (Dep. Bioquímica)

Florianópolis, fevereiro de 2003

SANDRA REGINA CARPES ALVES

Respostas bioquímicas
em tilápias mantidas no
Rio do Braço, Joinville, SC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profº Dr. Afonso Celso Dias Bairy (Dep. Bioquímica)

Co-orientador: Profº Dra. Maria Risoleta Freire Marques (Dep. Bioquímica)

Florianópolis, fevereiro de 2003

Alves, Sandra Regina Carpes

Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC

xiv, 52 páginas

Dissertação (Mestre em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina)

1. Colinesterases. 2. Biomarcador. 3. Pesticidas. 4. Teses. I. Universidade Federal de Santa Catarina. II. Título

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial :

- ao Afonso, pela orientação na realização da dissertação, oportunidades que me foram concedidas e amizade em todo o período em que estive no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática;
- à Risoleta, pela co-orientação na dissertação, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e paciência;
- à Patrícia Cardoso Severino, pelo apoio no implante das gaiolas e na coleta e processamento das amostras no campo, sem a qual os trabalhos seriam muito mais árduos, pela amizade e carinho constantes;
- à Capes, pela bolsa de estudos concedida;
- à FATMA, pelo apoio e dados fornecidos;
- à Fundação 25 de Julho (Joinville/SC) pelos animais cedidos, pelo apoio técnico e tecnológico e toda atenção fornecida pelos seus integrantes, durante o trabalho de campo;
- ao Prof. Madureira e orientandos, pela participação na coleta de sedimentos durante o trabalho de campo;
- ao Prof. Alcir Luiz Dafré pela participação na comissão examinadora e pelos valiosos conselhos prestados;
- Ao NEMAR, pelo empréstimo do kit de campo para análise de água;
- à todos os professores pela dedicação e préstimos durante o curso;
- à meus pais, pelo apoio, força e estímulo dedicados durante todo o tempo;
- à todos os colegas do laboratório e curso, pela ajuda, amizade e carinho constantes;
- à Deus, pela paciência, coragem e sabedoria;
- à todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 MANUSCRITO.....	15
3 DISCUSSÃO FINAL.....	47
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Ah	aril hidrocarboneto
ALA-D ou δ -ALA-D	delta-aminolevulinato desidratase
ALT	alanina transaminase
AOX	halogênios orgânicos adsorvíveis
APEO	alquifenol etoxilado
AST	aspartato transaminase
BPC	bifenila policlorada
CAT	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
ChE	colinesterase
CYP4501A ou CYP1A	citocromo P450 isoforma 1A
DDE	dicloro difenil etano
DNA	ácido desoxirribonucléico
DQO	demanda química de oxigênio
DTNB	ácido 5,5',-ditio-bis-2-nitrobenzóico – reagente de Ellman
DTT	ditiotreitól
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FATMA	Fundação do Meio Ambiente
FDd	fator de diluição para <i>Daphnias</i>
FDp	fator de diluição para peixes
GST	glutathiona transferase
GZT	Sociedade Alemã de Cooperação Técnica
Hb	hemoglobina
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IgG	imunoglobulina

M	molar
m ³	metro cúbico
mg/L	miligrama por litro
mL	mililitro
mM	milimolar
µg/mL	micrograma por mililitro
µmol	micromol
nM	nanomoles
OC	organoclorado
OCs	organoclorados
OD	oxigênio dissolvido
OPs	inseticidas organofosforados
p/v	peso por volume
PB	fenobarbitol
PBG	porfobilinogênio
PCB	bifenila policlorada
PgP	glicoproteína-P
PVC	cloreto de polivinil
SDS-PAGE	dodecilsulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida
Tris	3-hidroxi etilamino metano
TSF	fração Triton solúvel
U	unidade
U/mg	unidade por miligrama
VHC	hidrocarbonetos voláteis

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	A árvore da qualidade total da água	2
2	Vias de ativação e detoxificação de químicos	6
3	Rede de monitoramento de indústrias na região de Joinville.....	8
4	Toxicidade para <i>Daphnias</i> e peixes de efluentes industriais da região de Joinville/SC.....	9
5	<u><i>Oreochromis niloticus</i></u> (tilápia do Nilo) (SEA GRANT, 2000).....	10
6	Gaiola com 1m ³ , feita de canos de PVC, envolta com tela de sombrite.....	10
7	Lagoa de cultivo de tilápias na Fundação Municipal 25 de Julho (Joinville/SC).....	10
8	Locais de implantação das gaiolas: RB1 – Rio do Braço à montante e RB2 – Rio do Braço à jusante (Joinville/SC).....	11

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Parâmetros biológicos dos peixes <i>O. niloticus</i> mantidos nos locais de estudo por uma semana	40
2 Parâmetros químicos e físicos dos locais amostrados	41

RESUMO

Joinville, a maior cidade do estado de Santa Catarina, possui mais de 200 indústrias altamente poluidoras. Estudos prévios realizados nesta região pela Fundação do Meio Ambiente (FATMA) observaram que em alguns rios, particularmente o "Rio do Braço" apresentaram alta toxicidade para *Daphnia magna* e *Danio*. O objetivo deste estudo foi analisar alguns biomarcadores de contaminação em tilápias (*Oreochromis niloticus*) engaioladas e colocadas em dois pontos do "Rio do Braço" (RB1 - perto de efluentes industriais; RB2 - aproximadamente um Km distante do local de despejo), e um local de referência (REF1 - "Fundação Municipal 25 de Julho"). Após sete dias, os animais foram mortos para a obtenção de sangue, cérebro e fígado. No fígado foram analisadas a expressão da isoforma CYP1A e da glicoproteína-P (PgP), as atividades das enzimas colinesterase (ChE), glutationa-S-transferase (GST) e catalase (CAT). No sangue foi analisada a concentração de hemoglobina. No plasma foram analisadas as atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a capacidade antioxidante. Nos eritrócitos foi analisada a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), e no cérebro foi analisada a atividade da colinesterase (ChE). Todos os peixes colocados em RB1 morreram antes de 8 horas de exposição, provavelmente devido às condições anóxicas observadas neste local. Os animais mantidos em RB2 apresentaram níveis significativamente maiores da atividade da CAT (129%), GST (26,7%) e CYP1A (448%) hepáticas e AST (23%) e ALT (67%) plasmáticas do que nos animais da região referência. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de PgP, na atividade da ChE na fração S9 hepática e cerebral entre os peixes mantidos no Rio do Braço e os animais referência. Porém, a ChE da fração Triton solúvel (TSF) foi maior (136,2%) no fígado dos peixes mantidos em RB2. Nenhuma diferença estatística foi observada na atividade enzimática da δ -ALAD, na concentração de hemoglobina e na capacidade antioxidante do plasma dos peixes mantidos nos locais REF1 e RB2. Com base nestes resultados podemos concluir que os organismos mantidos no "Rio do Braço" foram expostos a uma condição de estresse químico, evidenciado pelos elevados níveis hepáticos de CYP1A, CAT e GST (biomarcadores de exposição a compostos orgânicos no ambiente) e plasmáticos das AST e ALT (indicadores de lesão tecidual).

ABSTRACT

Joinville, the largest city of Santa Catarina state has more than 200 industries with high pollutant load. Previous studies carried out at this region by “Fundação do Meio Ambiente (FATMA)” shown that some rivers, particularly “Rio do Braço” was highly toxic to *Daphnia magna* and *Danio rerio*. The aim of this study was to analyze some biomarkers of contamination in caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) kept at two sites of “Rio do Braço” (RB1 – close to industrial effluents input; RB2 – about 1 Km far from the dumping site, and at a reference site (REF1 - “Fundação Municipal 25 de Julho”). After 7 days, the fish were killed for sampling the blood, brain and liver. In liver, cytochrome P450 1A isoform (CYP1A) and p-glicoprotein (PgP) expression were analyzed, as well as, the activity of cholinesterase (ChE), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). Hemoglobin content was measured in the blood. The activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total antioxidant capacity were analyzed in plasma. δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity was measured in erythrocytes, and cholinesterase (ChE) activity was quantified in the brain. All fish kept at RB1 died before 8 hours of exposure, probably due to the anoxic conditions observed in this site. Fish kept at RB2 showed significant higher levels of hepatic CAT (129%), GST (26.7%) and CYP1A (448%) and plasma AST (23%) and ALT (67%) than the reference fish. No changes were observed in the PgP levels, ChE activity in the hepatic and cerebral S9 fraction comparing to the fish from REF1 and RB2. However, higher (136.2%) triton soluble cholinesterase (ChE-TSF) was observed in the liver of fish kept at RB2. No changes were observed in the δ -ALAD activity, hemoglobin concentration and plasma antioxidant capacity, comparing the fish kept at REF1 and RB2. Based on these results, we can conclude that the fish kept at “Rio do Braço” were exposed to a chemical stress condition, evidenced by the elevated levels of hepatic CYP1A, CAT and GST (biomarkers of exposure to organic compounds) and plasma AST and ALT (indicators of tissue damage).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Biotecnologia vem sendo praticada desde os tempos que remontam à origem da nossa civilização, quando o homem começou a utilizar a atividade microbiana para produzir alimentos fermentados. Mais recentemente, o termo Biotecnologia tem sido utilizado para designar atividades que empregam técnicas de biologia molecular e engenharia genética, sendo denominada de forma restrita como “biotecnologia moderna”. A Biotecnologia compreende um vasto conjunto de técnicas que usam seres vivos, ou parte deles, para produzir ou modificar produtos, aumentar o crescimento de plantas ou animais ou, ainda, produzir microrganismos para usos específicos. O conjunto de técnicas usadas pode contribuir de forma decisiva para o progresso de áreas importantes como a agroflorestal, saúde, alimentos e meio ambiente. Em diversos países, processos de manipulação genética e sistemas avançados de produção de plantas têm possibilitado progressos específicos nas áreas de melhoramento genético, propagação clonal e conservação de germoplasma, além de propiciarem aumentos de produção agrícola e florestal através do uso de inoculantes microbianos. Além disso, a Biotecnologia tem contribuído para a produção de compostos de interesse farmacológico e alimentar com resultados expressivos (UFSC, 1999), na produção de métodos e procedimentos de prevenção de poluição, que têm sido aplicados em processos industriais e estudos de casos para minimização de resíduos industriais, bem como avaliações ambientais. As opções que visam minimizar resíduos e suas implementações podem diminuir a produção dos mesmos da água em 21%, consumo de corantes em 24%, auxiliares têxteis e substâncias químicas em 14% e uso de energia em 25%. Também podem ser reduzidos os gases causadores do efeito estufa (PETEK & GLAVIC, 1996).

Nas últimas décadas deste século, a humanidade vem se defrontando com uma série de problemas globais – ambientais, financeiros, econômicos, sociais e de mercado. Neste quadro, as preocupações com o ambiente, em geral, e com a água, em particular, adquirem especial importância, pois as demandas estão se tornando

cada vez maiores, sob o impacto do crescimento acelerado da população e do maior uso da água, imposto pelos padrões de conforto e bem-estar da vida moderna. Entretanto, a qualidade das águas da Terra – rios, lagos naturais e represas, em particular – dos ecossistemas e da vida, em geral, vem sendo degradada de uma maneira alarmante, e esse processo pode logo tornar-se irreversível, sobretudo, nas áreas mais densamente povoadas dos países emergentes, como o Brasil (REBOUÇAS, BRAGA, TUNDISI, 1999).

Escassez e mau uso da água doce representam sérios e crescentes problemas que ameaçam o desenvolvimento sustentável e a proteção do ambiente. Saúde humana e bem-estar, produção segura de comida, desenvolvimento industrial e ecossistemas dos quais estes dependem, estão todos ameaçados, a menos que os recursos de água doce e solo sejam utilizados de forma eficiente nas próximas décadas e muito mais do que têm sido até agora (REBOUÇAS *et al.*, 1999).

As características de qualidade das águas derivam dos ambientes naturais e antrópicos onde se originam, circulam, percolam ou ficam estocadas. Na avaliação da qualidade de uma água, considera-se a composição de uma amostra, cujos constituintes são referidos em termos de características físicas, microbiológicas e químicas, a depender do objetivo a ser alcançado. A qualidade total pode atingir elevados graus de complexidade (Figura.1).

