



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

**UTILIZAÇÃO DE PEIXES DO GÊNERO *ASTYANAX SP* COMO
BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NO RIO
SANTA MARIA, ROSÁRIO DO SUL - RS**

TCC

Mauro Eugênio Medina Nunes

São Gabriel

2013

MAURO EUGÊNIO MEDINA NUNES

**UTILIZAÇÃO DE PEIXES DO GÊNERO *ASTYANAX SP* COMO BIOINDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NO RIO SANTA MARIA, ROSÁRIO DO SUL -
RS**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Jeferson Luis Franco

São Gabriel

2013

Mauro Eugênio Medina Nunes

**UTILIZAÇÃO DE PEIXES DO GÊNERO *ASTYANAX SP* COMO BIOINDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NO RIO SANTA MARIA, ROSÁRIO DO SUL -
RS**

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Apresentada e aprovada em: 18/10/1/2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
(Orientador)
UNIPAMPA

Prof. Dra. Thaís Posser
(UNIPAMPA)

Msc. Ana Paula Zemolin
UFSM

FICHA CATALOGRÁFICA

[NUNES], [Mauro Eugênio Medina Nunes]

Utilização de Peixes do Gênero *Astyanax sp* como Bioindicadores de Contaminação Ambiental no Rio Santa Maria, Rosário do Sul - RS / Mauro Eugênio Medina Nunes. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2013.

[VIII], [43] f.:12 il.; 30 cm.

Orientador: Jeferson Luis Franco

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2013.

Referências: f. 36-43.

1. Bioquímica. 2. Biomarcadores. 3. Ecotoxicologia. 4. Biomonitoramento. 5. Ecossistema Aquático. 6. Biotecnologia – Monografia I. Franco, Jeferson Luis Franco.
- II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso.
- III. Utilização de Peixes do Gênero *Astyanax sp* como Bioindicadores de Contaminação Ambiental no Rio Santa Maria, Rosário do Sul - RS

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais pela educação, amor e carinho recebido durante todos os dias da minha vida. E agradeço a eles também pelo o apoio, a compreensão e pelas condições ótimas que me forneceram durante os anos de graduação. Exemplo de vida e de caráter que sempre me inspiraram sempre buscar o melhor e ser uma pessoa honesta digna da educação e dedicação dada.

Agradeço a minha namorada pelo amor, carinho, apoio, compreensão e companheirismo no qual vem me dando durante todos os dias desde que nos conhecemos e se intensificou nesses últimos anos. Também, por me inspirar a me tornar uma pessoa melhor, sempre me fazendo entender o ponto de vista das outras pessoas.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jeferson Luis Franco pelo o conhecimento e conselhos passados durante a minha formação. Por ter sido um verdadeiro pai dentro da Universidade sempre me proporcionando oportunidades e me inspirando a me tornar um profissional competente e apto, sempre com paciência, mas sem deixar falar o que precisava ser dito.

À Prof. Dra. Thaís Posser e doutoranda Ana Paula Zemolin pela assistência e conhecimento fornecido dentro do laboratório.

Aos colegas de laboratório, Dennis Costa, Litiele Cruz, Nathane Rodrigues, Jessica Batista, Ana Paula Ternes, Julianna Echeverria, Gustavo da Silva, Katiane Müller, Lorena Ras pant, Alana Bavaro, Illana Kemmerich e Rafaela Nasi e também aos meus colegas de classe, Pablo Echeverria, Gianfrancis Ugalde, Anna Carolina Boeck, Jeferson Camargo, Paulo Diniz e Guilherme Cruz pelas ajudas, risadas e pelo companheirismo durante estes anos de graduação.

Agradeço às instituições UNIPAMPA pela possibilidade de realização deste curso, e ainda a FAPERGS e pela bolsa de iniciação científica e pelos recursos financeiros concedidos.

E a todos os amigos e familiares que ajudaram, acreditaram e torceram pela minha formação.

RESUMO

Bioma Pampa localizado no extremo sul do Brasil é um ecossistema de grande biodiversidade e importante função ecológica. Entretanto, esta riqueza natural vem sendo academicamente negligenciada e também ameaçada devido à intensa atividade humana. O manejo inadequado de resíduos urbanos e crescente utilização de defensivos agrícolas são as principais causas dos problemas ambientais nos recursos hídricos do Bioma. Dentre eles encontra-se a bacia do Rio Santa Maria, responsável pelo abastecimento de algumas cidades da região da campanha. Devido à importância da manutenção dos recursos hídricos, esse estudo tem como objetivo avaliar o risco ecotoxicológico do Rio Santa Maria, utilizando peixes do gênero *Astyanax sp* capturados em um ponto localizado na cidade de Rosário do Sul – RS, Brasil, como bioindicadores. Este organismo modelo conhecido popularmente como lambari possui características ideais que o qualificam como bioindicador, tais como: o nível trófico que ocupam e sua ampla distribuição geográfica. Observando alterações em biomarcadores bem caracterizados em outros estudos ecotoxicológicos, como diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase, que esta relacionada à contaminação por pesticidas do ambiente por pesticidas organofosforados e carbamatos, e o aumento na atividade de enzimas antioxidantes envolvidas nas rotas de detoxicação (GST, CAT, GPx e TrxR), assim como também o aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica, hidroperóxidos totais e GSH é possível observar que esses animais vem sofrendo estresse oriundo das atividades humanas na região, principalmente no que se refere a contaminação aquática.

PALAVRAS-CHAVE: *Astyanax sp*, Bioma Pampa, Rio Santa Maria, contaminação aquática, bioindicadores e biomarcadores.

ABSTRACT

Pampa biome located in southern Brazil is an ecosystem of great biodiversity and important ecological function. However, this natural wealth is being neglected academically and also threatened due to intense human activity. Inadequate management of waste and increasing use of pesticides is the main causes of environmental problems in water resources of this biome. Among them is located the basin of the Santa Maria River, responsible for supplying of water to some cities. Due to the importance of maintenance of water resources, this study aims to assess the ecotoxicological risk of the Santa Maria River, using fish genus *Astyanax sp* captured at a point located in Rosario do Sul - RS, Brazil, as bioindicators. This model organism popularly known as lambari has ideal characteristics that qualify as bioindicator, they are: the trophic level they occupy and their large geographical distribution. Observing changes in well-characterized biomarkers in ecotoxicological studies, as decreased activity of the enzyme acetylcholinesterase, which is related to pesticide contamination of the environment by pesticides organophosphates and carbamates, and the increase in the activity of antioxidant enzymes involved in detoxification routes (GST, CAT, GPx and TrxR), as well as the significant increase in the levels of lipid peroxidation, totals hydroperoxides and GSH is observed that these animals has suffered stress arising from human activities in the region, particularly in relation to water contamination.

KEYWORDS: *Astyanax sp*, Pampa Biome, Santa Maria River, water contamination, bioindicators and biomarkers.

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, consta uma breve revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta monografia.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta monografia estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**.

No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta monografia, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados do manuscrito presentes neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONCLUSÕES** desta monografia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 BIOMA PAMPA.....	11
1.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	12
1.3 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	12
1.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	15
1.5 BIOINICADORES E BIOMARCADORES.....	16
1.5.1 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	18
1.6 ORGANISMO MODELO – GÊNERO <i>Astyanax sp</i>.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 QUÍMICOS UTILIZADOS.....	25
4.2 AMOSTRAS.....	25
4.3 DETERMINAÇÃO ACETILCOLINESTERASE.....	26
4.4 DETERMINAÇÃO ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	26
4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E TOTAL DE HIDROPEROXIDOS.....	26

4.5 ESTADO TIOL.....	26
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 ATIVIDADE ACETILCOLONESTERASE.....	28
5.2 ATIVIDADE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	29
5.3 NÍVEIS DE GUTATIONA, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E HIDROPERÓXIDOS TOTAIS	31
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS	36

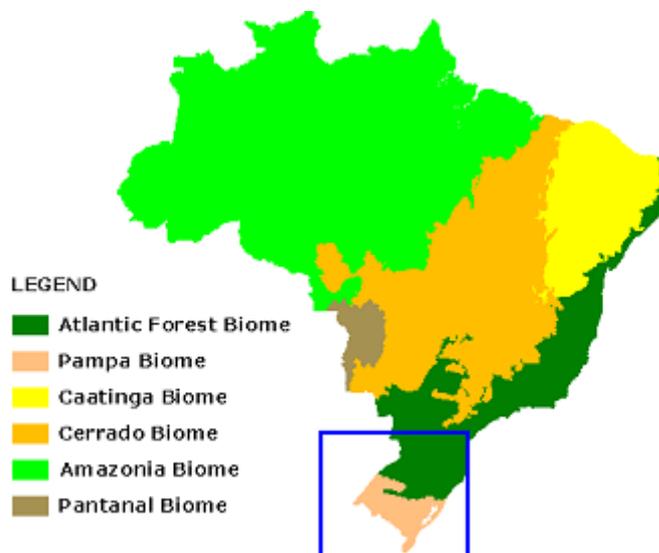
1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMA PAMPA

O bioma pampa ocupa mais da metade da área (63%) do estado do Rio Grande do Sul (figura 1), cobrindo uma área de 176,496 km² dentro do estado (IBGE, 2004) e 2,1 % do território brasileiro (COLLARES, 2006), tendo tamanho total de aproximadamente 700.000 km², estendendo-se para a Argentina e Uruguai (BILENCA & MIÑARRO, 2004). Este bioma é caracterizado por apresentar como paisagem original campos cobertos por pastagens e florestas estacionais decíduas e florestas ombrófitas densas nas zonas em que o bioma faz transição para Mata Atlântica (IBGE, 2004).

Os campos do Bioma Pampa apresentam áreas com alta diversidade de plantas e animais. No entanto, a sua conservação tem sido ameaçada pelo aumento da degradação causada pelo uso inadequado de espécies exóticas (PILLAR et al., 2009) e também pelo uso inadequado da terra nas atividades agrícolas, devido a perda do hábitat e utilização de agroquímicos (WILCO, 1995; MIKHAIL, 2013). Realidade esta que vem sendo agravada pela conversão de áreas de pastagens por monoculturas de eucalipto, soja e arroz (IBGE, 2006).

