

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JEAN CARLOS BENASSI

**O USO DE BIOINDICADORES E BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO
DO PROCESSO DE REMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE LIXIVIAÇÃO
DE CARVÃO MINERAL UTILIZANDO MICROESFERAS DE
QUITOSANA**

Florianópolis

2004

JEAN CARLOS BENASSI

**O USO DE BIOINDICADORES E BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO
DO PROCESSO DE REMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE LIXIVIAÇÃO
DE CARVÃO MINERAL UTILIZANDO MICROESFERAS DE
QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Co-orientador: Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère

Florianópolis

2004

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido minha rocha e fortaleza nos bons e maus momentos da minha vida.

À minha querida mãe e meus irmãos, por apoiarem meus sonhos, por acreditarem na minha capacidade, por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem sempre.

Aos meus pais de estimação Carlos e Helga, por tudo que fizeram por mim, por todo esforço que realizaram para minha formação e por todo amor que a mim dedicaram.

À minha amada namorada Jupira, pelo seu apoio nas horas de desânimo, pelas palavras de estímulo e pelo amor e carinho que me fizeram encontrar paz e repouso em meio às turbulências.

À professora Rozangela Curi Pedrosa, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa científica e por ter me ensinado muitas outras lições importantes ao longo desses 6 anos de convívio e de orientação.

Ao meu co-orientador professor Valfredo Tadeu de Fávere, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida e por apoiar a pesquisa no Brasil .

Ao professor Danilo, pela amizade e pela ajuda sempre prestativa e fundamental.

Aos professores da UNESC Reginaldo Geremias e Carlyle Bezerra Menezes, por terem acreditado nesse projeto e por terem contribuído diretamente para a realização do mesmo.

Ao amigo Rogério Laus, que dedicou horas do seu tempo no tratamento dos efluentes e ajudou de muitas outras formas para que esse trabalho fosse possível.

Ao amigo Tiago de Oliveira, pela importante ajuda na determinação da atividade da enzima superóxido dismutase e à amiga Ivana Baptista, pelo auxílio nos ensaios com *Daphnia magna*.

Aos professores Célia Regina Monte Barardi e Mário Steindel, pelo trabalho competente e responsável que desempenharam junto à coordenação deste programa.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Experimental: Jussara, Lorena, Débora, Grazi, Duda, Carol e Val, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram os momentos de trabalho bem mais prazerosos.

Aos amigos do curso de mestrado em Biotecnologia, em especial à amiga e irmã Patrícia pela amizade de todas as horas, pela ajuda sempre que precisei e pelo apoio nos momentos de desânimo.

A todas as pessoas que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que ajudaram de alguma forma na conquista de mais um sonho. A todos vocês fica a minha mais profunda admiração e eterna gratidão.

"Só existe saber na invenção, na reinvenção, na busca inquieta, impaciente e permanente que os homens fazem no mundo, com o mundo e com os outros."

Paulo Freire

RESUMO

Este trabalho apresenta uma avaliação preliminar do potencial da quitosana, na forma de microesferas, como um agente remediador de efluente da mineração de carvão. Em adição, o processo foi monitorado para avaliar a toxicidade do efluente usando análises físico-químicas, testes de toxicidade aguda com microcrustáceos (*A. salina* e *D. magna*), teste de inibição de crescimento de raiz de cebola (*Allium cepa*), índice somático do fígado (ISF) biomarcadores de estresse oxidativo, dano ao DNA e atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os peixes foram expostos por 7, 15 e 30 dias em água sem cloro (CN), a 10% do efluente de mineração sem remediação (ENR) e 50% do efluente remediado com microesferas de quitosana (ERMQ). Após os períodos de exposição os peixes foram mortos e os fígados foram retirados para determinação dos níveis de glutathione reduzida (GSH), de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), da atividade das enzimas antioxidantes, como da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e atividade da ALA-D. O dano ao DNA foi avaliado no sangue e no fígado. A remediação foi capaz de elevar o pH do efluente de 2,1 para 7,7 e remover aproximadamente 100% da maioria dos metais do efluente, com exceção do Mn. Os resultados da toxicidade aguda revelaram que o efluente mostrou alto grau de toxicidade para *A. salina* ($CL_{50} = 6,01\%$) e para *D. magna* ($CE_{50} = 9,85\%$). Contudo a remediação reduziu substancialmente a toxicidade do efluente para ambos microcrustáceos. Foi observada uma queda no crescimento das raízes de cebolas expostas ao efluente. Após a remediação, as raízes mostraram um aumento de 21% quando comparado aos controles. A exposição ao ENR causou um significativo aumento no tamanho do fígado dos peixes após 30 dias de exposição. Por outro lado, após remediação nenhuma diferença significativa foi observada no ISF. Os níveis de TBARS foram significativamente maiores no fígado de peixes expostos ao ENR em 7 e 15 dias quando comparado ao CN. A concentração de GSH estava abaixo dos valores do CN para o ENR após 7 e 15 dias. Aumentos da atividade da CAT foram observados durante todos os tempos avaliados nos peixes expostos ao ENR. O maior aumento da atividade da GST foi observado nos peixes exposto ao ENR após 30 dias. O dano ao DNA esteve aumentado no fígado e no sangue após exposição ao ENR. Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da ALA-D nos peixes expostos ao ENR. Contudo, após a remediação do efluente nenhuma diferença foi observada nos níveis de TBARS e GSH, na atividade das enzimas CAT, SOD, GST e ALA-D, e no dano ao DNA, quando comparado ao CN. Os resultados indicam fortemente que microesferas de quitosana podem ser usadas como uma alternativa para a remediação de efluentes de mineração de carvão. Adicionalmente, o uso de biomarcadores utilizados neste estudo, exceção a ALA-D, constituem uma ferramenta bastante útil na avaliação da toxicidade e dos processos de tratamento de efluentes de mineração de carvão.