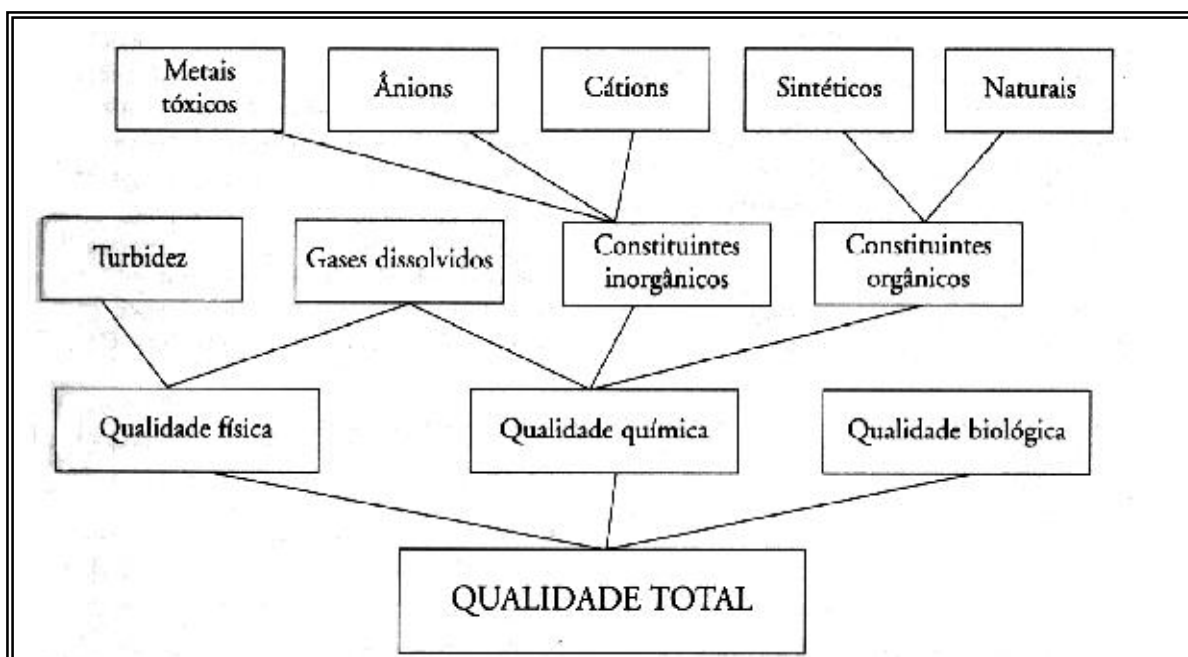


Figura 1. – A árvore da qualidade total da água (REBOUÇAS *et al.*, 1999).

A contaminação do solo ou da água ocorre quando ali se encontram um ou mais elementos químicos que não existiam originalmente, ou um ou mais elementos em concentrações acima das que ocorriam naturalmente. Alguns desses elementos, em quantidades apropriadas, são essenciais para o desenvolvimento de animais e vegetais, porém em quantidades maiores podem ser tóxicos (TRN, 1999). Portanto, o desenvolvimento de técnicas para o controle de poluição das águas deve ser tratado como prioridade entre as diferentes áreas da ciência.

Uma das principais causas de contaminação dos ecossistemas aquáticos e, particularmente no Estado de Santa Catarina, está associada com a contaminação das atividades relacionadas com os diferentes tipos de indústria. Algumas águas podem conter ácidos clorídrico e sulfúrico, provenientes de resíduos industriais, drenagem de minas, etc. Avalia-se que a indústria têxtil consome 15% de toda água industrial do mundo, perfazendo um total de 30 milhões de m³ por ano (SILVA & SIMÕES, 1999). Esta é utilizada em todas as etapas de produção de tecidos, principalmente nas fases de tinturaria (onde é consumida metade de toda a água deste setor), no pré-tratamento (41%), limpeza e acabamento. As fases de maior carga contaminante, expressa em DQO, são o pré-tratamento dos tecidos – desengomagem (50%), tinturaria (37%), estamparia (7%) e tingimento (6%). As impurezas dissolvidas ao longo dos processos são constituídas pelas substâncias contidas na matéria-prima, produtos químicos adicionados para facilitar a fiação e tecelagem, corantes. Os contaminantes mais perigosos são os halógenos, orgânicos absorvíveis (AOX – fenóis clorados, bifenilas policlorados), os metais pesados contidos nas moléculas dos corantes (Cu, Cr, Co, Ni, Zn, Pb e o TiO₂), o alquifenol etoxilado (APEO – tóxicos para os peixes) e os hidrocarbonetos voláteis (VHC – especialmente os aromáticos, usados nos espessantes, por serem carcinogênicos) (SILVA & SIMÕES, 1999). Indústrias de galvanoplastia também podem contribuir significativamente com a contaminação aquática. Durante o processo de revestimento de metais com outras superfícies metálicas, a água participa inicialmente como solvente das soluções ácidas (ácidos sulfúrico e clorídrico) ou alcalinas (carbonatos, fosfatos, silicatos e boratos), bem como de surfactantes, para limpeza e desoxidação das peças a serem revestidas. Em seguida, é usada como solvente das soluções para o banho ácido, alcalino ou neutro das peças. Estas soluções dão origem, por extravazamento, descarga ou vazamentos, aos efluentes

aquosos. Nestes resíduos é comum serem detectados níveis de cianeto e cianato (ambos tóxicos), gás carbônico e nitrogênio (SILVA & SIMÕES, 1999).

Em função da diversidade de contaminantes produzidos, é muito difícil garantir a confiabilidade dos processos convencionais de tratamento de água de mananciais que recebem esgotos de centros urbanos, efluentes industriais, águas residuais da mineração ou, simplesmente, o escoamento superficial difuso de bacias hidrográficas onde se pratica uma agricultura com uso intensivo de insumos químicos. Em função disto, existe uma grande variedade de elementos menores ou traços – neurotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, entre outros – que podem estar presentes nas águas de consumo (REBOUÇAS *et al.*, 1999).

Resta portanto, estabelecer metodologias que possam evidenciar situações de risco ambiental. A determinação dos inúmeros xenobióticos, por meio de procedimentos analíticos pode tornar-se inviável, se considerarmos a enorme diversidade de substâncias e microrganismos que podem atingir um manancial. Assim, a análise sistemática de todos os contaminantes possíveis vem se tornando cada vez mais difícil e onerosa.

Em função disso, vários autores tem se dedicado ao desenvolvimento de metodologias alternativas de análise ambiental, que prevêem uma avaliação dos efeitos tóxicos sub-letais causados pelos contaminantes sobre os organismos expostos aos diferentes tipos de efluentes. Cabe ressaltar, entretanto, que a toxicidade de uma água, ou seja, a sua capacidade de provocar estados mórbidos, nem sempre depende da presença de uma espécie química, mas sim da interação de diferentes espécies e condições físicas e químicas, da qual podem resultar atenuações ou, ao contrário, sinergismos acentuando os efeitos tóxicos individuais. Assim, o verdadeiro potencial de toxicidade de uma água só pode ser estimado, com relativo grau de segurança, através de ensaios *sintéticos*, ou empíricos, realizados com seres vivos. Os bioensaios, também denominados *testes biológicos de toxicidade* constituem, assim, a base do *biomonitoramento* da água, definido como “determinação dos efeitos de poluentes tóxicos lançados a um corpo d’água sobre a vida aquática, inclusive com possibilidade de controle sobre a bioacumulação desses poluentes nos tecidos dos organismos vivos” (PORTO, 1991). O biomonitoramento é

feito selecionando-se organismos representativos de diversos níveis das cadeias alimentares (BRANCO, 1999). Existem, na verdade, diversos tipos de testes biológicos de toxicidade, e a sua adaptação às condições brasileiras tem sido objeto de constante pesquisa pela CETESB (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). Além desses testes mais genéricos, realizados com espécies representativas, de preferência, da *biota* local, existem bioensaios específicos, realizados com espécies de microrganismos de conhecida sensibilidade a determinados efeitos mórbidos (BRANCO, 1999). O uso de peixes engaiolados em lagos, cursos de água e águas costeiras tem sido incorporado com sucesso na avaliação de toxicidade na água (JAMES & EVISON, 1979).

O conceito de monitoramento da qualidade da água é muito mais amplo do que o simples verificar se os padrões legais de qualidade da água estão sendo obedecidos ou não. Deve atender à necessidade de se responder o que está sendo alterado e por que estas modificações estão ocorrendo. O gerenciamento da qualidade da água precisa dessas respostas para que as ações tomadas sejam eficientes na redução dos danos ao meio ambiente, atuais e futuros (BRAGA, PORTO, TUCCI, 1999).

Apesar da agressão se verificar na água, os principais objetos de estudo de toxicidade são os peixes e os microrganismos, isso porque o acúmulo de produtos tóxicos se dá principalmente na cadeia alimentar, por onde chega até o homem. Nos organismos vivos, os produtos tóxicos acumulam-se principalmente nas vísceras e gorduras. O fato do acúmulo dar-se nos peixes, torna-se importante indicador de ocorrência de contaminação da água, quando ocorre um alto índice de mortalidade destes seres. Coincidentemente, as ocorrências de mortalidade de peixes se dá no período do verão, quando as chuvas são mais freqüentes e o uso de pesticidas também, por ser a época propícia para os plantios (TELLES, 1999).

Quando contaminantes entram em contato com organismos vivos, causam uma variedade de respostas. Estas respostas (efeitos biológicos) são normalmente, de dois tipos: aquelas que servem para proteger o organismo contra efeitos danosos de uma substância e aquelas que não. Contaminantes orgânicos podem causar a indução de enzimas que podem metabolizá-los (respostas de proteção) e provocar

detoxificação ou em alguns casos produzir metabólitos ativos (ativação) (Figura 2). Por outro lado, podem ocorrer mudanças não relacionadas a nenhuma função de proteção. Estas incluem alterações na concentração ou atividade das enzimas, interação com receptores e alterações no DNA. Estas respostas podem não causar nenhum dano evidente ao organismo rapidamente, porém pode trazer conseqüências ao nível celular ou de organismo afetando sua saúde (crescimento, reprodução). Neste sentido, as alterações bioquímicas são a primeira resposta de ação biológica e representam a base molecular da toxicidade (WALKER *et al.*, 1996).

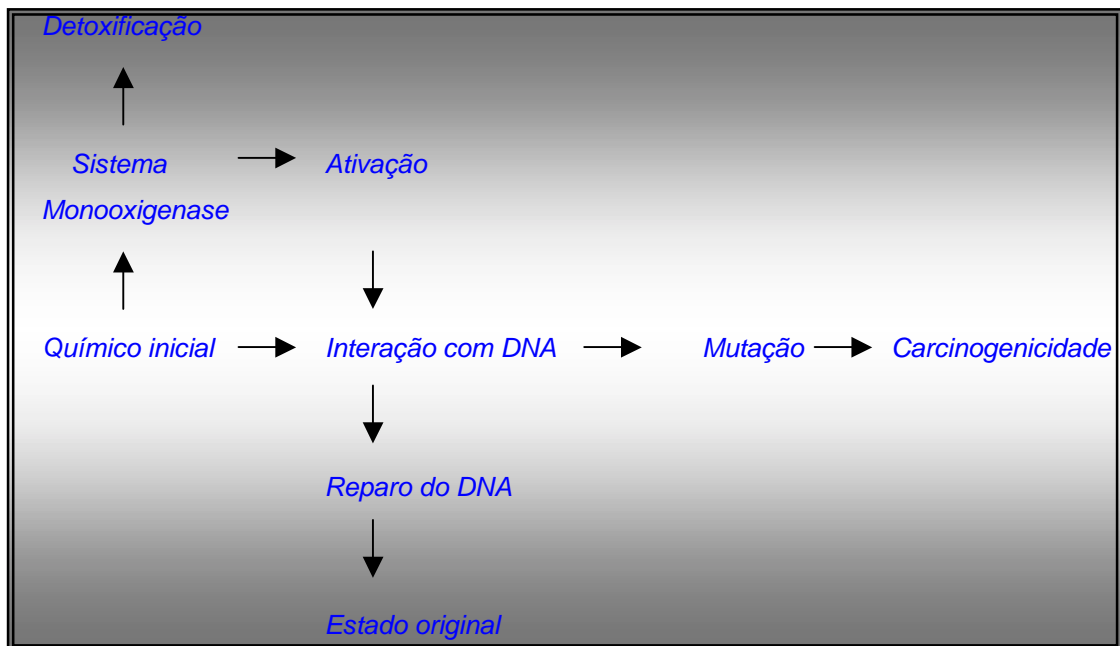


Figura 2. Vias de ativação e detoxificação de químicos (WALKER *et al.*, 1996)

Estas respostas biológicas dos organismos às substâncias químicas que dão uma medida da exposição e também, dos efeitos tóxicos, são chamadas *biomarcadores* (biomarkers) (WALKER *et al.*, 1996). Biomarcadores fisiológicos (específicos) e não específicos têm a capacidade de integrar os efeitos de múltiplos estresses e podem ajudar a elucidar os mecanismos desses efeitos (modo de ação) (HUGGETT *et al.*, 1992).