FIGURA 1 - Os seis biomas terrestres, de acordo com a classificação oficial brasileira.



1.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

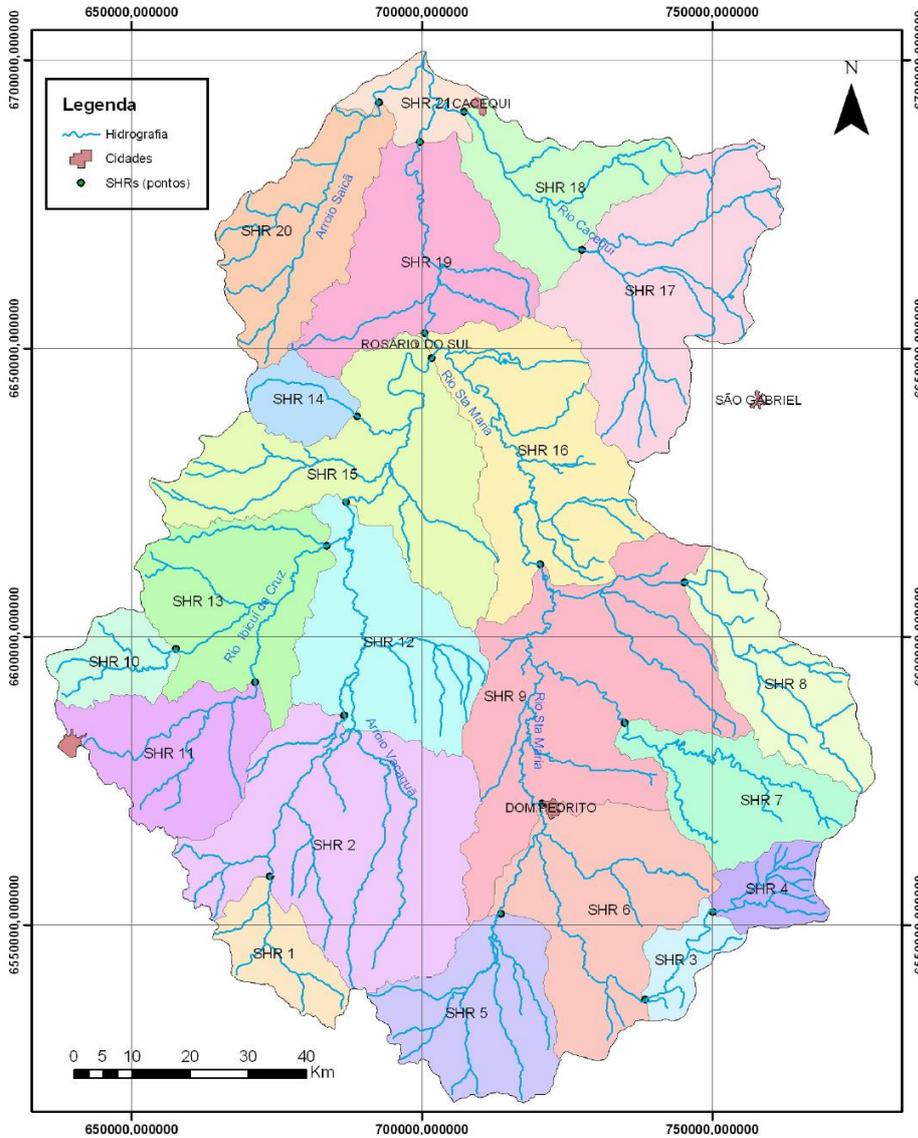
O local de estudo situou-se em um ponto do Rio Santa Maria na cidade de Rosário do Sul no estado do Rio Grande do Sul. O Rio Santa Maria é um dos principais rios formadores da Bacia do Rio Santa Maria junto com o Arroio Taquarembó, Arroio Santo Antônio, o Rio Cacequi, o Arroio Poncho Verde, o Rio Ibicuí da Armada e o Arroio Saicã. Esta bacia situada no sudeste gaúcho, entre as coordenadas 29°47' e 31°36' de latitude Sul e 54°00' e 55°32' de longitude Oeste, abrangendo sete municípios, cobrindo uma área de 15.720,96 km² (figura 2), atendendo uma população de 186.116 habitantes, é responsável pelo abastecimento das atividades econômicas da região, na qual destacam os setores primários de produção, como a orizicultura, pecuária e extração de areia. As águas desta bacia também são úteis no uso recreativo em balneários da região (FEPAM, 2013).

Segundo WANDSCHEER (2004), em um estudo sobre a avaliação da Bacia do Rio Santa Maria, foi observada a existência de possíveis pontos de contaminação diversos, tais como: lixiviados produzidos por resíduos sólidos dispostos em lixões a céu aberto, esgotos líquidos industriais, uso de fertilizantes e agroquímicos diversos na agricultura, substâncias químicas usadas na suplementação do gado, ovinocultura e postos de combustíveis na zona urbana e industrial.

1.3 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

O ambiente aquático compreende vários ecossistemas os quais se encontram rios, lagos e oceanos. Todos estes ecossistemas são altamente complexos devidos às interações bióticas e abióticas particulares de cada um (RAND et al., 1995). Desse modo, as características físico-químicas de um recurso hídrico podem afetar drasticamente os organismos dependentes deste recurso. Sendo os sistemas aquáticos abertos e dinâmicos os que mais variam suas características químicas, devido à suscetibilidade a entrada de contaminantes oriundos das atividades urbanas e agrícolas por despejo direto, drenagem, percolação lateral, escoamento superficial e subsuperficial, erosão, deriva e volatilização (ORSOLIN DA SILVA, 2009).

FIGURA 2- Mapa das Seções Hidrológicas da Bacia do Rio Santa Maria



Fonte: <http://www.comiteriosantamaria.com.br>

A contaminação dos recursos hídricos, como: rios, lagos, zonas costeiras e baías têm ocorrido principalmente devido a geração e o manejo inadequado dos resíduos urbanos, agroquímicos e dejetos industriais, sendo este último o mais perigoso devido a descara de resíduos químicos letais, como: metais pesados, benzeno e enxofre. Estes resíduos químicos podem causar impactos irreversíveis na fauna e na saúde das populações que deste recurso hídrico dependem (RATTNER, 2009).

Outra forma também muito comum de contaminação dos recursos hídricos se dá pelo acúmulo de compostos orgânicos na água, geralmente provocado pelo despejo de esgoto urbano ou despejo de dejetos de aves e suínos oriundos de criadouros. A acumulação destes dejetos na água pode causar o acúmulo de fósforo, causando o processo de eutrofização (BERWANGER et al., 2008). O processo de eutrofização é o crescimento exacerbado de algas e plantas aquáticas, podendo chegar a causar interferência e comprometimento do uso dos corpos d'água (THOMANN, 1987), devido a desequilíbrio na concentração do oxigênio dissolvido na água (OD), ocasionado pelo maior consumo de oxigênio por parte das algas e plantas. Neste caso, pode ocorrer a solubilização de fosfato, aumentando a concentração de gás sulfídrico, metano e amônia. O favorecimento do crescimento de cianobactérias nessa situação pode gerar a produção de substâncias tóxicas excretadas por estas bactérias, produzindo odores e sabores desagradáveis na água. A água se torna turva, e em casos mais graves podendo gerar a mortalidade de peixes (MOTA, 2006).

Dentre os principais problemas de degradação dos recursos hídricos encontram-se a contaminação por pesticidas, herbicidas e fertilizantes, promovido pelo crescimento da atividade agrícola (MARCHESAN et al., 2009). Apesar de alguns estudos demonstrarem que a percentagem dos agroquímicos que atingem os recursos hídricos superficiais é baixa, devido à baixa solubilidade desses agroquímicos em água e também pelo fator de diluição (HIGASHI, 1991). Entretanto, isto não descarta a possibilidade de que concentrações maiores possam ser depositadas nos recursos de forma não pontuais, na qual os xenobióticos são lançados de forma difusa ou indireta nos recursos hídricos devido a processos de escoamento, drenagem e lixiviação (CEREJEIRA et al., 2003). A contaminação também pode ocorrer pelo transporte atmosférico devido à volatilização dos compostos presentes nos agroquímicos e pela formação de poeira do solo contaminado (COOPER, 1993). Estes tipos de contaminações são difíceis de serem avaliadas, pois o grau de contaminação pode variar conforme o sistema clima, uma vez que as chuvas podem tanto diluir a concentração de um contaminante presente na água como também podem transportar mais contaminantes para os recursos hídricos através da lixiviação. Estas características acompanhadas do uso indiscriminado de agroquímicos ao longo do tempo têm provocado à acumulação de compostos químicos nocivos no ambiente aquático, podendo gerar também a bioacumulação. Este contexto tem sido relacionado com problemas de contaminação ambiental e saúde pública (BITTENCOURT, 2004). O que resulta em um quadro baixo e contínuo de contaminação, que nem sempre é captado pelos métodos analíticos tradicionais.

Dentre a ampla gama de agrotóxicos utilizados na agricultura nas últimas décadas, destacam-se os pesticidas organofosforados e carbamatos, usados mundialmente. Estes pesticidas são empregados no controle de insetos e outros invertebrados. Apesar de ser rapidamente metabolizados e excretados pela maioria dos organismos vivos, devido essa classe de pesticidas não possui característica acumulativa nas cadeias tróficas (SOGORB, 2002), a massiva aplicação dessa classe de pesticidas gera repetidas exposições dos organismos aquáticos a estes xenobióticos (BANAS, 1986). Uma vez que, a maioria destes pesticidas apresenta toxicidade sobre organismos não alvos, devido a sua ação tóxica não seletiva (HAGAR, 2002), a toxicidade desses compostos geralmente não pode ser percebida pelo fato que muito desses compostos permanecem em níveis subletais no ambiente aquático, não gerando mortalidade instantânea de espécies aquáticas (FANTA et al., 2003). Entretanto, a contaminação subletal pode alterar vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, prejudicando sobrevivência da espécie no ambiente (SANCHO et al., 1992).