Palavras-chave: efluente de mineração de carvão; remediação; microesferas de quitosana; testes de toxicidade aguda; estresse oxidativo; biomarcadores.

ABSTRACT

This work presents a preliminary evaluation of the potential of chitosan microspheres (CM), as a remedial agent for coal mining wastewater. In addition, the process was monitored for the evaluation of the toxicity of wastewaters using physico-chemical analyses, acute toxicity tests with microcrustaceans (*A. salina* and *D. magna*), onion (*Allium cepa*) root inhibition test, liver somatic index (LSI) oxidative stress biomarkers, DNA damage and delta aminolevulinic acid dehydratase activity (ALA-D) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish were exposed for 7, 15 and 30 days to tap water dechlorinated (NC), 10% coal mining wastewater (CMW) and 50% coal mining wastewater remedied with chitosan microspheres (RCM). After exposure fish were killed and the livers were excised to determinate the level of reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activity of antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) and ALA-D. DNA damage indices were also evaluated in blood and liver. CM remediation was capable of increasing wastewater pH from 2,1 to 7,7 and remove approximately 100% of the majority metals in the effluent. The results from acute toxicity tests revealed that the CMW showed high degree of toxicity to *A. salina* ($LC_{50} = 6,01\%$) and to *D. magna* ($EC_{50} = 9,85\%$). However, the remediation process substantially reducing the toxicity to both microcrustaceans. Also decreased root growth rates were observed in onion bulbs exposed to CMW without treatment, and after remediation, the roots showed an increase of 21% when compared to controls. In addition, exposition to CMW caused a significant increase in liver size of fish after 30 days, and after remediation, no significant differences in LSI were observed. TBARS levels were significantly higher in liver of fish exposed to CMW after 7 and 15 days of exposure. GSH concentrations were below control values at the CMW at 7 and 15 days. Increased CAT activity was observed during all the experimental period in fish exposed to CMW. The highest increase in GST activity was observed in fish exposed to CMW after 30 days of exposure. There was increase in DNA damage in liver and blood after exposure to CMW. No significant alterations were observed in ALA-D activity in fish exposed to CMW. After remediation with CM no differences were observed in TBARS and GSH levels, CAT, SOD, GST and ALA-D activities, and DNA damage when compared to NC. Our results strongly suggest that the chitosan microspheres may therefore be used as an alternative approach for the remediation of coal mining wastewaters. Besides, the use of the above biomarkers, exception of ALA-D, consist of useful tools for the toxicity evaluation of the process involved in the treatment of such effluents.

Key-words: coal mining wastewaters; remediation; chitosan microspheres; acute toxicity tests; oxidative stress; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reações de formação do radical hidroxil	24
Figura 2: Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais..	25
Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água	31
Figura 4: Esquema das reações envolvendo as enzimas SOD e CAT na neutralização das EROs.....	33
Figura 5: Estrutura química da quitina e da quitosana.....	39
Figura 6: Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>A. salina</i> após 48h de exposição em diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão não remediado e remediado com microesferas de quitosana e grupo controle	58
Figura 7: Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>D. magna</i> após 48h de exposição em diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão não remediado e remediado com microesferas de quitosana.....	59
Figura 8: Índice somático do fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição.....	61
Figura 9: Índice de peroxidação lipídica (TBARS) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	62
Figura 10: Concentração de GSH em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição...	63
Figura 11: Atividade da SOD em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	64
Figura 12: Atividade enzimática da CAT em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	65