Os biomarcadores são considerados como uma ferramenta indispensável para programas de monitoramento, pois apresentam grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993). A análise desses parâmetros permite que ocorra: detecção

precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas; identificação de espécies ou populações em risco de contaminação; magnitude da contaminação e determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992). Biomarcadores são classificados como *biomarcadores de exposição* e *biomarcadores de efeito*. Os de exposição são aqueles que indicam exposição dos organismos aos contaminantes, mas não dão informação do grau de efeito adverso que esta alteração causou. Os de efeito (ou efeito tóxico) são aqueles que demonstram um efeito adverso no organismo (WALKER *et al.*, 1996). Os efeitos dos contaminantes químicos podem ocorrer em diferentes níveis de organização biológica, estendendo-se desde o molecular ou bioquímico até a fisiologia integrada do indivíduo, e ultimamente, aos níveis de população e ecossistema.

Neste presente trabalho implantou-se uma metodologia de avaliação ambiental utilizando-se peixes mantidos em gaiolas diretamente nos rios de drenagem dos efluentes de origem industrial. Esta técnica de monitoramento “*in situ*”, aliada à análise de biomarcadores biológicos, pode fornecer informações sobre os efeitos tóxicos sub-letais causados pelos xenobióticos presentes no ambiente.

Este estudo foi realizado no município de *Joinville* - maior cidade do estado de *Santa Catarina*, terceiro pólo industrial do Sul do País, com mais de 200 indústrias (Knier, 1998) - especificamente no Rio do Braço na zona industrial. Na zona industrial do Rio do Braço existem 8 fábricas (Figura 3) do setor metalúrgico, têxtil, galvanoplastia e plástico, além de esgotos domésticos, de oficina mecânica e de lavação de postos de gasolina.

No Projeto “Gerenciamento de Recursos Hídricos em Santa Catarina” executado em parceria pela Fundação do Meio Ambiente (FATMA) e a Sociedade Alemã de Cooperação Técnica (GZT), implantou-se uma Rede de Monitoramento da Qualidade dos Recursos Hídricos e de Efluentes Industriais. O monitoramento inclui análises físico-químicas e ecotoxicológicas em trinta e dois pontos ao longo dos rios da região de Joinville/SC, de efluentes provenientes de quinze indústrias de seis diferentes ramos, e de uma ETE municipal. Testes de toxicidade aguda de efluentes industriais (Figura 4), realizados pela FATMA, utilizando-se os parâmetros

toxicológicos de imobilidade e morte para o microcrustáceo *Daphnia magna* e o peixe *Danio rerio*, realizados nos rios de Joinville/SC, tem demonstrado uma grande variação de eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes, e que nem sempre a indústria de maior porte é a mais poluidora. O setor têxtil (indústrias de menor porte) é o que apresenta valores de FDd (Fator de Diluição para *Daphnia*) muito superiores aos de grandes indústrias. Fator de Diluição representa a primeira diluição da amostra na qual não foi observado o efeito tóxico. Entre as indústrias analisadas, o setor de galvanoplastia mostra-se mais tóxico, e quase todos os rios analisados mostraram toxicidade para *Daphnia*. No rio Cachoeira e seus afluentes foram amostrados 17 pontos, dos quais, 16 apresentaram efeitos tóxicos. A toxicidade para *Daphnia* foi significativamente alta, com valores de FDd até 16. Os resultados demonstraram que alguns trechos do rio e alguns afluentes estão seriamente contaminados, particularmente na área de maior concentração de indústrias (LOPES, VIEIRA, COELHO FILHO, 1998).

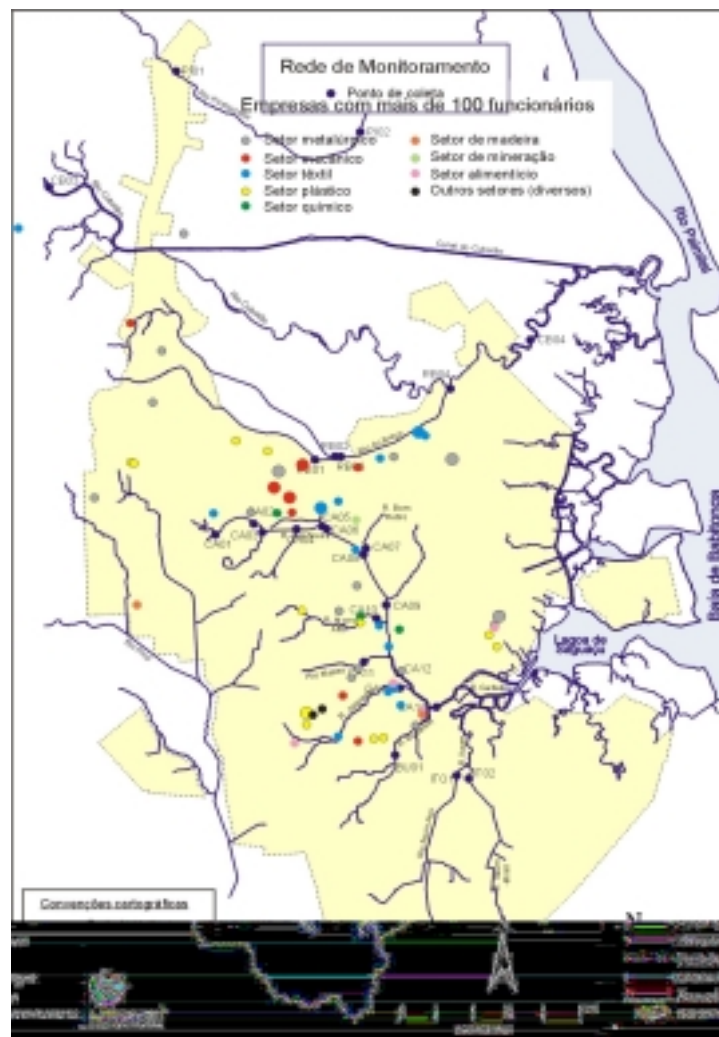
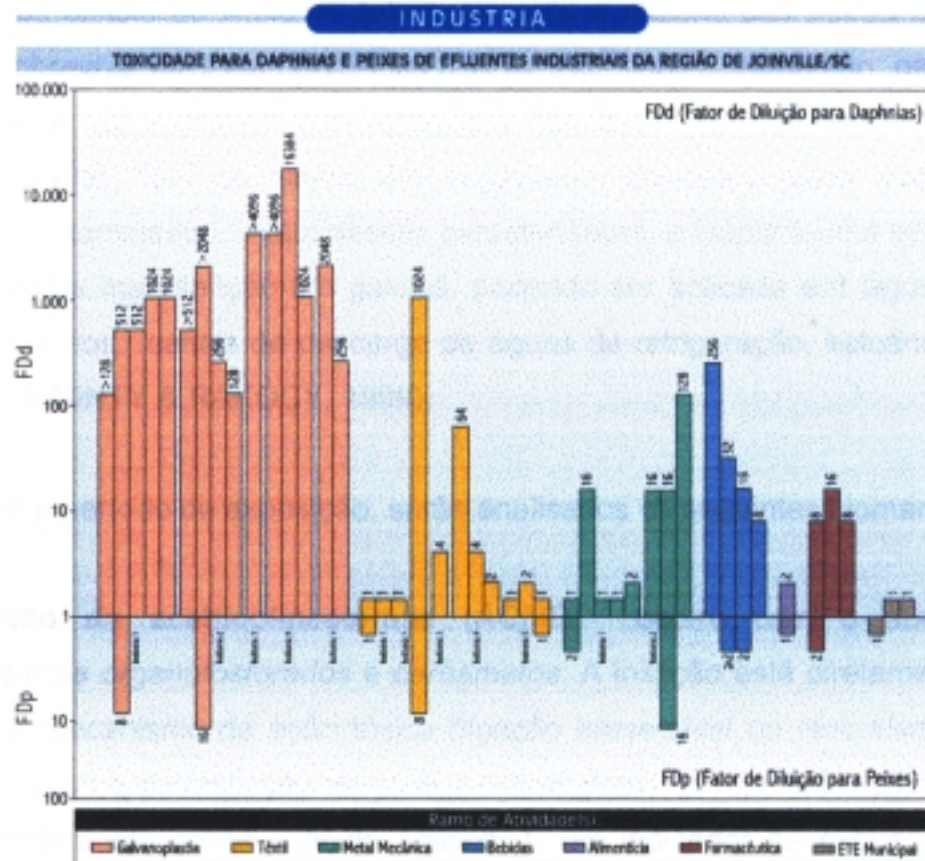


Figura 3. Rede de monitoramento de indústrias na região de Joinville (FATMA, 1998)



Os valores precedidos do sinal > indicam que o número de diluições realizadas não foi suficiente para a determinação do valor real do grau de toxicidade.....

Figura 4. Toxicidade para *Daphnias* e peixes de efluentes industriais da região de Joinville/SC (LOPES et al., 1998)

Para a realização deste estudo, tilápias (Figura 5) fornecidas pela Fundação Municipal 25 de Julho (Joinville/SC) foram transplantadas aos locais de avaliação e ali, acondicionadas em gaiolas (Figura 6, 7 e 8) durante o período de uma semana, após o qual foram mortas e uma série de biomarcadores bioquímicos foram avaliados. A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) faz parte do grupo de ciclídeos endêmicos da África. Suas características positivas de aquacultura, como tolerância à água salobra, à alta temperatura, altas concentrações de amônia (quando aclimatizadas) e baixo oxigênio dissolvido (sobrevive em concentrações de OD menores que 0,3mg/L, consideradas abaixo do limite de tolerância para a maioria das outras culturas de peixes), sobrevivência em pH entre 5 a 10, hábito alimentar omnívoro e principalmente sua tolerância e resistência à qualidade pobre da água (POPMA & MASSER, 1999), fazem da tilápia um organismo adequado para

avaliação de ambientes contaminados. Além dessas características, a tilápia é uma espécie bem adaptada à sua manutenção em gaiolas, podendo ser aplicada em lagos, grandes reservatórios, rios, canais de descarga de águas de refrigeração, estuários e baías costeiras (McGINTY & RAKOCY, 1999).