1.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos de substâncias químicas sobre organismos vivos (ZAKRZEWSKI, 1994). Esta ciência tem como principal objetivo identificar riscos associados à exposição de um organismo a uma substância química e também em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (JAMES et al., 2000).

No meio ambiente existem uma gama grande de contaminantes oriundos da atividade humana, em vista dessa realidade existe a toxicologia ambiental, um dos ramos da toxicologia encarregada de estudar o destino dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos de degradação no ambiente e nas cadeias alimentares e com o efeito desses contaminantes sobre os organismos e as populações. Esse ramo é muito importante, uma vez que o homem junto com a fauna também está inserido no meio ambiente e consome os recursos naturais, tendo a sua saúde dependente do equilíbrio do ecossistema e da disponibilidade de ar, água e solo livres de contaminantes (HODGSON, 2004). Devido à importância da qualidade da água para o consumo humano como também para os ecossistemas, vem crescendo os estudos no ramo da toxicologia ambiental, que também pode ser denominada ecotoxicologia aquática. Este ramo tem como objetivo avaliar os efeitos de xenobióticos sobre organismos representativos do ecossistema aquático (RAND et al., 1995).

Os danos ocasionados por contaminantes nos ecossistemas aquáticos podem ser detectados desde respostas fisiológicas e bioquímicas até níveis de populações e comunidades (ADAMS, 2003). Os testes toxicológicos são bastante utilizados, devido à vulnerabilidade dos recursos hídricos a contaminantes, sejam eles despejados diretamente nos corpos d'água ou carregados por processos de lixiviação. Devido esta suscetibilidade dos recursos hídricos ao acúmulo de contaminantes e sua importância ambiental, os testes toxicológicos se tornaram uma ferramenta importante para a determinação da qualidade da água e a os danos no ecossistema aquático. Desse modo, somente os métodos físico-químicos tradicionais de avaliação, como: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta performance (HPLC), espectrofotometria de massa (MS) (PERES et al, 2003), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), não são o suficientes para diagnosticar quais e em qual concentração uma substância é tóxica ou inerte às comunidades aquáticas (RONCO et al., 2004). Pois, a toxicidade de um composto químico depende do tempo de exposição, suscetibilidade do organismo, características químicas dos contaminantes e também dos fatores ambientais (TOMITA, 2002).

1.5 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES

Devido à dificuldade de avaliar todos os tipos de químicos em ambientes aquáticos, o uso de bioindicadores para medir os níveis de poluição é muito importante (RANK, 2005). A avaliação toxicológica de um ambiente junto com o biomonitoramento está ligada a avaliação de bioindicadores. O termo bioindicadores refere-se a uma técnica de monitoramento ambiental empregada na ecotoxicologia, na qual busca informações através da resposta biológica de determinados organismos em exposição à xenobióticos (WHO, 1996). Qualquer animal pode ser considerado um bioindicador, desde que sobreviva em ambientes saudáveis e também apresente resistência relativa quando exposto a contaminantes, refletindo os primeiros efeitos da contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002). Outras características como a ampla distribuição geográfica, abundância, fácil captura e facilidade na adaptação em ensaios laboratoriais também são importantes facilitando e gerando resultados mais confiáveis quando utilizados como bioindicadores (AKAISHI, 2004).

Os organismos situados no topo da cadeia trófica são os mais utilizados como bioindicadores, pois consomem os organismos de níveis tróficos inferiores, desse modo

bioacumulando contaminantes e desenvolvendo efeitos acumulativos e crônicos. (LINS et al., 2010).

No ecossistema aquático, os peixes são muito utilizados como bioindicadores de contaminação aquática, uma vez que são sensíveis aos efeitos da poluição e estão inseridos nos níveis tróficos tanto como predadores como também em transformadores da matéria orgânica em proteínas (MARTINEZ, 2002).

Os efeitos de contaminantes em peixes podem causar alterações em vários níveis de organização biológica, como: disfunções fisiológicas, alterações em tecidos e modificações comportamentais prejudicando o crescimento e reprodução (ADAMS, 1990). Essas alterações podem ocorrer na forma de dano à organização biológica ocasionada pela exposição à xenobióticos ou uma resposta do organismo a presença desses contaminantes, de modo manter as funções biológicas básicas do organismo protegidas. Estas respostas a uma situação de estresse provocada pela exposição a contaminantes podem ser utilizadas como biomarcadores (WALKER et al., 1996).

Biomarcadores são ferramentas excelentes para avaliar e monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos, de modo, que é possível através dos biomarcadores identificar os sinais iniciais provocados pelos xenobióticos poluidores ao organismo utilizado como bioindicador (WALKER et al., 1996).

Segundo LIVINGSTONE (1993), biomarcadores podem ser considerados os fluídos corpóreos, células ou tecidos que indicam em níveis bioquímicos e celulares a presença de contaminantes. Respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas também podem ser considerados biomarcadores. Biomarcadores podem pertencer a níveis moleculares, celulares e sistêmicos, desde que respondam de forma significativa a exposição a contaminantes, sendo alguns dos biomarcadores específicos a determinadas substâncias.

Dentre a vasta gama de biomarcadores, os mais utilizados em estudos de contaminação aquática se encontram-se a biotransformação de enzimas (fase I e II), parâmetros de estresse oxidativo, produtos de biotransformação, proteínas de resistência multixenobiótica (MXR), parâmetros imunológicos, reprodutivos ou endócrinos, parâmetros genotóxicos, neurológicos, neuromusculares, fisiológicos, histológicos e morfológicos (VAN DER OOST, 2003).

Segundo VAN DER OOST (2003), os biomarcadores podem ser considerados como de suscetibilidade, de exposição ou de efeito. Sendo os biomarcadores de susceptibilidade indicadores da habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder a ação de um

xenobiótico específico no qual esteja em contato. Podendo incluir fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a essa exposição. Os biomarcadores de exposição podem ser definidos, segundo DEPLEDGE (1995) como o próprio xenobiótico ou produto da interação entre xenobiótico e o organismo. Já os biomarcadores de efeito representam alterações químicas, fisiológicas e comportamentais que modificam o equilíbrio biológico do organismo (VAN DER OOST, 2003). Esses marcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos devem ser capazes de indicar diferentes respostas à presença de agentes estressores distintos (HUGGETT et al., 1992).

1.5.1 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Vários estudos têm relacionado à regulação da atividade de enzimas antioxidantes em resposta ao estresse provocado pela exposição à xenobióticos. Este estresse pode ocorrer devido à ação de xenobiontes sobre a regulação redox celular, pelo metabolismo de citocromos, ou pela presença de íons metálicos livre, gerando ciclos de reações oxidantes (REGOLI et al., 2002).

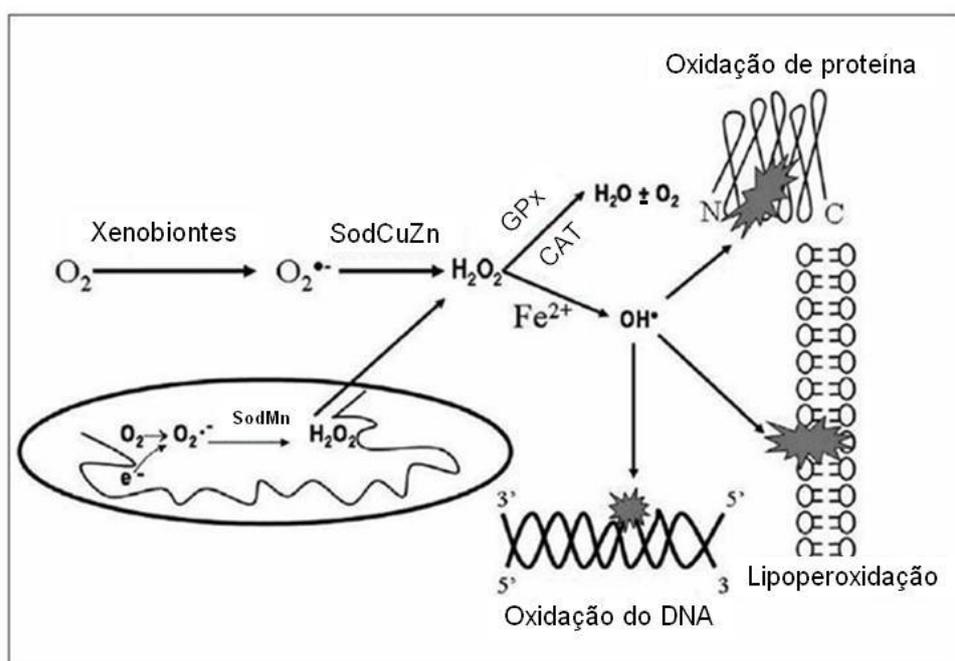
O estresse ocasionado pela desregulação redox celular é provocado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e oxigênio singlet (O_1) (AVILEZ et al., 2008). Apesar das ERO apresentarem importantes funções celulares (VALKO, 2007), a ação de xenobióticos presentes no ambiente pode interferir neste equilíbrio redox celular, seja pela indução da formação excessiva de EROS ou pela ineficiência do sistema de detoxicação celular, promovendo o estresse oxidativo (REGOLI et al., 2002). O estresse oxidativo provoca danos a proteínas, lipídios e DNA (figura 4), caso as defesas antioxidantes não sejam capazes de neutralizá-las antes de reagir (RAMAKRISHNAN et al., 2007). Quando há limitação nestes sistemas antioxidantes, podem ocorrer diversas lesões cumulativas, levando a disfunção e morte celular (ATOUI et al., 2005).

Dentre as defesas celulares utilizadas como biomarcadores encontram-se sistemas não enzimáticos como o tripeptídeoglutationa e as enzimas antioxidantes como a glutathionaperoxidase (GPx), glutathionaredutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST), tioredoxinaredutase (TrxR) e catalase (CAT) (HUBER, 2008; WINTERBOURN et al., 1987).

A enzima catalase (CAT), é um componente do sistema de defesa antioxidante primário, tendo a sua atividade aumentada quando o organismo se encontra em estresse oxidativo primeira, resposta celular a essa situação. A CAT tem como função específica neutralizar H_2O_2 e a oxidação de compostos hidrogenados como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (AEBI, 1984).

O tripeptídeo glutathiona possui um radical sulfidril na sua estrutura e pode ser apresentada na forma reduzida de tiol (GSH) ou na forma oxidada (GSSG), na qual dois tripeptídeos são ligados por dissulfuretos (KOSOWER, 1978). A GSH possui funções antioxidantes, como controle de proteínas estado redox e na defesa contra EROS e radicais livres. Esta função antioxidante se dá devido a sua composição gama-glutamil-cisteinil-glicina, atuando contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos. Essa capacidade antioxidante se dá pelo grupamento reativo de sua cisteína, o grupamento tiol (-SH). A maior concentração da forma reduzida em relação à forma oxidada desse tripeptídeo é uma forma de avaliar o índice de estresse oxidativo, uma vez que há maior reserva de GSH para interagir com os agentes oxidantes (KOSOWER, 1978).

FIGURA 4- Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobiontes.

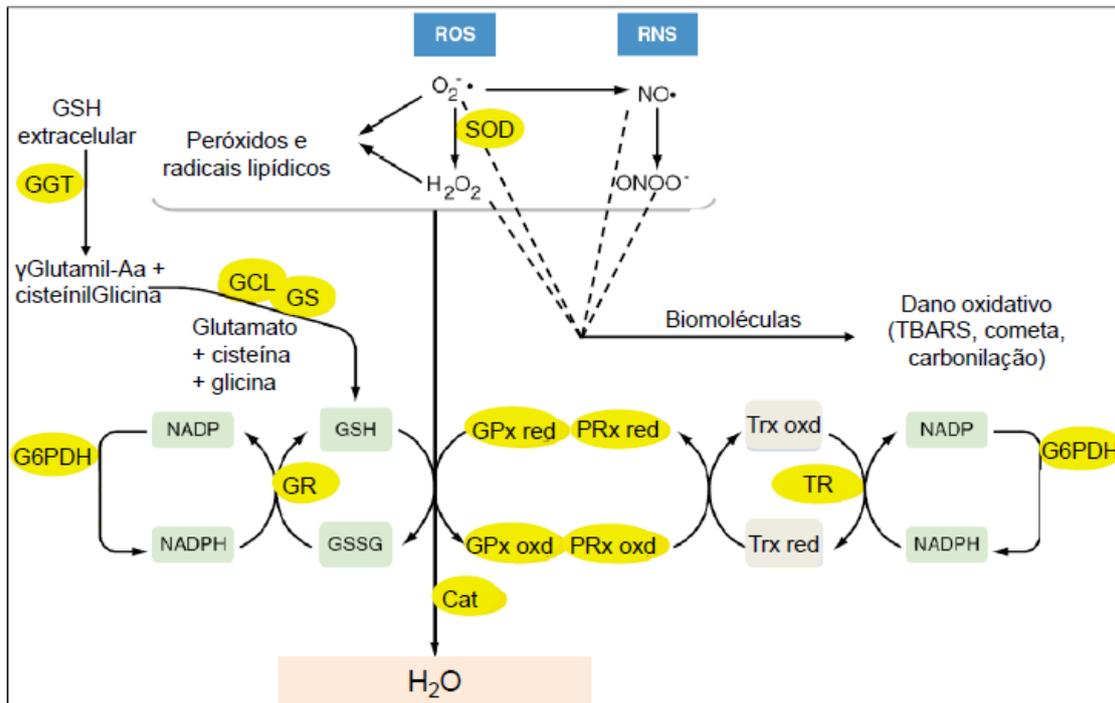


Fonte: Trevisan, 2010.

A enzima responsável pela reciclagem de GSSG é a flavoproteína glutatona redutase (GR), na qual reduz a forma oxidada em reduzida, utilizando NADPH como fonte de elétrons e prótons para a reação de redução, deixando o tripeptídeo pronto para ser reutilizando no sistema de defesa antioxidante (BERG et al., 2004). A oxidação da glutatona é promovida pela enzima glutatona peroxidase (GPx), que exerce função importante na detoxificação de EROS, H_2O_2 e peróxidos orgânicos, cofatores para formação de GSSG (ELIAS et al., 2000).

Outra proteína moduladora da GSH é a enzima glutatona-S-transferase (GST), por sua vez, pertence também a família de proteínas multifuncionais envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. A GST tem função catalítica na conjugação da GSH com compostos endógenos ou exógenos de poluentes, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados. Esta enzima também pode atuar como peroxidases, isomerasas ou ainda tiol transferase (HUBER et al., 2008).

FIGURA 5- Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.



Fonte: KENSLER et al., 2007

O sistema tioredoxina é o maior sistema redox celular presente em todos os organismos. É constituído pela tioredoxinaredutase (TrxR), tioredoxina (Trx) e NADPH

(PAPP et al., 2007). O nível de TrxR é um importante biomarcador de contaminação aquática, uma vez que vários estudos demonstraram sua atividade alterada em organismos expostos a certos xenobióticos, devido a sua sensibilidade a alterações no estado redox da celular e o seu envolvimento no controle da proliferação celular (HOLMGREN, 2000). A TrxR é responsável pela redução da Trx através da transferência de elétrons de NADPH para o FAD (PAPP et al., 2007).

A sensibilidade da TrxR a condições de estresse oxidativo e por ser a única enzima que cataliza a redução da Trx, sua ineficiência pode afetar a interação com outras moléculas e ter importância no início da sinalização celular em resposta ao estresse oxidativo (GANter, 1999). Uma vez que, o sistema tioredoxina catalisa a redução do ribonucleotídeo redutase, essencial para a duplicação do DNA (HOLMGREN, 1985), e também esta envolvida diretamente na regulação da expressão gênica por meio do controle redox de fatores de transcrição como receptores de glicocorticoides, e quinases reguladoras da apoptose, modulando indiretamente as atividades celulares como proliferação, morte programada e ativação da resposta imune (PAPP et al., 2007).

Para a presença de pesticidas organofosforados e carbamatos é usado como biomarcador a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é responsável pela remoção do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Estes pesticidas combinam-se aos resíduos de aminoácidos para inativar esta enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh presente nas fendas sinápticas e junção neuromuscular durante a transmissão colinérgica (JUNG et al., 2007). Esta inibição ocorre tanto em organismo vertebrados como em invertebrados (HABIG, 1991).

As colinesterases são divididas em duas classes: os acetilcolinesterase (AChEs) e os butyrylcholinesterases (BChEs). Nos peixes, a AChEs ocorrem principalmente no cérebro e tecido muscular, enquanto que as BChEs ocorrem no fígado e plasma (HABIG, 1991).

1.6 ORGANISMO MODELO – GÊNERO *Astyanax sp*

O gênero *Astyanax* pertence à subfamília Tetragonopterinae dentro da família Characidae, mesma família das piranhas, pacus, peixe cachorro e dourados. Esta subfamília é encontrada ao longo da América do Sul e América Central, sendo popularmente chamado de lambari na região Sul e de piabas na região central do Brasil (BRITSKI, 1972).

Em um total de 86 espécies segundo a última revisão realizada por LIMA et al. (2003), estas espécies apresentam características morfológicas muito similares de modo que sua separação tem sido muito difícil para os taxonômicos (FERNANDES, 2004). De modo que a sua utilização como bioindicadores vem sendo usada em nível de gênero.

Este gênero tem como principal característica a sua função ecológica como espécie de forrageira (GODOY, 1975), sendo considerados transformadores de partículas orgânicas em proteínas devido aos seus hábitos alimentares como zooplânctívoras, insetívoras e onívoras (SANTOS, 1981), sendo considerados oportunistas. Sua importância ecológica é notável, devido a sua localização na cadeia trófica na qual servirão de alimento para aves e peixes em níveis tróficos superiores (GODOY, 1975).

A espécie do gênero *Astyanax* com maior distribuição é a espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 3), conhecida popularmente por lambari relógio ou lambari-de-rabo-amarelo. Caracterizada por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvica são amareladas. Também apresenta uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos na cauda, separando os lobos superior e inferior. Na parte superior da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI, 2000). Entretanto, as populações dessa espécie não são morfológicamente homogêneas. O sucesso adaptativo dessa espécie é devido a sua plasticidade alimentar, facilidade na reprodução, sendo que esta espécie apresenta atividade exploratória (ORSI, 2002).