Figura 5: Oreochromis niloticus (tilápia do Nilo) (SEA GRANT, 2000)

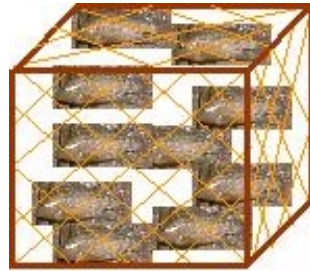


Figura 6. Gaiola com 1m³, feita de canos de PVC, envolta com tela de sombrite

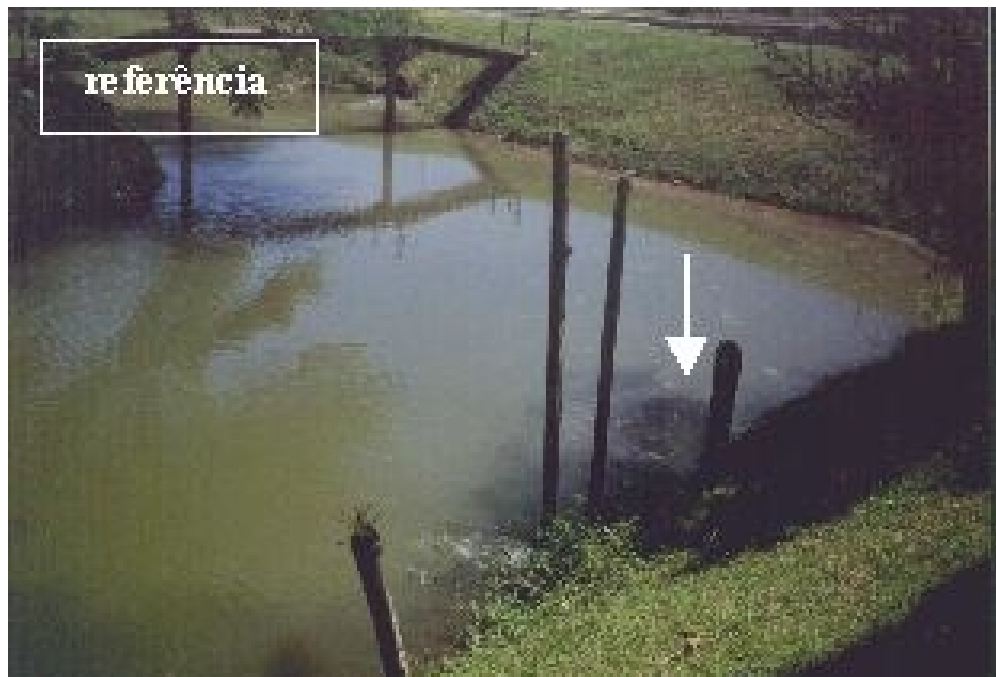


Figura 7. Lagoa de cultivo de tilápias na Fundação Municipal 25 de Julho (Joinville/SC)



Figura 8. Locais de implantação das gaiolas: RB1 – Rio do Braço à montante e RB2 – Rio do Braço à jusante (Joinville/SC)

Após o período de exposição, foram analisados os seguintes biomarcadores:

- Nas amostras de fígado dos peixes foram analisados a expressão da isoforma CYP1A e da PgP, as atividades das enzimas ChE (colinesterase), GST (glutaciona-S-transferase) e CAT (catalase);
- No plasma foram analisadas as atividades das enzimas ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), a capacidade antioxidante e dosagem de hemoglobina;
- Nos eritrócitos foi analisada a atividade da δ -ALA-D (delta-aminolevulinato desidratase); e
- No cérebro foi analisada a atividade da ChE (colinesterase).

Estes biomarcadores seguem os seguintes preceitos:

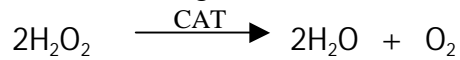
- **Inibição da colinesterase (ChE):** ocorre com o aumento de compostos *organofosforados* e *carbamatos*. A inibição está diretamente ligada com o mecanismo de ação tóxica (ligação irreversível ou reversível de sítios esterásicos e potenciação de efeitos colinérgicos). É responsável por hidrolisar acetilcolina em

colina e ácido acético. É um indicador de exposição à estes compostos. Em vertebrados a ChE é vital para o funcionamento neural normal dos sistemas sensores, integrativos e neuromuscular. Depressão da atividade de ChE ocorre em casos de infecção severa, anemia, mal nutrição, doenças do fígado e intoxicação. Respostas no sangue e plasma são completamente sensíveis. É usada como biomarcador de exposição e quantificação de efeitos (HUGGETT *et al.*, 1992).

- **Inibição da delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D):** enzima citosólica encontrada em muitos tecidos que atua na rota de biossíntese dos compostos tetrapirólicos catalisando a formação de porfobilinogênio, um precursor do grupo Heme. Exposição a chumbo causa uma diminuição (dependente da dose) na atividade da δ -ALA-D dos eritrócitos em peixes, pássaros e mamíferos, através da inibição direta da enzima, diminuindo a produção de hemoglobina (HUGGETT *et al.*, 1992).
- **Expressão do Citocromo P450 isoforma 1A (monooxigenase) (CYP4501A):** proteína envolvida na biotransformação de substâncias químicas orgânicas, resultando em alterações moleculares e na ativação ou inativação de metabólitos tóxicos, induzida por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (HUGGETT *et al.*, 1992). É o principal componente de defesa de organismos contra substâncias tóxicas no ambiente, a atividade é muito alta no fígado e o seu uso para monitoramento biológico tem sido claramente demonstrado nos casos de poluição por hidrocarbonetos, em peixes e invertebrados aquáticos, e por contaminação de HPAs e OCs em uma variedade de organismos (WALKER *et al.*, 1996).
- **Glutathione-S-transferase (GST):** enzima com a função catalítica de conjugação de vários compostos eletrofílicos com o tripeptídeo glutathione, e em alguns casos, com função de detoxificação, o que constitui um mecanismo bioquímico de defesa do organismo. Este mecanismo serve para aumentar a hidrossolubilidade dos compostos e dessa maneira facilitar a sua excreção. A indução de GST pode

ocorrer com drogas clássicas indutoras de vias metabólicas, como HPA, PB, e PCB. O fígado é a maior fonte de GST em vertebrados (HUGGETT *et al.*, 1992).

- **Catalase (CAT):** enzima que contém hematina (grupo heme), que facilita a remoção de peróxido de hidrogênio.



A capacidade da atividade de CAT está associada com os peroxisomos e microcorpos que primariamente funcionam em vários aspectos não resolvidos do metabolismo de ácidos graxos. Durante a oxidação de ácidos graxos peroxisomal, H₂O₂ é produzido como um sub-produto; CAT aparentemente age decompondo o H₂O₂. CAT pode servir como biomarcador para um importante grupo de carcinogênicos não genotóxicos no ambiente aquático (HUGGETT *et al.*, 1992).

- **Expressão da glicoproteína-P (PgP):** resistência a drogas variadas, está comumente relacionada com a expressão elevada da transmembrana glicoproteína-P (P-gP), a qual transporta ativamente uma grande variedade de estruturas e combinações funcionalmente diversas. Evidências sugerem que PgP proporcionam, para organismos aquáticos, resistência a um grande número de xenobióticos (BARD, 2000).
- **Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST):** alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (GPT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO). A ALT é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. A AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Qualquer lesão (injúria) tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos das GPT e GOT.

Estas enzimas são usadas como bioindicadores de exposição a contaminantes (SPARLING *et al.*, 1998) ou drogas hepatotóxicas.

- **Capacidade antioxidante do plasma:** tem também sido proposta como biomarcador de exposição a compostos indutores de estresse oxidativo. O plasma possui proteínas protetoras específicas como transferrina e ceruloplasmina, que se ligam ao ferro e o cobre, respectivamente, prevenindo a ação catalítica destes íons na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio). Além disso, o plasma contém moléculas redox de baixo peso molecular ativas, algumas das quais atuam como antioxidantes primários (GUTTERIDGE & QUINLAN, 1993). Durante a biotransformação de determinados contaminantes, tais como, paraquat, benzopireno, pode haver um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio, provocando um desequilíbrio pró-oxidante causando um estresse oxidativo celular. Esta condição pode levar a uma diminuição da capacidade antioxidante celular e plasmática.

2. MANUSCRITO

Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC

Sandra Regina Carpes Alves, Maria Risoleta Freire Marques, Afonso Celso Dias
Bainy

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica,
Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina,
Florianópolis, SC, 88040-900 Brasil

Tel 55-48-3316561 Fax 55-48-3319672 email bainy@mbox1.ufsc.br

Palavras-chave: colinesterases, biomarcador, pesticidas, monitoramento.

1. Introdução

Joinville, a maior cidade do estado de Santa Catarina e terceiro pólo industrial do Sul do Brasil possui cerca de 200 indústrias que produzem uma alta carga poluidora (Knie 1998). Este fato, aliado a pouca eficiência das estações de tratamento de efluentes, têm provocado um crescente aumento no risco de contaminação nos rios desta região, trazendo sérias conseqüências ao ambiente, bem como aos habitantes destes locais (Vieira and Lopes, 2000).

Testes de toxicidade realizados pela agência estadual de controle ambiental (FATMA), com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, em amostras de águas de efluentes de diversas indústrias lançadas nesta região identificaram locais com elevado grau de toxicidade (Vieira and Lopes 2000). Para avaliar o significado biológico da contaminação deste local, foi iniciado um experimento de monitoramento *in situ* utilizando tilápias engaioladas e mantidas em alguns destes locais para posteriormente serem analisados biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática. Dentre estes, está a isoforma de citocromo P450 (CYP1A) que tem sido amplamente utilizada como biomarcador de exposição dos animais a compostos orgânicos do tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (BPC), dioxinas e compostos relacionados (Huggett et al. 1992).

Enzimas de conjugação de xenobióticos e de defesa antioxidante também têm sido utilizadas como auxiliares na avaliação do impacto dos contaminantes sobre organismos aquáticos (Bainy et al. 1996; 2000). Na primeira categoria, está a glutathione-S-transferase (GST), uma família de enzimas que catalisa reações de conjugação do tripeptídeo glutathione com os metabólitos produzidos, aumentando a

hidrossolubilidade para facilitar sua excreção (Huggett et al. 1992). A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio produzido durante o metabolismo de ácidos graxos e pelo ciclo catalítico do citocromo P450. CAT é proposta como biomarcador para um importante grupo de carcinogênicos não genotóxicos no ambiente aquático (Huggett et al. 1992).

A resistência dos animais a presença de xenobióticos está associada com a elevada expressão da glicoproteína-P (PgP), um transportador de membrana responsável por transportar ativamente compostos químicos com uma grande variabilidade estrutural para fora da célula (Bard 2000). Alguns trabalhos sugerem que organismos aquáticos de regiões contaminadas aumentem a expressão da PgP para prevenir o acúmulo celular de metabólitos endógenos, fosfolípidios e contaminantes aumentando assim sua capacidade de resistência e sobrevivência nestes locais (Bard 2000).

A colinesterase (ChE) é responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético na fenda sináptica e na junção neuromuscular, sendo portanto essencial para o funcionamento normal dos sistemas sensores, integrativos e neuromuscular (Massoulié et al. 1993). Esta enzima é inibida por organofosforados ou carbamatos e seu grau de inibição tem sido amplamente utilizado como biomarcador de exposição a estas classes de compostos (Nemcsók et al. 1985; Huggett et al. 1992).

A enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) atua na rota de biossíntese dos compostos tetrapirólicos catalisando a formação de porfobilinogênio,

um precursor do grupo Heme. Exposição a chumbo causa uma diminuição dose-dependente na atividade da ALA-D dos eritrócitos em peixes, pássaros e mamíferos, através da inibição direta da enzima, diminuindo a produção de hemoglobina (Huggett et al. 1992), e por isso tem sido proposta como biomarcador de exposição ao chumbo.

Duas outras enzimas têm sido utilizadas como indicadores de lesões celulares, a alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (GPT/TGP) e a aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO). A ALT é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. A AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Qualquer lesão (injúria) tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sangüínea, elevando os níveis séricos das GPT e GOT. Estas enzimas tem sido utilizadas como biomarcadores inespecíficos de exposição a contaminantes ou drogas hepatotóxicas (Sparling et al. 1998).

A capacidade antioxidante do plasma tem também sido proposta como biomarcador de exposição a compostos indutores de estresse oxidativo. O plasma possui proteínas protetoras específicas como transferrina e ceruloplasmina, que se ligam ao ferro e o cobre, respectivamente, prevenindo a ação catalítica destes íons

na produção de EROs. Além disso, o plasma contém moléculas redox de baixo peso molecular ativas, algumas das quais atuam como antioxidantes primários (Gutteridge and Quinlan 1993). Durante a biotransformação de determinados contaminantes, tais como, paraquat, benzopireno, pode haver um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio, provocando um desequilíbrio pró-oxidante causando um estresse oxidativo celular. Esta condição pode levar a uma diminuição da capacidade antioxidante celular e plasmática.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática em tilápias mantidas em gaiolas, em uma microbacia de drenagem do distrito industrial de Joinville e em uma região referência. Nas amostras de fígado destes peixes foram analisados a expressão da isoforma CYP1A e da PgP, as atividades das enzimas ChE, GST e CAT. No plasma foram analisadas as atividades das enzimas ALT, AST, a capacidade antioxidante e dosagem de hemoglobina. Nos eritrócitos foi analisada a atividade da δ -ALA-D, e no cérebro foi analisada a atividade da AChE.