FIGURA 3- Exemplar de *Astyanax altiparanae*. Barra=3 cm

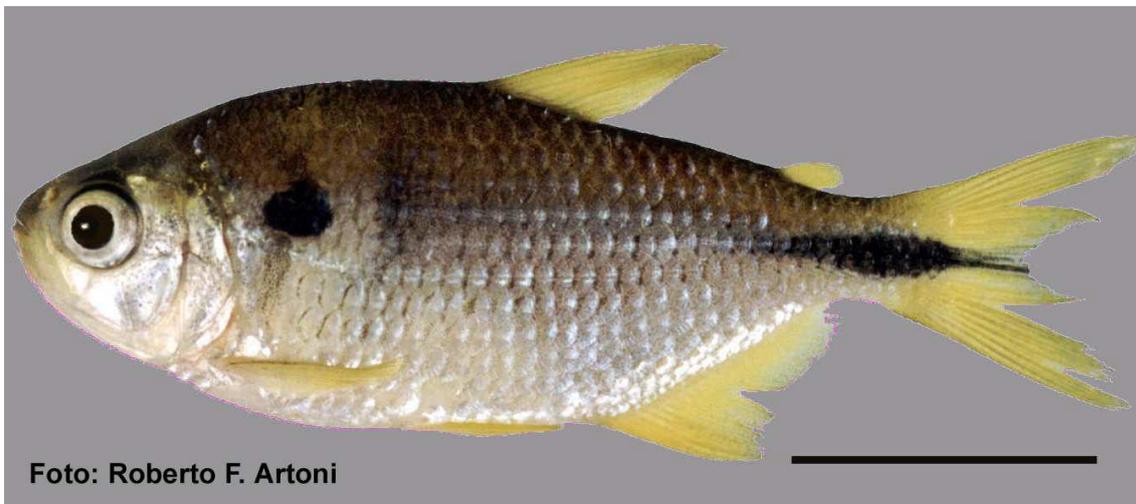


Foto: Roberto F. Artoni

Fonte: RAMSDORF, 2007

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo investigar os riscos ecotoxicológicos causados pela atividade agrícola e urbana da cidade de Rosário do Sul, estado do Rio Grande do Sul – Brasil, no Rio Santa Maria. Utilizando como modelo animal o peixe popularmente conhecido por lambari (*Astyanax sp*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in situ* as alterações bioquímicas e fisiológicas de biomarcadores dos peixes do gênero *Astyanax* nativos do Rio Santa Maria.
- Avaliar a atividade da enzima AChE, utilizadas como biomarcadores, em peixes do gênero *Astyanax* capturados no Rio Santa Maria.
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase e tioredoxina redutase), utilizadas como biomarcadores, em peixes do gênero *Astyanax sp* capturados no Rio Santa Maria.
- Determinar a indução de lipoperoxidação em peixes do gênero *Astyanax sp* capturados no Rio Santa Maria.
- Determinar os níveis de hidroperóxidos totais e GSH em peixes do gênero *Astyanax* capturados no Rio Santa Maria.

3. JUSTIFICATIVA

Até o momento poucos estudos foram desenvolvidos sobre a qualidade da água do Rio Santa Maria e nenhum estudo relatando o risco ambiental e a saúde do ecossistema aquático. Os estudos que existem sobre a qualidade da água do Rio Santa Maria se detêm apenas em métodos tradicionais de determinação, sem avaliar o real efeito da atividade humana sobre a comunidade aquática. Além disto, poucos estudos têm utilizado peixes do gênero *Axyanax* como bioindicadores em estudos de toxicologia aquática, uma vez que as características desse organismo se adaptam perfeitamente as qualificações de um bioindicador. É clara a necessidade de um estudo que avalie a real situação da comunidade aquática desse ecossistema sobre a atividade e também é importante que se estabeleçam bases e fundamentos teóricos quanto à utilização destes animais como bioindicadores, a fim de complementar e facilitar as análises de dados destes trabalhos.

Através deste modelo de estudo, espera-se compreender melhor os efeitos da atividade humana na região, apontando possíveis fatores de risco ambiental sobre o ecossistema aquático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 QUÍMICOS UTILIZADOS

A glutationa redutase (G3664), glutationa reduzida (GSH), a glutationa oxidada fluidizado (GSSG), terc-butil-hidroperóxido (t-BOOH), 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), nicotinamida-adenina 2-fosfato de dinucleótido reduzido hidrato de sal tetrassódico (NADPH), assim como todos os outros produtos químicos utilizados no presente trabalho foram a partir da mais elevada pureza analítica.

4.2 AMOSTRAS

Os animais foram capturados utilizando uma armadilha feita manualmente com malha plástica (1.0 x 1.0 cm) em um ponto do rio Santa Maria na cidade de Rosário do Sul, estado do Rio Grande do Sul – Brasil (S1), coordenada: 30° 15' 00.04" S 54° 54' 42.22" O. Este ponto de coleta foi escolhido devido à sua proximidade com áreas agricultáveis, despejo de águas pluviais e uma área amplamente utilizada por banhistas neste município. Após a coleta, os animais foram transportados para o laboratório em bombonas plásticas e transferidos para aquários com oxigenação constante contendo a própria água do ponto de coleta. Após período de adaptação, os animais foram anestesiados em gelo e eutanaziados por ruptura cervical para a extração do cérebro e de parte do tecido muscular dos peixes. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em tampão HEPES 20mM, pH 7,0. O homogeneizado foi centrifugado a 1000g durante 5 minutos a 4°C, sendo uma parte do sobrenadante retirado para a determinação da atividade da enzima AChE. O restante do sobrenadante foi centrifugado a 20000g durante 30 minutos a 4°C para a determinação da atividade das enzimas GST, GR, GPx, CAT e TrxR, e também para a quantificação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e hidroperóxidos totais. Para o controle os animais foram coletados em local com moderada preservação ambiental e mantidos em quarentena em aquários com oxigenação constante para depuração em água potável.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA AChE

A atividade enzimática foi determinada em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visível. A atividade da AChE foi determinada utilizando o ensaio descrito por Ellman et al. (1961) com algumas alterações, utilizando tampão de fosfato (KPi) 0,25 M, pH 8, EDTA 1mM, DTNB 5 mM e tiocolina 7,25 mM como substrato.

4.4 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade enzimática foi determinada em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visível. Resumidamente, GR reduz a GSH a GSSG, gastando NADPH, o desaparecimento dos quais pode ser medida a 340 nm (CARLBERG & MANNERVIK, 1985). A atividade GPx1 e GPx4 foi determinada utilizando o ensaio descrito por acoplado WENDEL (1981), que monitora indiretamente o consumo de NADPH a 340 nm, utilizando terc-butil-hidroperóxido a GSSG como gerador nas condições do ensaio. Glutathione-transferase (GST), a atividade foi analisada pelo procedimento do HABIG & JAKOBY (1981), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato. A atividade da catalase (CAT) foi medida de acordo com AEBI (1984). TrxR atividade foi medida com base no método de HOLMGREN & BJORNSTEDTE (1995).

4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E TOTAL DE HIDROPERÓXIDOS

Produtos finais da peroxidação lipídica foram quantificados como substância reativa ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de OHKAWA et al. (1979) com pequenas modificações. Alíquotas das amostras foram incubadas em ácido acético 0,45M /HCl pH 3,4, 0,28% ácido tiobarbitúrico, SDS 1,2%, a 95° C durante 60 minutos e, em seguida, a absorbância medida a 532 nm. Os valores de TBARS foram normalizados pela concentração de proteína. Os resultados foram expressos como porcentagem dos controles.

4.6 ESTADO TIOL

A glutationa (GSH) foi medida como tióis não proteicos baseado em ELLMAN (1969) com pequenas modificações (FRANCO et al., 2006). Tióis de Proteínas (PSH) foram medidos por espectrofotometria utilizando reagente de Ellman. O sedimento da amostra de GSH foi lavado com ácido perclórico 0,5 M e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente na presença de uma solução contendo 0,15 mM de DTNB, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0, e SDS a 0,1%. PSH foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A amostra em branco, sem reagente de Ellman foi executado simultaneamente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Duncan, quando apropriado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$ para GPx, GST, GSH, ACHE, TBARS e total de hidroperóxidos e $P < 0,01$ para CAT.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ACETILCOLINESTERASE

A enzima AchE apresentou atividade diminuída significativamente no tecido muscular (Figura 6A) dos animais coletados no rio Santa Maria em comparação ao controle estabelecido. O tecido cerebral não apresentou diminuição estatisticamente significativa em comparação ao controle (figura 6B).

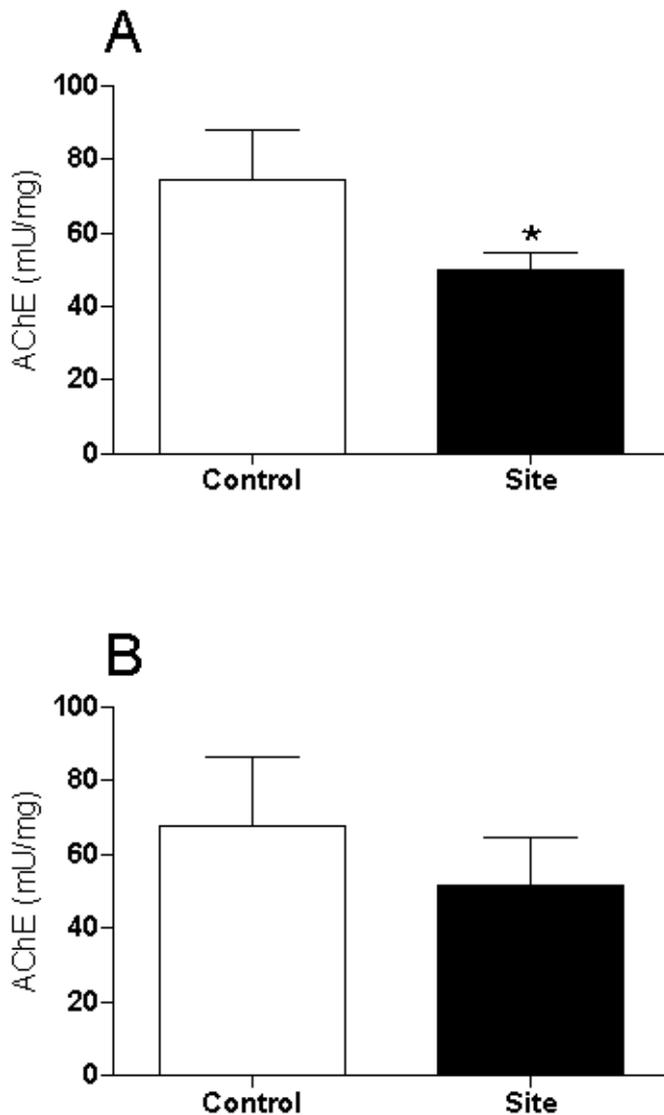


FIGURA 6-Atividade da enzima AchE de peixes coletados em um ponto do Rio Santa Maria, São Gabriel – RS. Após a eutanásia dos animais capturados foi determinadas a atividade da enzima AchE no músculo (A) e no

cérebro (B) dos animais. . Dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU/mg de proteína total. * P <0, 05.

5.2 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Observou-se um aumento significativo na atividade da enzima GST no músculo (Figura 7A) e no cérebro (Figura 7B) dos animais coletados no rio Santa Maria em relação ao controle. Houve aumento também na atividade da enzima CAT, entretanto, apenas no tecido muscular (Figura 7C). O mesmo resultado não foi observado no tecido cerebral.

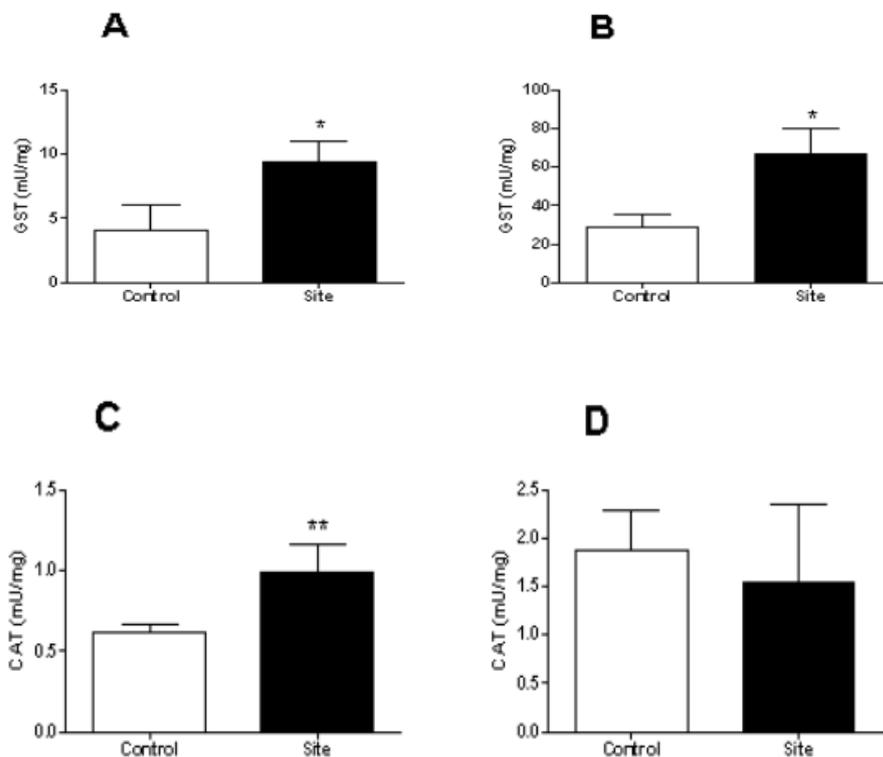


FIGURA 7- Atividade de enzimas antioxidantes de peixes coletados em um ponto do Rio Santa Maria, São Gabriel – RS. Após a eutanásia dos animais capturados foi determinado a atividade da enzima GST no tecido muscular (A) e no tecido cerebral (B). Também foi determinada a atividade da enzima CAT no tecido muscular (C) e cerebral (D). Dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU/mg de proteína total. * P <0, 05 e ** P <0,01.

Outras enzimas envolvidas no processo antioxidante também apresentaram aumento na sua atividade nos animais capturados no Rio Santa Maria perante o controle. Entre as

enzimas moduladores de GSH apenas a GR não apresentou alterações na sua atividade tanto no tecido muscular (figura 8C) e cerebral (figura 8D).

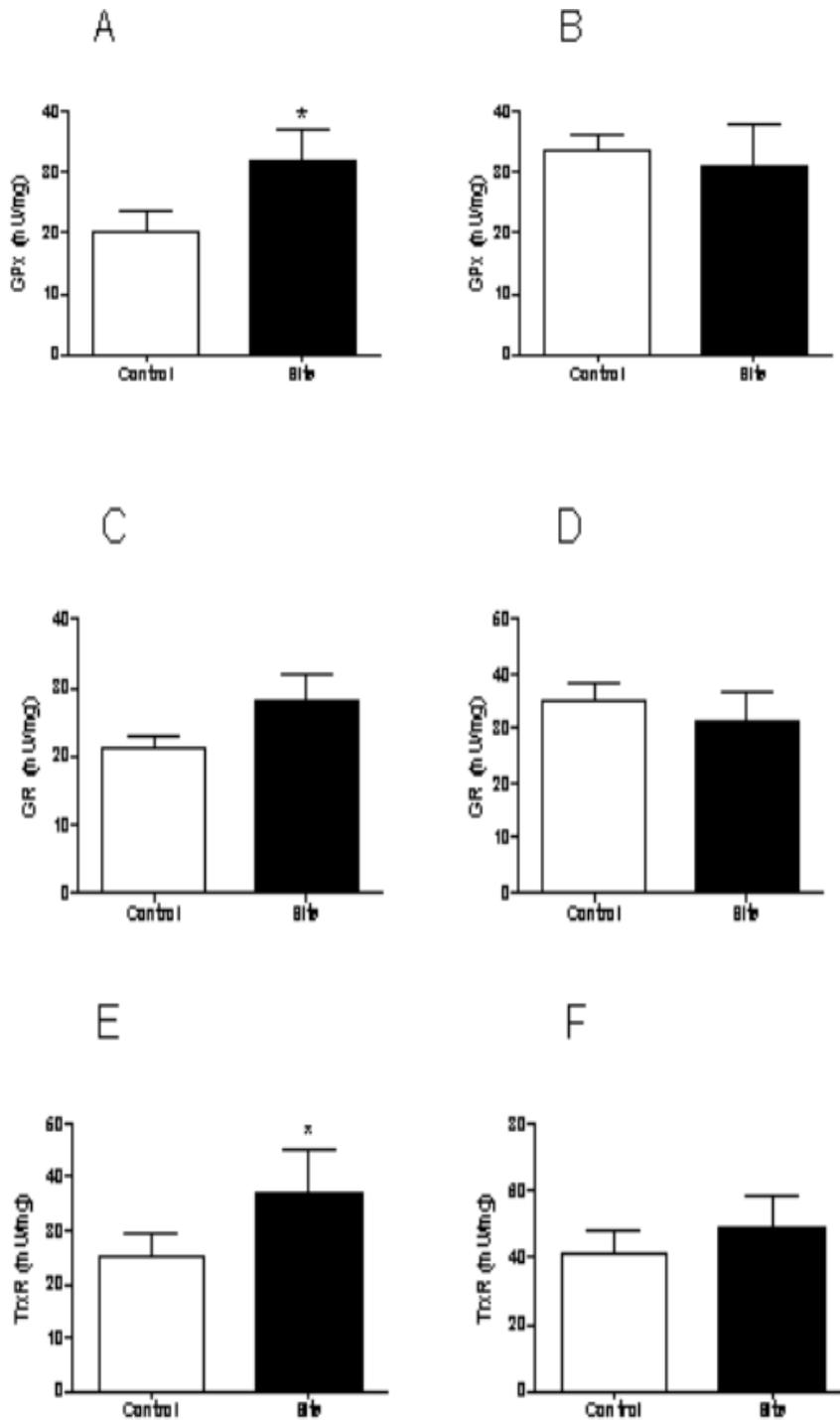
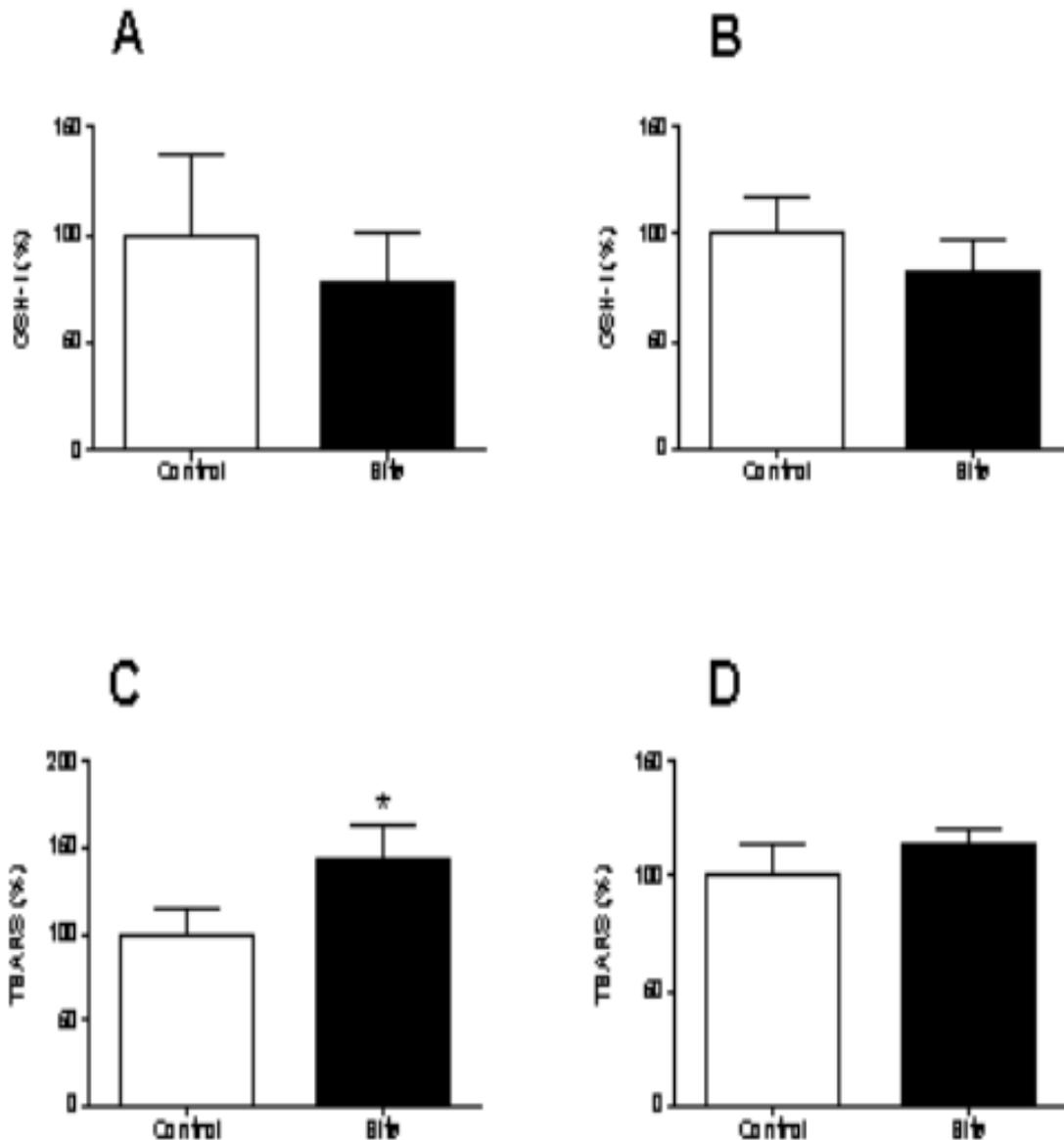