2. Material e Métodos

Espécie utilizada

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) adultas foram fornecidas pela Fundação Municipal 25 de Julho, de Joinville/SC. Os peixes foram mantidos em gaiolas de 1m³ nos locais determinados por um período de uma semana. Após este período, as amostras de fígado, cérebro e sangue de cada peixe foram retiradas e imersas em nitrogênio líquido (-185°C), para a preservação das atividades biológicas e posterior análise em laboratório.

Locais de implantação das gaiolas

O presente trabalho foi realizado na microbacia hidrográfica do município de Joinville/SC, localizada na região nordeste de SC, latitude sul 26° 18' 05" e longitude oeste 48° 50' 38", em novembro de 2001. Foram estabelecidos três locais para colocação das gaiolas (Figura 1), cuja escolha baseou-se nas análises de toxicidade realizadas pela FATMA (Vieira and Lopes 2000) e pelas condições adequadas de profundidade (mais ou menos um metro) para colocação das gaiolas.

Um grupo de 10 peixes permaneceu em gaiolas nos próprios tanques de cultivo como referência (REF1), enquanto dois outros grupos, de 10 peixes cada, foram transportados para o Rio do Braço em uma região com impacto acumulativo por efluentes de indústrias têxtil e metal mecânica (Rio do Braço- RB1) e um ponto à jusante, cerca de 1000m de distância de RB1 (RB2). O Rio do Braço foi escolhido devido ao fato de que existem 8 fábricas do setor metalúrgico, têxtil, galvanoplastia e plástico, além de esgotos domésticos, entre outros.

Coleta e processamento das amostras

Após a implantação das gaiolas e o período de permanência de uma semana, os animais dos locais REF1 e RB2 foram coletados. Todos os animais do ponto RB1 morreram antes de 8 horas de exposição, provavelmente devido às condições anóxicas do local (Tabela 2).

Os peixes foram mortos através de uma incisão na parte posterior da cabeça. A artéria aorta foi exposta através de um corte na junção pré-opercular e o sangue foi retirado com uma seringa heparinizada. Uma amostra de sangue foi separada para a dosagem de hemoglobina e atividade da δ -ALAD. O restante do sangue foi imediatamente centrifugado a 3.000 g para separação do plasma para a análise da capacidade antioxidante e da atividade das enzimas ALT e AST.

Através de uma incisão ventral desde o ânus até a junção pré-opercular o fígado foi exposto e imediatamente isolado e congelado em nitrogênio líquido. Por fim, a caixa craniana foi aberta e o cérebro retirado e congelado em nitrogênio líquido.

Os tecidos foram descongelados sobre o gelo, pesados e homogeneizados em quatro vezes o volume (p/v) de tampão de homogeneização (Tris HCl 50mM, 0,15mM KCl, pH 7,4), para análise enzimática. Para a obtenção da fração citossólica (denominada fração S9) e fração microsomal, o homogeneizado foi centrifugado a velocidade de 9.000g durante 10 minutos (S9) e o sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 40.000g por 70 minutos (pellet microsomal). Na fração sobrenadante (S9) foi analisada a atividade das enzimas GST, CAT, ChE e PgP,

enquanto que na fração microsomal foi analisada a expressão da isoforma CYP1A. O pellet obtido da centrifugação a 9.000g foi dissolvido no mesmo tampão de homogeneização acrescido de Triton X-100 (0,05%) para solubilização da colinesterase de “membrana”, denominado de fração triton solúvel da colinesterase (TSF). Após 30 minutos sob agitação constante a temperatura ambiente, esta amostra foi novamente centrifugada a 9.000g e o sobrenadante utilizado para dosagem da ChE TSF.

Para a análise da expressão da PgP, as amostras de fígado foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em tampão de lise hipotônico de acordo com protocolo Cornwall et al. (1995). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante utilizado na imunodeteção da PgP.

Análises bioquímicas

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST hepática foi analisada pelo método de Keen et al. (1976). A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de glutathione reduzida em meio contendo tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. O aumento de absorvância foi acompanhado a 340nm. Uma unidade (U) de enzima é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto por miligrama de proteína.

Colinesterase (ChE)

Tanto em amostras de cérebro como de fígado, a atividade da colinesterase foi determinada pelo método de Ellmann et al. (1961). A reação se baseia na reação entre a acetiltiocolina iodada, o homogeneizado e o ácido 5,5',-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). A acetiltiocolina iodada é hidrolisada pela colinesterase e libera tiocolina, que reage com o ácido e produz um ânion amarelo que é detectado por espectrofotometria em 405nm (Booth et al. 2000). A atividade de colinesterase é expressa em μ moles de acetiltiocolina hidrolisada por minuto por miligrama de proteína (μ moles/min/mg proteína).

Catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase hepática foi realizada pelo método de Beutler (1975), que quantifica a velocidade da decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 , pela enzima, através do decréscimo de absorbância à 240nm à 30°C. Os valores de atividade da CAT estão expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de H_2O_2 /minuto, à 37°C, em pH 8,0.

Aspartato transaminase (AST) e Alanina transaminase (ALT)

A determinação da atividade da AST e ALT plasmática foi realizada de acordo com método de Reitman and Frankel (1957) seguindo os protocolos descritos no Kit Analisa Diagnóstica, cat. 252 e 253, respectivamente. A atividade destas enzimas estão expressas em U RF/mL (Unidades Reitman-Frankel/mL).

Isoforma de Citocromo P450 (CYP1A)

As análises de imunoblots das preparações microsossomais foram feitas de acordo com Kloepper-Sams et al. (1987). As proteínas microsossomais foram separadas em géis SDS-PAGE 12% (gel de corrida) e 10% (gel de entrada) e então eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com leite em pó desnatado 5% (p/v) dissolvido em Tris 25mM, NaCl 0,63M pH 7,5. As proteínas foram visualizadas utilizando-se o corante reversível Ponceau S. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal 1-12-3 de camundongo contra scup (P450E) para CYP1A1 (10µg/mL solução bloqueadora) (Park et al. 1986). O anticorpo secundário utilizado foi o de cabra contra IgG de camundongo conjugada à peroxidase. Após 60 minutos de incubação as bandas das proteínas CYP1A foram reveladas pelo método de quimioluminescência utilizando-se o kit ECL-Amersham-Pharmacia. A membrana foi exposta a um filme autoradiográfico Kodak X-OMAT, XAR-5 film e imediatamente revelados de acordo com métodos convencionais. A intensidade das bandas foi quantificada após a digitalização da imagem utilizando-se o software Scion Image. Os resultados estão expressos em densidade integrada por micrograma de proteína microsossomal.

δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D)

A análise da enzima δ-ALA-D é baseada na reação entre o porfobilinogênio (produto da reação enzimática) com o reagente de Ehrlich formando uma coloração rosa, que foi lida em espectrofotômetro a 555nm. O ensaio enzimático é realizado na presença e na ausência de ditioneitol (DTT) que restabelece os valores de atividade enzimática, caso tenha havido alguma inibição. A diferença entre a atividade enzimática com DTT e sem DTT expressa indiretamente o grau de

exposição a contaminantes metálicos, particularmente o chumbo (Bainy, 1990). A atividade da enzima está expressa em nmoles de PBG/min/mL de hemoglobina.

Determinação da expressão da glicoproteína-P (PgP)

As amostras foram separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE contendo 7,5% no gel de corrida e 4% no gel de entrada. Imediatamente após a corrida eletroforética as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-Amersham Pharmacia).

Para a detecção da PgP foi utilizado o anticorpo monoclonal C219 (Signet Laboratories). Após 60 minutos de incubação a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário cabra anti-camundongo IgG conjugada com a Peroxidase. A revelação da membrana foi feita pelo método de quimioluminescência. A membrana foi exposta a um filme autoradiográfico Kodak X-OMAT, XAR-5 film e imediatamente revelados de acordo com métodos convencionais. A densitometria das bandas impressas no filme autoradiográfico foi feita utilizando-se o software Scion Image e os resultados estão expressos como densidade integrada em unidades arbitrárias (expressão da PgP/ μ g).

Capacidade antioxidante do plasma

A análise da capacidade antioxidante do plasma foi realizada de acordo com Gutteridge and Quinlan (1993) que se baseia na inibição da oxidação da desoxirribose induzida por Ferro na presença de amostras de plasma. Os resultados são dados em % de proteção da desoxirribose.

Determinação da concentração de proteína

A determinação da quantidade de proteína na fração celular citoplasmática e microsomal foi realizada segundo o método descrito por Lowry et al. (1951), modificado por Peterson (1977).

Determinação da concentração de hemoglobina no sangue

A determinação da concentração de hemoglobina no sangue total foi realizada utilizando-se o reagente de Drabkin de acordo com Van Kampen and Zijlstra (1961). Está expressa em g/dL.

Parâmetros químicos e físicos dos locais amostrados

Nos locais de estudo, foram analisados o pH, temperatura e oxigênio dissolvido (mg/L), utilizando-se um kit portátil de análise de água, de campo.

Tratamento estatístico dos resultados

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados estatisticamente através do teste t de Student. Foi assumido um nível de significância de no mínimo $P < 0,05$.

3. Resultados

Os parâmetros biológicos das tilápias analisadas neste experimento estão na Tabela 1. Nenhuma diferença estatística foi observada entre o peso total, o peso do fígado, o peso da gônada e o peso do cérebro dos peixes mantidos nos dois locais. Uma variação muito grande no peso das gônadas dos animais, principalmente nos animais mantidos na região do Rio do Braço foi observada. Nestes animais foram observadas alterações morfológicas externas (alteração na textura e cor do fígado e no tamanho das gônadas – feminilização de machos e masculinização de fêmeas) bem diferenciadas dos animais da região referência, no entanto nenhuma quantificação destas alterações foi realizada.

Nenhuma diferença significativa foi observada em relação a temperatura e o pH nos locais onde os animais foram mantidos durante o período experimental (Tabela 2). No entanto, em RB1 foram observados níveis muito baixos de oxigênio dissolvido possivelmente associados a proximidade do lançamento de efluentes industriais, caracterizando assim uma condição praticamente anóxica, o que possivelmente contribuiu para a morte dos peixes em menos de 8 horas de exposição. Nos outros dois locais não foi observada uma diferença significativa nos níveis de oxigênio dissolvido e nenhuma mortalidade de peixes foi vista.

O fígado dos animais mantidos por uma semana no local RB2 apresentaram níveis significativamente maiores da atividade da CAT (129%), GST (26,7%) (Figura 2) e CYP1A (448%) (Figura 5) que nos animais da região referência. Um aumento significativo na atividade das enzimas transaminases plasmáticas AST (23%) e ALT (67%) foi também observado nos peixes mantidos em RB2 (Figura 3). Os níveis de

PgP detectados no fígado dos animais do local RB2 foram semelhantes aos dos animais REF1 (Figura 5).

Nenhuma alteração na atividade da ChE na fração S9 hepática e cerebral dos peixes mantidos na região do Rio do Braço foi detectada (Figura 4). Porém, foi observado um aumento significativo (136,2%) na atividade de ChE na fração Triton solúvel (TSF) no fígado dos peixes mantidos em RB2 (Figura 2). Nenhuma diferença estatística foi observada na atividade enzimática da δ -ALAD (Figura 3). A capacidade antioxidante do plasma dos peixes mantidos nos locais REF e RB2 não apresentaram diferença significativa (Figura 3). A concentração de hemoglobina total nos animais REF foi semelhante à dos animais mantidos em RB2 (Figura 3).

4. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências de que os animais transplantados ao Rio do Braço, em um local a jusante do distrito industrial, sofreram uma agressão química possivelmente associada a intensa atividade industrial da região. No local mais próximo do distrito industrial os peixes não sobreviveram mais de 8 horas devido aos baixos níveis de oxigênio.

O aumento significativo da CAT observado nos animais mantidos em RB2 pode estar associado a dois fatores. Por um lado estes animais podem ter sido expostos a um nível mais elevado de substâncias químicas responsáveis pela proliferação peroxisomal. Como a catalase é uma enzima peroxisomal, um aumento na quantidade de peroxisomos se refletiria no aumento da atividade desta enzima. Algumas substâncias químicas tem sido descritas como indutoras de proliferação peroxisomal, tais como os pesticidas 4-cloro-2-metilfenoxiacético, 2,4-D, parafinas cloradas, dietilftalato, tricloroetileno (EHP 1995). Para confirmar tal hipótese seria necessária a realização de análises destas substâncias químicas neste ambiente. Por outro lado, um aumento na taxa de biotransformação de xenobióticos, decorrente de uma maior exposição dos peixes a contaminantes ambientais, poderia acarretar em um conseqüente aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, potenciais indutores de estresse oxidativo (Bainy et al. 1996). Assim, a catalase constitui-se em uma das principais enzimas antioxidantes celulares, uma vez que ela é responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio produzido após a dismutação do radical ânion superóxido. Assim, o aumento observado na atividade da CAT poderia ser uma resposta antioxidante compensatória contra o

aumento da produção de espécies reativas de oxigênio associado a biotransformação de xenobióticos nos animais de RB2.

De forma similar, a maior atividade da GST nos animais mantidos em RB2 possivelmente está associada com a exposição destes peixes a compostos orgânicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais identificados em amostras de sedimentos deste local por Luiz A. Madureira (comunicação pessoal). Vários trabalhos mostram uma relação direta entre o grau de contaminação de compostos orgânicos e a atividade da enzima GST (Almli et al. 2002; Stephensen et al. 2002; Perez-Lopez et al. 2002; Zanette et al. 2003). Este resultado está de acordo com os níveis significativamente maiores da expressão de CYP1A nos animais mantidos em RB2. Compostos orgânicos do tipo HPAs, PCBs planares e dioxinas formam um complexo com o receptor Ah (Arl hidrocarboneto) que é translocado ao núcleo onde se liga na região promotora do gene do CYP1A ativando sua transcrição. Da mesma forma, este complexo também pode ativar a transcrição algumas isoformas de GST (Denison et al. 1998). Desta forma, pode-se observar que tanto os sistemas bioquímicos de biotransformação de Fase I (CYP1A), como os de Fase II (GST) estavam aumentados nos peixes mantidos por 7 dias na região RB2, quando comparados com os peixes mantidos na região referência. Estes resultados, associados ao aumento na atividade da catalase (CAT), evidenciam que os peixes foram expostos a substâncias químicas potencialmente tóxicas para estes organismos. Soimasuo et al. (1995) e Chen et al. (2001) também observaram indução da expressão do citocromo P4501A em peixes expostos à descarga de efluentes de fábrica de papel e branqueamento de polpa de papel.

Os níveis de atividade das transaminases AST e ALT nos peixes da região RB2 foram significativamente maiores que nos animais REF. A ALT é encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. A AST é encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Qualquer lesão (injúria) tissular ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sangüínea, elevando os níveis séricos destas enzimas (Sparling et al. 1998). Assim, o aumento observado na atividade destas enzimas no plasma dos peixes de RB2 pode estar associado a alguma lesão celular em algum destes tecidos decorrente da exposição dos animais a contaminantes ambientais.

Medidas das alterações na atividade da enzima colinesterase, tem sido usada para determinar o efeito tóxico característico de inseticidas organofosforados e carbamatos (Rodriguez-Fuentes and Gold-Bouchot 2000). Tem sido demonstrado que águas contaminadas com estes compostos podem causar danos no sistema nervoso em peixes pela inibição de colinesterase (Nemcsók et al. 1985). De la Torre et al. (2000) observaram uma inibição da atividade da ChE em cérebro em peixes (*Cyprinus carpio*) mantidos no Rio Reconquista em Cascallares (Argentina). Nemcsók et al. (1985) também observaram inibição da AChE em cérebro e em músculo de peixes em trabalho realizado na Hungria. No presente trabalho não foi observada alteração na atividade da AChE hepática na fração S9. No entanto a ChE quantificada na fração Triton solúvel (TSF) foi significativamente maior nos animais de RB2. A etiologia desta indução não está claramente entendida, no entanto,

poderia estar associada a uma resposta de indução compensatória após uma exposição inicial à compostos anticolinesterásicos. No entanto esta hipótese é questionável uma vez que nenhuma alteração na atividade da colinesterase em ambas frações obtidas do cérebro dos peixes mantidos no Rio do Braço foi observada. A ausência de uma resposta inibitória da ChE tanto no cérebro, como no fígado dos peixes mantidos no Rio do Braço nos leva a sugerir, de uma forma indireta, que não há resíduos destes inseticidas nesta região. No entanto apenas com a realização de análises químicas é que poderíamos ter uma conclusão inequívoca sobre tal possibilidade.

A atividade da enzima δ -ALAD quantificada no sangue dos animais, não apresentou diferenças entre os grupos experimentais. Os níveis de hemoglobina total dos animais também não apresentaram diferença significativa. Estes resultados fornecem indícios de que possivelmente não esteja ocorrendo um impacto significativo no ambiente por chumbo. No entanto, outros metais que não interferem na atividade da δ -ALAD poderiam estar presentes, sendo portanto necessária uma análise química complementar para certificar a composição quali-quantitativa dos metais da região.

Nenhuma diferença significativa na expressão da PgP foi observada entre os animais mantidos em ambos locais. No entanto, neste trabalho não foi avaliada a atividade da PgP. É possível que tenha havido um aumento na atividade da PgP que não se refletiu necessariamente no aumento na expressão da proteína. Cabe ressaltar que houve uma grande variabilidade individual entre os animais, quanto a expressão da PgP. Como este sistema desempenha também funções endógenas, é

possível que outros fatores, não analisados neste trabalho pudessem estar interferindo em uma resposta mais clara de indução deste sistema de transporte. Minier et al. (2000) e Keppler and Ringwood (2001), sugerem que a temperatura da água nos locais de estudo pode afetar indiretamente na expressão da PgP através da maior disponibilidade de alimento. Assim, experimentos subsequentes seriam necessários para avaliar a utilização da PgP como marcador de contaminação em tilápias mantidas em locais contaminados.

Determinadas classes de compostos químicos são capazes de causar perturbações endócrinas nos animais expostos (Rolland et al. 1997). Dentre estas classes, estão os derivados de compostos fenólicos, substâncias químicas muito utilizadas na indústria têxtil. A feminilização de machos, bem como a masculinização de fêmeas estão entre alguns das alterações endócrinas causadas por estes compostos químicos. Tais efeitos podem comprometer seriamente a estrutura das comunidades aquáticas na zona de abrangência do lançamento dos efluentes. Neste trabalho foi possível observar uma grande variação no peso das gônadas dos peixes, principalmente nos animais mantidos em RB2. Apesar de não terem sido quantificadas, alterações morfológicas bastante marcantes (nas gônadas) foram observadas apenas nos animais mantidos em RB2. Portanto sugerimos que estudos posteriores sejam realizados para avaliar a possibilidade de que estejam sendo lançados nesta região compostos químicos desreguladores endócrinos.

5. Referência Bibliográficas

Almli B, Egaas E, Christiansen A, Eklo OM, Lode O, Kallqvist T (2002) 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*). Mar Environ Res. 54(3-5): 237-40.

Bainy, ACD (1990) Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae) e seus efeitos sobre a δ -aminolevulinato desidratase eritrocitária. Dissertação de mestrado. Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre.

Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquat. Toxicol. 34: 151-162.

Bainy ACD, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC, Medeiros ID (2000) Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. Mar. Environ. Res. 50: 503-508.

Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 48: 357-389.

Beutler E (1975) Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Straton, New York.

Booth LH, Hodges S, O'Hallorant K (2000) Use of cholinesterase in *Aporrectodea caliginosa* (oligochaeta; lumbricidae) to detect organophosphate contamination: comparison of laboratory tests, mesocosms, and field studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2: 417-422.

Chen CM, Liu MC, Shih ML, Yu SC, Yeh CC, Lee ST, Yang TY, Hung SJ (2001) Microsomal monooxygenase activity in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to a bleached kraft mill effluent using different exposure systems. *Chemosphere.* 45(4-5): 581-8.

Cornwall R, Toomey BH, Bard S, Bacon C, Jarman WM, Epel D (1995) Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxic.* 31: 277-296.

De La Torre FR, Ferrari L, Salibian A. (2000) Long-term in situ toxicity bioassays of the Reconquista River (Argentina) water with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water, Air, & Soil Pollution.* 121 (1-4): 205-215. Jul.

Denison MS, Phelan D, Elferink CJ (1998) The Ah receptor signal transduction pathway. In: *Toxicant-receptor interactions*. Ed. By M.S. DENISON & W.G. HELFERICH. Taylor & Francis. Philadelphia. p.3-33.

Ellmann GL, Courtney KD, Andres V, Feartherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

EHP (1995) Chemicals eliciting peroxisome proliferation in rats and mouse. *Environ. Health Persp.* 103: 232-235.

FATMA (1998) Toxicidade aguda de efluente industriais e rios da região de Joinville/SC. In: *Anais – Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 5º ECOTOX.* Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI, Itajaí.

Gutteridge JMC, Quinlan G (1993) Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1156: 144-150.

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL (1992) *Biomarkers: biochemical, physiological e histological markers of anthropogenic stress.* SETAC, Lewis Publishers. 347p.

Keen JH, Habig WH, Jaroby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251: 6183-6188.

Keppler CJ, Ringwood AH (2000) Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 52: 81-96.

Kloepper-Sams PJ, Park SS, Gelboin HV, Stegeman JJ (1987) Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. *Arch. Biochem. Biophys.* 253: 268-278.

Knie J (1998) Monitoramento da qualidade dos recursos hídricos do complexo hídrico da Baía da Babitonga. *Anais do V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia e I Colóquio Brasileiro sobre Algas Nocivas*. Itajaí, p.20.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Massoulié J, Pezzementi L, Bom S, Krejci E, Vallette F (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology.* 41: 31-91.

Minier C, Borghi V, Moore, MN, Porte C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxic.* 50:167-176.

Nemcsók J, Orbán L, Dobler L, Szipfalussy J (1985) Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged.* 31: 9-12.

Park SS, Miller H, Klotz AV, Kloepper-Sams PJ, Stegeman JJ, Gelboin HV (1986) Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P-450E of the marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross-reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 339-350.

Perez-Lopez M, Novoa-Valinas MC, Melgar-Riol MJ (2002) Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicol. Lett.* 136(2): 97-106.

Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.

Reitman S, Frankel S (1957) *Am J. Clin. Path.* 28-56.

Rodriguez-Fuentes G, Gold-Bouchot G (2000) Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Mar. Environ. Res.* 50(1-5): 357-60.

ROLLAND (1997). Chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes. Ed. Rosalind Rolland, Michael Gilbertson, & Richard Peterson, 224 pp. SETAC PRESS, Pensacola.

Soimasuo R, Jokinen I, Kukkonen J, Petanen T, Ristola T, Oikari A (1995) Biomarker responses along a pollution gradient – effects of pulp and paper-mill effluents on caged whitefish. *Aquatic Toxic.* 31(4): 329-345.

Sparling DW, Vann S, Groves RA (1998) Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. *Env. Toxic. and Chem.* 17(12): 2521-2539.

Stephensen E, Sturve J, Forlin, L (2002) Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133(3): 435-42.

Van Kampen EJ, Zijlstra WC (1961) Standardization of hemoglobinetry. II. The hemoglobincyanide method. *Clin. Chem. Acta.* 6: 538-544.

Vieira AL, Lopes EWB (2000) Avaliação da qualidade das águas no complexo hídrico da Baía da Babitonga, Joinville, SC, através de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*. Resumos do VI Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia e III Reunião da SETAC Latino-americana. São Carlos. p.75.

Zanette J (2003) Influência da salinidade sobre biomarcadores de contaminação aquática em ostras do mangue (*Crassostrea rhizosphorae-guideing*, 1928) expostas a diferentes concentrações de óleo diesel. P. 45.