FIGURA 8- Atividade de enzimas envolvidas no processo de detoxicação celular de peixes coletados em um ponto do Rio Santa Maria, São Gabriel – RS. Após a eutanásia dos animais capturados foi determinado a atividade da enzima GPx no tecido muscular (A) e cerebral (B), assim como a atividade da GR no tecido muscular (C) e cerebral (D), e TrxR no tecido muscular (E) e cerebral (F). Dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU/mg de proteína total. * P < 0, 05.

5.3 NÍVEIS DE GLUTATIONA, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E HIDROPERÓXIDOS TOTAIS.

Os níveis de GSH permaneceram inalterados no músculo (figura 9A) e cérebro (figura 9B) dos animais coletados no rio Santa Maria. Entretanto, observou-se um aumento significativo nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrio (TBARS) (Figura 9C) e hidroperóxidos totais (Figura 9E) no músculo, corroborando com um estado de estresse oxidativo. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TBARS (figura 9D) e hidroperóxidos (figura 9F) nos cérebros dos animais capturados perante o controle.



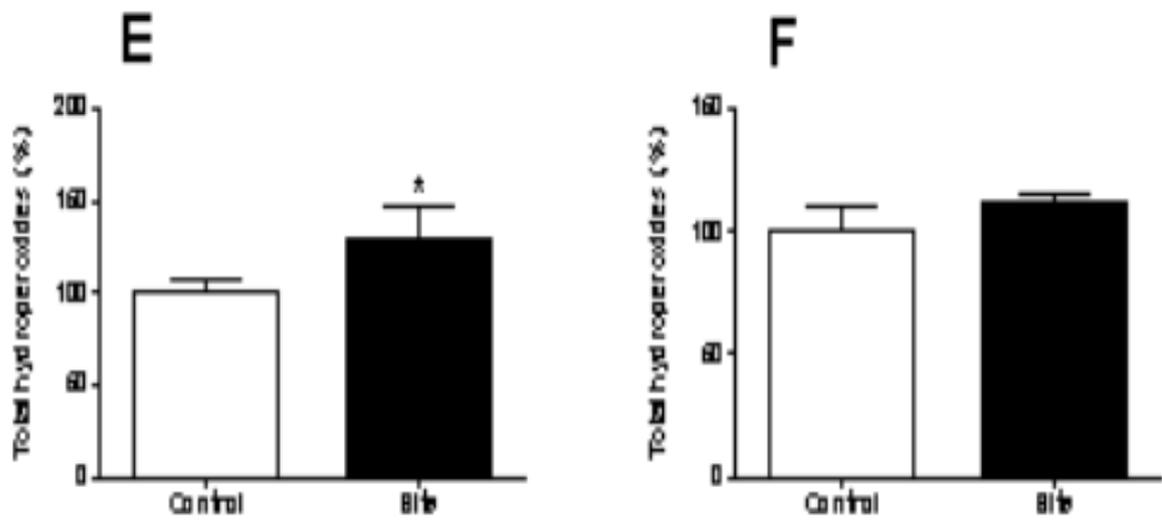


FIGURA 9- Níveis GSH, peroxidação lipídica e hidroperóxidos totais de peixes coletados em um ponto do Rio Santa Maria, São Gabriel – RS. Após a eutanásia dos animais capturados foram medidos o conteúdo de GSH no tecido muscular (A) e cerebral (B), também foram determinados os níveis de peroxidação lipídica no tecido muscular (C) e cerebral (D). Os níveis de hidroperóxidos totais também foram determinados no tecido muscular (E) e cerebral (F). Os resultados foram expressos como percentagem dos controles (média \pm desvio padrão). * P < 0,05.

6 DISCUSSÃO

Atualmente a contaminação dos recursos hídricos tem sido um dos principais problemas ambientais, sendo o ambiente aquático o mais suscetível às ações antrópicas, devido à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (BERTOLETTI, 1990). Estes efluentes são compostos por vários contaminantes que de maneira isolada ou mista apresentam efeitos preocupantes sobre os ecossistemas aquáticos e os que deste recurso dependem (JOBILING, 1995). Devido a esta realidade, estudos que avaliem a qualidade desses ecossistemas, principalmente em áreas ainda não estudadas, são importantes para a determinação do nível dos danos causados por esta gama de contaminantes. A bacia do rio Santa Maria se apresenta em situação de risco, uma vez que se situa em uma região de grande atividade urbana e agrícola.

Através das determinações bioquímicas de biomarcadores de toxicologia aquática utilizando como modelo os peixes do gênero *Astyanax sp* foi possível observar indícios de dano oxidativo e alterações na atividade de enzimas envolvidas nos processos de defesas celulares contra o estresse oxidativo e também no sistema neurolocomotor através da inibição da atividade da enzima AchE.

Alterações na atividade da AchE, como a diminuição da sua atividade, conforme demonstrada nos resultados, pode corroborar a presença de contaminantes potencialmente perigosos como herbicidas e pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CARB) (FERNANDEZ-VEGA et al., 2002), os quais inativam esta enzima se ligando covalentemente a resíduos de aminoácidos (JUNG ET AL., 2007). A inibição desta enzima é muito prejudicial para peixes, principalmente por comprometer o sistema locomotor dificultando a alimentação e fuga de predadores (BÁLINT et al., 1995). Embora apresentarem rápida degradação no meio ambiente, estes pesticidas não são específicos, apresentando toxicidade aguda em organismos não alvos, deste modo gerando risco tanto para a biota aquática como terrestre (MICHAEL & PETER, 2000). Mesmo em doses subletais, é possível identificar a contaminação do ambiente por estes pesticidas durante períodos longos, pois mesmo que já degradado no ambiente o efeito sobre a enzima AchE pode perdurar por semanas (BENKE, 1974) Pois, os compostos organofosforados são inibidores irreversíveis da protease, de modo que somente a síntese de novas enzimas podem reverter esse quadro (HABIG, 1991). Entretanto, os pesticidas carbamatos são considerados inibidores reversíveis (CALDAS,

2000). A diminuição estatisticamente significativa da atividade da enzima AChE apenas no tecido muscular pode ser explicada pela provável presença de pesticidas carbamatos, uma vez que não causam sintomatologia significativa a nível de sistema nervoso central (SNC) (CALDAS, 2000), o que poderia ter inibido temporariamente a atividade da enzima AChE.

O aumento na atividade das enzimas envolvidas nos processos de detoxificação de xenobióticos (GST) e de defesa contra a ação deletéria de ROS (GPx, TrxR e CAT), pode indicar um mecanismo de compensação a um aumento na formação de ROS e o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo nos organismos devido a exposição de uma gama de contaminantes ambientais presentes no meio onde os peixes foram coletados. O aumento na peroxidação lipídica e de hidroperóxidos demonstra o estresse oxidativo nos animais coletados perante o controle. O aumento das defesas celulares é uma forma de organismo manter os níveis de oxirredução estáveis a nível celular. Alguns estudos já relacionaram o aumento da atividade das enzimas GST e GPx com a exposição a pesticidas organofosforados (PEÑA-LLOPIS, 2003) e também a outros xenobióticos como metais pesados em bivalves (RODRIGUEZ- HZA et al., 1992). O aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a TrxR e CAT demonstram que o local pode ser contaminado por outros compostos providos da atividade humana. A TrxR é responsável pela ciclagem da tioredoxina (Trx), uma proteína doadora de elétrons envolvida no ciclo catalítico da peroxiredoxina (Prx). Assim como a GR, a TrxR está inserida no processo de detoxificação celular por ROS, auxiliando o sistema Prx/Trx (FLOHE et al., 2007). O aumento da TrxR também pode estar relacionado ao aumento da peroxidação lipídica, uma vez que a isoforma TrxR1 reduz hidroperóxidos lipídicos (ZHONG & HOLMGREN, 2000), atuando como uma forma compensatória. Com relação ao aumento da atividade CAT, esta resposta celular é muito comum em áreas impactadas, como observado no trabalho realizado por BOCCHETTI et al. (2008), que observou o aumento da atividade da CAT em mexilhões da espécie *Mytilusgallo provincialis* depois da ressuspensão de sedimentos em uma área portuária. Em organismos expostos a metais pesados também podem elevar atividade da CAT e GST devido à formação de EROS (ATLI & CANLI, 2007).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível observar que o modelo animal utilizado serviu para o propósito de avaliar os danos no ecossistema, através das alterações bioquímicas de biomarcadores de contaminação aquática, demonstrando o seu valor como bioindicador. Além disso, que esses animais representantes desse ecossistema, veem sofrendo estresse e danos promovidos pela atividade humana no local onde esses organismos foram coletados. Este trabalho foi o pioneiro em avaliar os danos no ecossistema da bacia do rio Santa Maria e um dos primeiros do bioma Pampa, porém mais estudos são necessários para determinar quais contaminantes estão presentes e a sua fonte.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353, 1990.
- ADAMS, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **American Fisheries Society**, v.3, n.1, p. 104-112, 2002.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Handbook of Ecotoxicology; Hoffman, D. J.; Rattner B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr., J., eds.; 2nd ed., **Lewis Publishers: Boca Raton**, 2003, cap. 2., 2003.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology** 105:121-126, 1984.
- AKAISHI, F. M. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ATLI G. & CANLI M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 145:282-287, 2007.
- AVILEZ, I. M., HORI, T.S. F., ALMEIDA, L. C, HACKBARTH, A., BASTOS NETO J. C., BASTOS, V. L. F., & MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Bryconamazonicus*(Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 148:136-142, 2008.
- BÁLINT , T., SZEGLETES, T., SZEGLETES, Z. S., HALASY Z., J. NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v.33, N. 3/4, p 279-295, 1995.
- BANAS, W. P.; SPRAGUE, J. B. Absence of acclimation to Parathion by rainbow trout during sublethal exposure. **Water Research**, v. 20, n. 10, p. 1229-1232, 1986.

BENKE G, MURPHY S. Anticholinesterase action of methyl parathion, parathion and azinphosmethyl in mice and fish: Onset and recovery of inhibition. **Bull Environ Contam Toxicol** 12:117–122, 1974

BERTOLETTI, E. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população. **São Paulo: CETESB**, 1990

BERWANGER A. L., CERETTA, C. A., DOS SANTOS, D.R. Alterações No Teor De Fósforo No Solo Com Aplicação De Dejetos Líquidos De Suínos. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:2525-2532, 2008.

BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) A bacia do rio Tibagi.

BILENCA, D. N. & MIÑARRO, F. O. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) em las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. **Fundación Vida Silvestre**, Buenos Aires. 2004.

BITTENCOURT, E. Embrapa comprova prejuízos aos recursos hídricos por defensivos e pesquisa opções de menor impacto no meio ambiente. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/toxicos/residuorh.htm>>. Acesso em setembro de 2013.

BOCCHETTI R., FATTORINI D., PISANELLI B., MACCHIA S., OLIVIERO L., PILATO F., PELLEGRINI D. & REGOLI F. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology**, 89:257-266, 2008.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática**. São Paulo: USP, Faculdade de Saúde Pública; Instituto de Pesca, 1972.

CALDAS, L. Q. A. Intoxicações exógenas agudas por arbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. **Centro de Controle de Intoxicações**, 2000.

CEREJEIRA, M. J., VIANA, P., BATISTA, S. Pesticides in portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v.37, p.1055-1063, 2003.

COLLARES, J.E.R. 2006. Mapa de biomas do Brasil. *In*: Mariath, J.E.A. & Santos, R.P. *Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia*,

ecologia e genética. Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre.. (Simpósios e Congresso Nacional de Botânica, 57ª. Conferências Plenárias), p. 336-339, 2006.

COOPER, C. M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems: a review. **Journal of Environmental Quality**, 22: 402-408, 1993.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKOS, R. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, p. 17-27, 1995.

ELIAS S. J. ARNEÂ R AND ARNE HOLMGREN. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur. J. Biochem.** 267, 6102±6109 (2000) q FEBS, 2000.

FANTA, E. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.

FEPAM. 2013. U70 - SANTA MARIA. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacia_uru_santamaria.asp>. Acessado em: 20 de set. de 2013.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 1-5, 2004.

FERNÁNDEZ-VEGA, C., SANCHO, E., FERRANDO, M. D. & ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity in the fish *Anguilla anguilla*. **Pest. Biochem. Physiol.** 72(1): 53-63, 2002.

FLOHE, L; HARRIS, J. R. Peroxiredoxin systems: structure and functions. 1. ed. **New York: Springer.** 407p., 2007.

GANTER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer

GARUTTI, V., BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool**, n. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V., BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax*(Teleostei: *Characidae*) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus CiêncTecnol PUCRS SérZool**, n. 13, p. 65-88, 2000.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847, 1975.

HABIG C, DIGIULIO R. D. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In Mineau P, ed, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2 - **Chemicals in Agriculture**. Elsevier, New York, NY, USA, pp 19–34. 1991.

HABIG C, DIGIULIO R. D. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In Mineau P, ed, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2 - **Chemicals in Agriculture**. Elsevier, New York, NY, USA, pp 19–34. 1991.

HIGASHI, K. Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, (São Paulo), p68, 1991.

HODGSON, E.A Textbook of Modern Toxicology. Hodgson, E., ed.; 3rd ed., **John Wiley & Sons**: New Jersey, cap. 1, 2004.

HOLMGREN, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **AntioxidRedox Signal.**, v. 2, n. 4, p. 811-820, 2000.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem.**, v. 54, p. 237-271, 1985.

HUBER, P.C & ALMEIDA, W.P. *Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos*. **Química Nova** 31:1170-1179, 2008.

HUGGETT, R.J.; KIMERIE, R.A.; MEHRIE JR., P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton: **Lewis Publishers**, 1992.

IBGE. 2004. Mapa de biomas do Brasil. Escala 1:5.000.000. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 21 de set. de 2013.

- JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. Em *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*; Williams, P. L.; James, R. C.; Roberts, S. M., eds.; 2nd ed., **John Wiley & Sons**: New York, cap. 1, 2000.
- JOBLING, M. *Environmental biology of fishes*. London: **Chapman & Hall**, p. 455, 1995.
- JUNG, J. H; ADDISON, R. F. & SHIM, W. J. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. **Marine Environmental Research**, 63(5): 471-478, 2007.
- JUNG, J. H; ADDISON, R. F. & SHIM, W. J. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. **Marine Environmental Research**, 63(5): 471-478, 2007.
- KOSOWERN, S. AVD E.M. KBSOWER. The glutathione status of cells. *Pnt. Rev. Cytol.* 54: 109-160. 1978
- LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, O. G.; QUEIROZ, V. S. et AL. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental. *Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais*, v.8, n.4, p.469-484, 2010.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 57, p. 195- 211, 1993.
- MARCHESAN, E., SARTORI, G.M.S., REIMCHE, G.B., AVILA, L.A., ZANELA, R., MACHADO, S.L.O., MACEDO, V.R.M., COGO, J.P. Qualidade de água dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2050-2056, 2009.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; Londrina. Cap. 29, p. 551 – 577. 2002.

MICHAEL H. F. & PETER B. K. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 20, No. 1, pp. 37–45, 2001.

MOTA, S. Introdução à engenharia ambiental. 4. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

ORSI, M. L., SHIBATTA, O. A., SILVA-SOUZA, A. T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

ORSOLIN DA SILVA, D. R., AVILA, L. A., AGOSTINETTO, D., DAL MAGRO T., OLIVEIRA, E., ZANELLA, R., NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Cienc. Rural** vol.39 no.9 Santa Maria Dec. 2009.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. H. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.*, v. 9, n. 7, p. 755-806, Jul, 2007.

PENÃ-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENÃ, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.** n. 65, p. 337-360, 2003.

Peres, F.; Moreira, J. C. *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora **FIOCRUZ**, 2003.

PILLAR, V. P., MÜLLER, S. C., CASTILHOS, Z. M. S., JACQUES, A. V. A. Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília, **MMA**. 403 p, 2009.

RAMAKRISHNAN, S; RAJESH, M; SULOCHANA, KN. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.55, p. 95-102, 2007.

RAND, G. M., WELLS, P. G., MCCARTY, L. S. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., **Taylor & Francis**: Washington, cap. 1, 1995.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P. H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilusedulis*) sampled in costal sites from Denmark. **Mutation Research**, v. 585, p. 33-42, 2005.

RATTNER, H. Meio ambiente, saúde e desenvolvimento sustentável. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.14, n.6, p.1965-1971, 2009.

REGOLI, F.; GORBI, S.; FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; WINSTON, G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Mar Environ Res**, v.54, n.3-5, p.419-423. 2002.

RODRÍGUEZ-ARIZA A., ABRIL, N., NAVAS, J. L., DORADO G., LÓPEZ-BAREA, J., PUEYCO, C. *Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts*. **Environ Mol Mutagen**. 19(2): 112-24, 1992.

RONCO, A., BÁEZ, M. C. D., GRANADOS, Y. P. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**: Ottawa, cap. 1 , 2004.

SANCHO, E. et al. Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla anguilla* L. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 103, p. 351-356, 1992.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Ed. Itatiaia. Belo Horizonte, 1981

SOGORB, M. A., VILLANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 128, n. 1/3, p. 215-228, 2002.

THOMANN, R. V.; MUELLER, J. A. Principles of surface water quality modeling and control. New York: **Harper International**, 1987.

TOMITA, R. Y., BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TREVISAN, R. Defesas celulares e sistema antioxidante em bivalves marinhos (*mytilus edulis* e *perna perna*) expostos a metais. Dissertação submetido ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de mestre em Bioquímica em 15/07/2010.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**; 39:44-84, 2007.

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

WALKER, C. H. Principles of ecotoxicology. London: **Taylor & Francis**, 1996.

WANDSCHEER, E. A. R., DA SILVA, J. L. S., BERRO, S. V. Avaliação da bacia hidrográfica do Rio Santa Maria – rs. **V Simpósio Nacional de Geomorfologia I Encontro Sul-Americano de Geomorfologia UFSM - RS**, 02 a 07 de Agosto de 2004.

WILCO X, B. A., MURPHY , D. D. Conservation strategy: the effects of the fragmentation on extinction. **The American Naturalist** 125: 879-887, 1985.

WINTERBOURN, C.C; STERN, A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. **Journal of Clinical Investigations**, v.80, p. 1486-1491, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Biological monitoring of chemical exposure in the workplace**. Geneva: ONU, v. 1-2, 1996.

Zakrzewski, S. F.; *Principles of Environmental Toxicology*, American Chemical Society: Washington, 1994.

ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. **J. BiolChem**, v. 275, p. 18121-18128, 2000.