Tabela 1. Parâmetros biológicos dos peixes *O. niloticus* mantidos nos locais de estudo por uma semana.

Local	Peso total (g)	Comprimento (cm)	Peso Fígado (g)	Peso gônada (g)	Peso cérebro (g)
REF^a	138,5 ± 36,8 ^c	21,2 ± 1,9	1,27 ± 0,36	0,45 ± 0,71	0,12 ± 0,02
RB2^b	149,5 ± 23,8	21,3 ± 1,1	1,35 ± 0,35	0,86 ± 1,07	0,14 ± 0,04

^aREF, indica o local de manutenção dos peixes nos tanques da Estação de Piscicultura da Fundação Municipal 25 de Julho, Joinville; ^bRB2, indica o sítio de manutenção dos peixes a jusante do Rio do Braço. ^cOs dados estão apresentados como média ± desvio padrão, n=10 em cada grupo.

Tabela 2. Parâmetros químicos e físicos dos locais amostrados.

Local	T °C	PH	O₂ (mg/L)
REF^a	26,7 ± 1,2 ^d	7,2 ± 1,2	6,3 ± 0,7
RB1^b	27,0 ^e	7,0	1,0
RB2^c	25,4 ± 0,5	6,6 ± 0,1	5,3 ± 0,4

^aREF, indica o local de manutenção dos peixes nos tanques da Estação de Piscicultura da Fundação Municipal 25 de Julho, Joinville; ^bRB1, indica o local de manutenção dos peixes próximo ao distrito industrial no Rio do Braço; ^cRB2, indica o sítio de manutenção dos peixes a jusante do Rio do Braço. ^dOs dados estão apresentados como média ± desvio padrão de análises diárias durante 7 dias. ^eDado referente a uma análise.

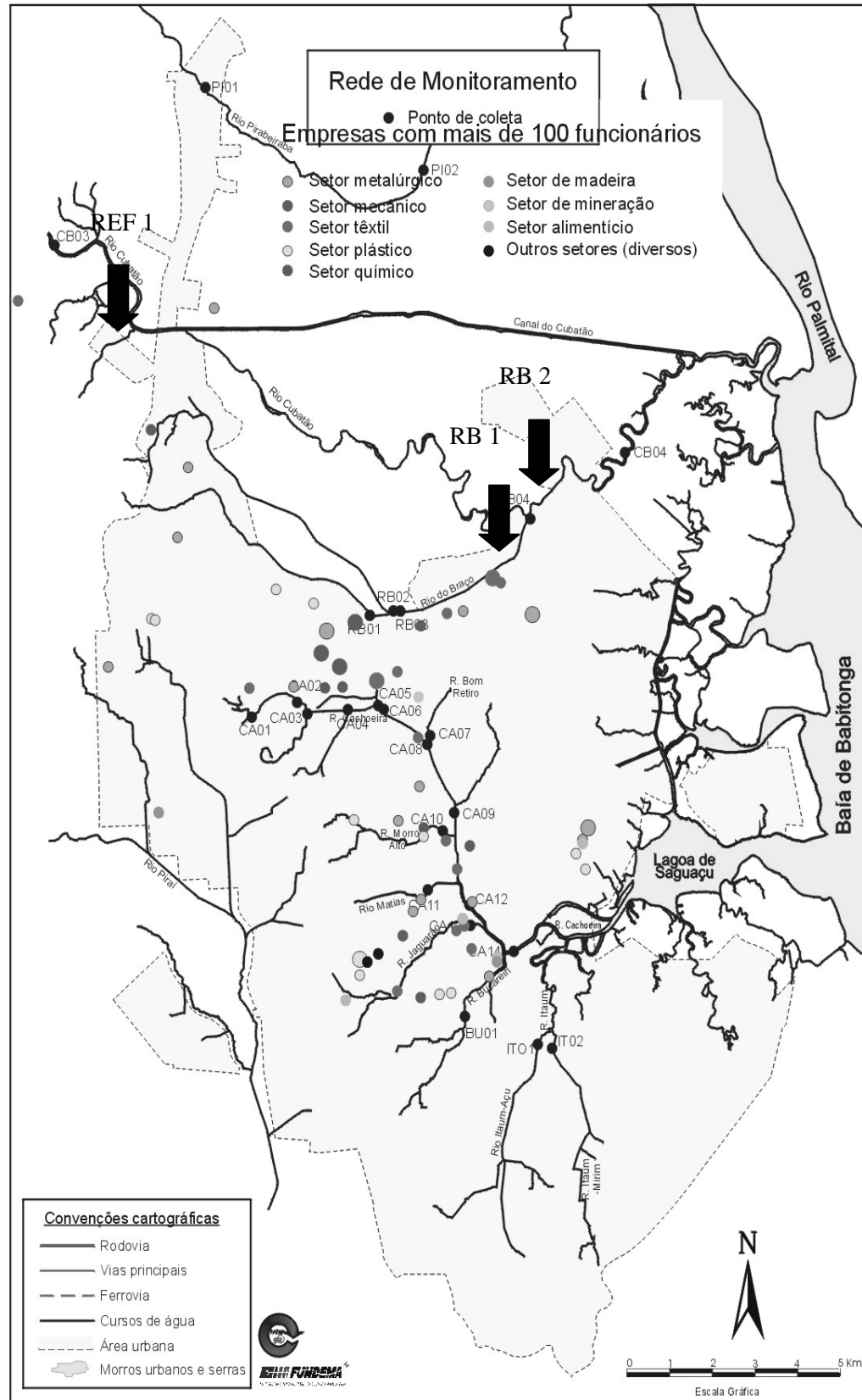


Figura 1. Locais de colocação das gaiolas. REF1- Lagoa de cultivo de tilápias na Fundação 25 de Julho, Joinville/SC; RB1 e RB2 – Rio do Braço, Joinville/SC.

FÍGADO

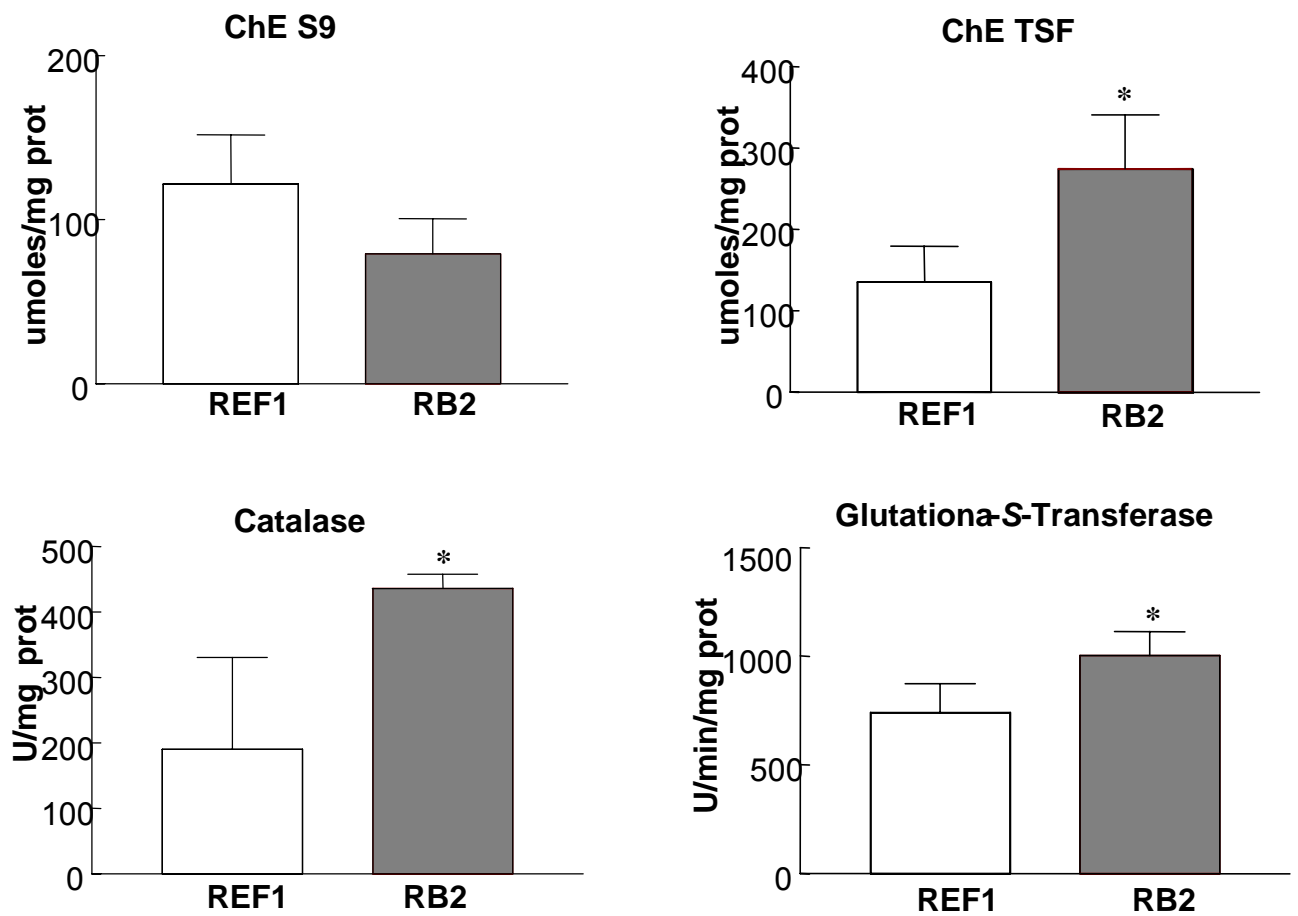


Figura 2 - Atividades da colinesterase na fração S9 e na fração triton-solúvel (TSF) (n=9); Catalase (n=10) e Glutathione-S-transferase (n=10) em fígado de tilápias mantidas no Rio do Braço (RB2) e em uma lagoa de cultivo na Fundação Municipal 25 de julho (REF1), Joinville, SC.

SANGUE

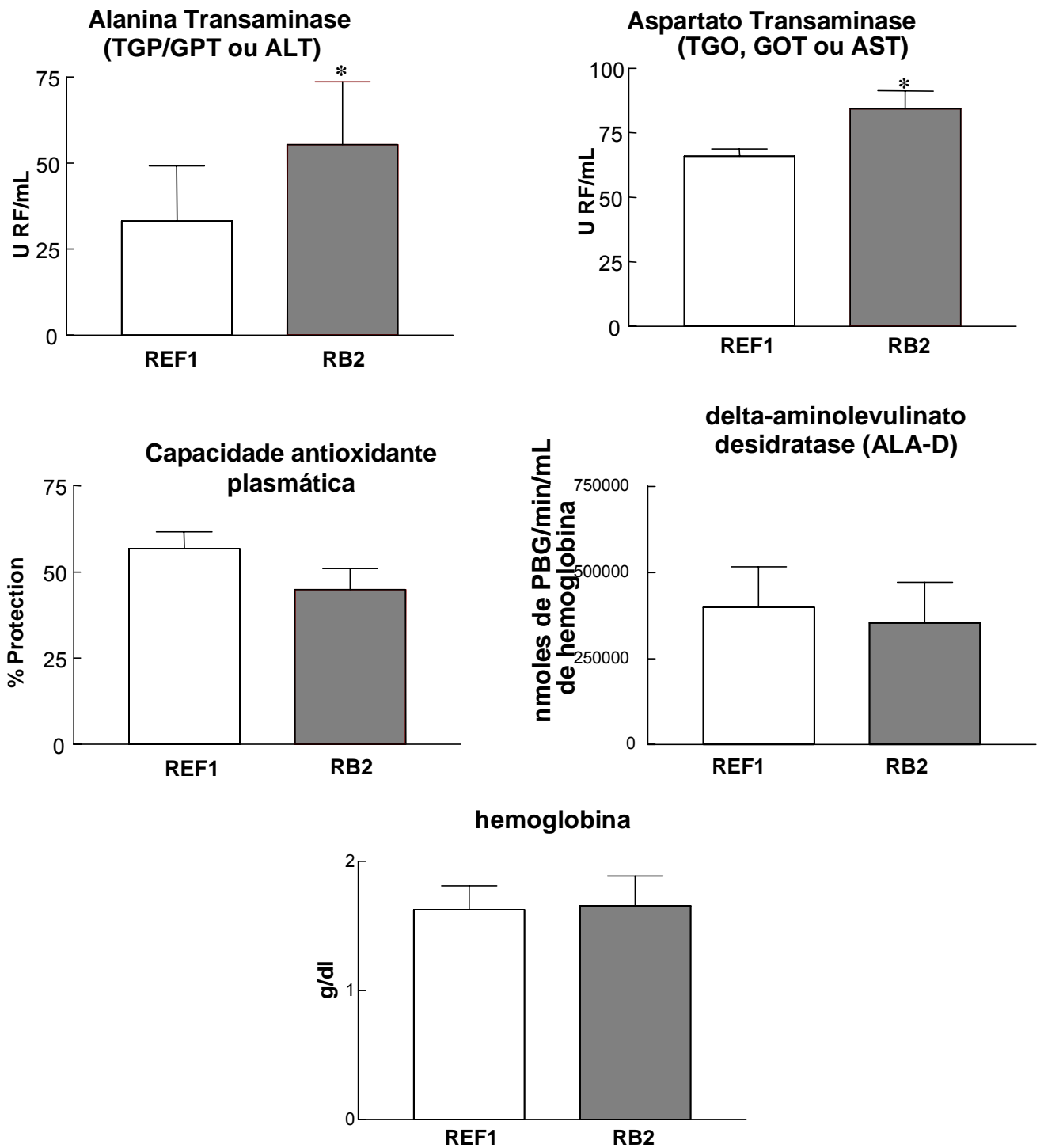


Figura 3 - Atividades das enzimas Alanina transaminase (Transaminase pirúvica – GPT) (n=10); Aspartato transaminase (Transaminase oxalacética - GOT) (n=9); Capacidade antioxidante do plasma (n=10); expressão da delta-aminolevulinato (ALA-D) (n=10); e dosagem de hemoglobina (n=10) em plasma de tilápias mantidas no Rio do Braço (RB2) e em uma lagoa de cultivo na Fundação Municipal 25 de julho (REF1), Joinville, SC

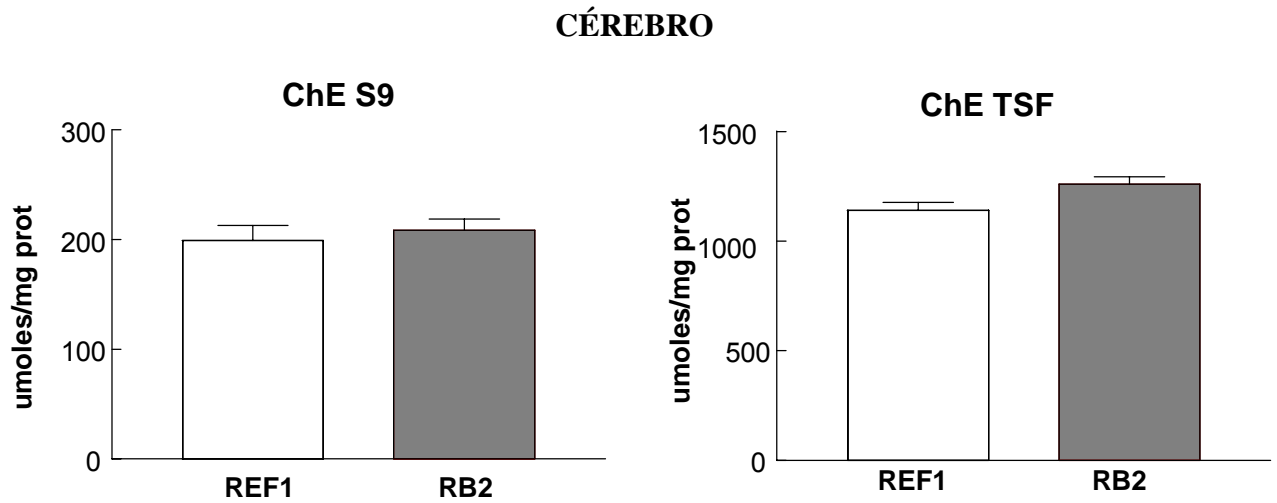


Figura 4 - Atividades da colinesterase na fração S9 e na fração triton-solúvel (TSF) em cérebro de tilápias mantidas no Rio do Braço (RB2) e em uma lagoa de cultivo na Fundação Municipal 25 de julho (REF1), Joinville, SC; (n=10 para cada grupo)

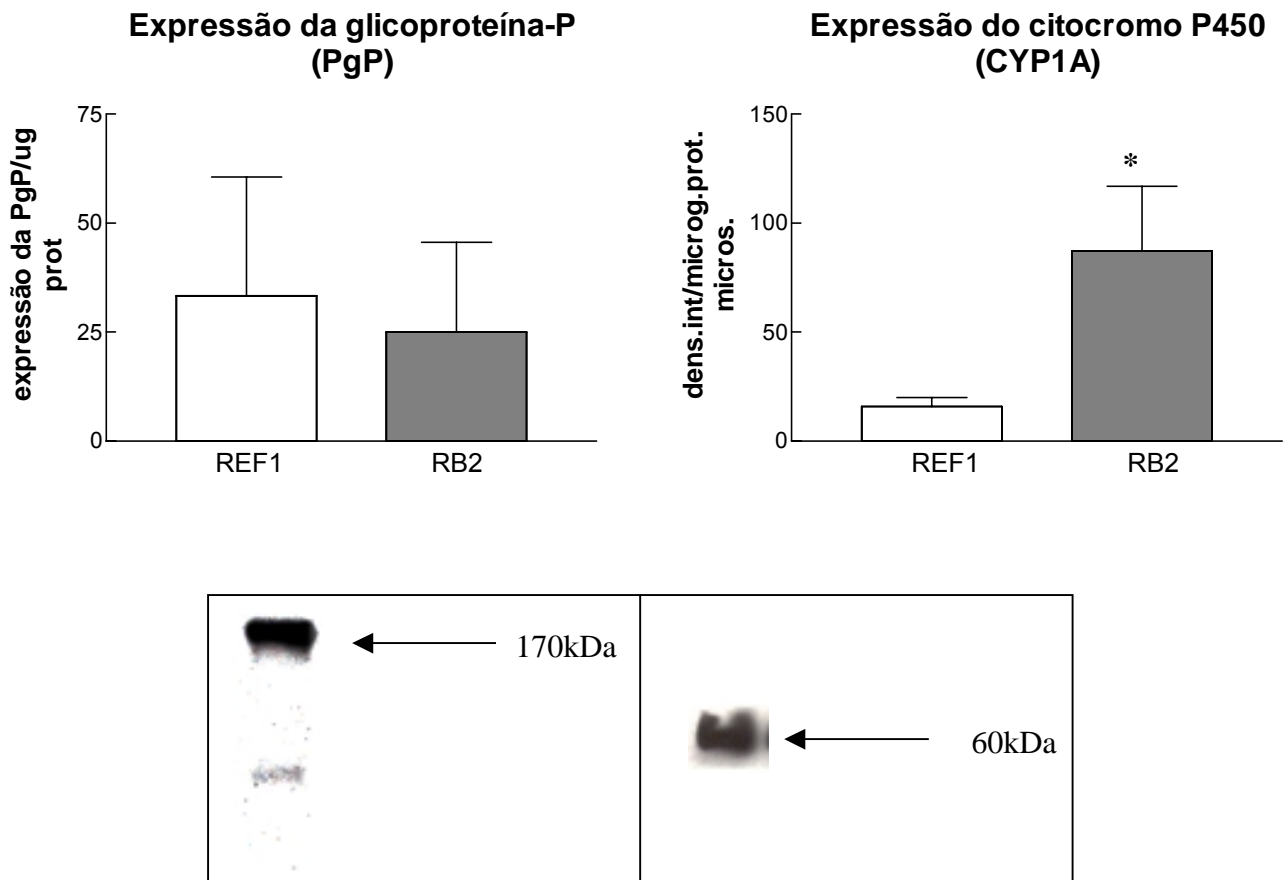


Figura 5 – Expressão da glicoproteína-P (PgP – Banda de 170kDa) e do citocromo P450 (CYP1A – Banda de 60kDa) em fígado de tilápias mantidas no Rio do Braço (RB2) e em uma lagoa de cultivo na Fundação Municipal 25 de julho (REF1), Joinville, SC

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARD, S.M. – Multixenobiotic resistance a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicologic**, **48**: 357-389. 2000.
- BRAGA, B.; PORTO, M.; TUCCI, C.E.M. - Monitoramento de quantidade e qualidade das águas. In: **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo, Escrituras Editora, 1999. p. 637-651.
- BRANCO, S.M. - Água, meio ambiente e saúde. In: **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo, Escrituras Editora, 1999. p. 227-248.
- FATMA. - Toxicidade aguda de efluente industriais e rios da região de Joinville/SC. In: **Anais – Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil. 5º ECOTOX**. Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI, Itajaí, 1998.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. *et al.* - **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, CETESB, 1990.
- GUTTERIDGE, J.M.C & Quinlan. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. **Biochim. et Biophys. Acta.** **1156**: 144-150. 1993.
- HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M; BERGMAN, H.L. - **Biomarkers: biochemical, physiological e histological markers of anthropogenic stress**. SETAC, Lewis Publishers, 1992. 347p.
- JAMES, A. & EVISON, L. - **Biological indicators of water quality**. Great Britain, John Wiley & Sons, 1979.
- KNIE, J. Monitoramento da qualidade dos recursos hídricos do complexo hídrico da Baía da Babitonga. **Anais do V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia e I Colóquio Brasileiro sobre Algas Nocivas**. Itajaí, p.20. 1998.
- LOPES, E.B.; VIEIRA, A.L.; COELHO FILHO, A. – Toxicidade aguda de efluentes industriais e rios da região de Joinville/SC para *Daphnia magna* (Straus) (Crustacea, Cladocera) e *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan) (Teleostei, Cyprinidae). In: **Anais – Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil. 5º ECOTOX**. Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI, Itajaí, 1998.
- McGINTY, A.S. & RAKOCY, J.E. - Cage culture of tilapia. **South. Reg. Aquac. Cent.**, **281**. 1999.

- PETEK, J.; GLAVIC, P. - An integral approach to waste minimization in process industries. **Res. Conserv. Recyc.**, **17**: v.3, 169-188. 1996.
- POPMA, T. & MASSER, M. - Tilapia life history and biology. **South. Reg. Aquac. Cent.**, **283**. 1999.
- PORTO, M.F.A. - Estabelecimento de parâmetros de controle da poluição. In: BRANCO *et al.* **Hidrologia Ambiental**. São Paulo, ABRH/Edusp, 1991.
- REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. - **Águas doces no Brasil**: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Escrituras Editora, 1999. 717p.
- SEA GRANT. **Tilápia**. [On line] disponível na Internet via <http://ag.ansc.purdue.edu/aquanic/images/photos/ill-in/tilapi~2.jpg> Arquivo capturado em 27/08/00.
- SILVA, G.A. da & SIMÕES, R.A.G. - Água na indústria. In: **Águas doces no Brasil**: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Escrituras Editora, 1999. p. 339-369.
- SPARLING, D. W. *et al.* Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. **Env. Toxic. and Chem.** **17**(12): 2521-2539. 1998.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN HELD, P.A. - Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Biomarkers**: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. SETAC, Eds. Lewis Publishers, 1992. p. 235-335.
- TELLES, D. D'A. - Água na agricultura e pecuária. In: **Águas doces no Brasil**: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Escrituras Editora, 1999. p. 305-337.
- TRN. **Contaminação**. [On line] disponível na Internet via www.geocities.com/CapeCanaveral/4145/cont.html Arquivo capturado em 27/07/99.
- UFSC. **Pós-graduação em Biotecnologia – apresentação**. [On line] disponível na Internet via www.ccb.ufsc.br/biotecnologia/apre.htm Arquivo capturado em 10/08/99.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M., PEAKALL, D.B. - **Principle of ecotoxicology**. London, Taylor & Francis, 1996. 321p.