Figura 13: Atividade enzimática da GST em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	66
Figura 14: Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados em hepatócitos de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	67
Figura 15: Índice de dano ao DNA em hepatócitos de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	68
Figura 16: Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados no sangue total de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	69
Figura 17: Índice de dano ao DNA no sangue total de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	70
Figura 18: Atividade enzimática da ALA-D em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação das características do carvão de acordo com o grau de carbonificação ...	14
Tabela 2: Dados médios de pH, sulfato e metais nos principais afluentes da bacia hidrográfica do rio Sangão, região de Criciúma, SC	19
Tabela 3: Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada	54
Tabela 4: Características físico-químicas do efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana	57
Tabela 5: Inibição de raiz de cebolas (<i>Allium cepa</i>) expostas à água mineral (controle negativo) e a diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana durante 3, 6 e 9 dias de exposição ...	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
O carvão mineral e a mineração em Santa Catarina	14
1.2 A mineração de carvão e o impacto ambiental	16
1.3 Efeitos tóxicos associados com a contaminação aquática por metais	21
1.4 Bioindicadores e biomarcadores de poluição ambiental.....	26
1.4.1 Bioindicadores: teste de toxicidade aguda e teste de inibição do crescimento de raiz de cebola.....	26
1.4.2 Os biomarcadores de contaminação por metais	28
1.5 Tratamento tradicional de efluentes gerados pela mineração de carvão.....	35
1.6 Remoção de metais em solução usando adsorventes naturais.....	36
1.7 Remoção de metais em solução usando quitosana.....	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos gerais	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 METODOLOGIA.....	43
3.1 Materiais.....	43
3.2 Coleta das amostras de efluente	43
3.3 Preparação das microesferas de quitosana	44
3.4 Caracterização da quitosana	44
3.5 Remediação do efluente utilizando microesferas de quitosana.....	45
3.6 Análises físico-químicas	45
3.6.1 Determinação do pH.....	45
3.6.2 Determinação da concentração de metais	45
3.6.3 Determinação da concentração de compostos fenólicos.....	46

3.7 Testes de toxicidade.....	46
3.7.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	46
3.7.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	47
3.7.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (<i>Allium cepa</i>).....	48
3.8 Animais.....	49
3.9 Índice somático do fígado (ISF).....	50
3.10 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)	50
3.11 Glutathiona reduzida (GSH)	51
3.12 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	52
3.13 Atividade da enzima catalase (CAT)	52
3.14 Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)	53
3.15 Avaliação do dano ao DNA (fragmentação do DNA).....	53
3.16 Atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D).....	55
3.17 Análise Estatística.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Análises físico-químicas	57
4.2 Testes de toxicidade.....	58
4.2.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	58
4.2.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	59
4.2.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (<i>Allium cepa</i>).....	60
4.3 Índice somático do fígado (ISF).....	61
4.4 Indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes	62
4.4.1 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)	62
4.4.2 Glutathiona reduzida (GSH)	63
4.4.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	64

4.4.4 Atividade da enzima catalase (CAT)	65
4.4.5 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)	66
4.5 Avaliação do dano ao DNA (fragmentação do DNA).....	67
4.5.1 Avaliação do dano ao DNA em hepatócitos	67
4.5.2 Avaliação do dano ao DNA em sangue total	69
4.6 Atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D).....	71
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES.....	90
7 PERSPECTIVAS.....	93
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carvão mineral e a mineração em Santa Catarina

O carvão mineral é um combustível fóssil sólido formado a partir da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares. Por ação de pressão e temperatura em ambiente sem contato com o ar, em decorrência de soterramento e atividade orogênica, os restos vegetais ao longo do tempo geológico se solidificam, perdem oxigênio e hidrogênio e se enriquecem em carbono, em um processo denominado carbonificação (Tabela 1). Quanto mais intensas a pressão e a temperatura a que a camada de matéria vegetal for submetida, e quanto mais tempo durar o processo, mais alto será o grau de carbonificação atingido e maior a qualidade do carvão (BORBA, 2001).

Tabela 1. Variação das características do carvão de acordo com o grau de carbonificação.

Características	Turfa	Linhito	Carvão	Antracito
Densidade (%)	1	1 – 1,3	1,2 – 1,5	1,3 – 1,7
Umidade (%)	65 – 90	15 – 45	1 – 3	-
Carbono* (%)	± 55	65 – 75	75 – 90	90 – 96
Hidrogênio (%)	± 6	5	4,5 – 5,5	2 – 5
Oxigênio* (%)	± 33	25	3 – 11	4 – 11
Materiais voláteis* (%)	± 60	± 40	10 – 45	3 – 10
Cinzas (%)	± 10	± 10	0,5 - 40	3 - 30
Poder calorífico (Cal/g)	4000 - 5700	Até 5700	5700 - 9600	8200 - 9200

Medidas sobre o carvão isento de umidade e cinza. Fonte: Departamento Nacional da Produção Mineral (DNPM), 1987.

A maior ocorrência de carvão mineral no Brasil concentra-se no flanco leste da Bacia do Paraná, formação Rio Bonito, numa faixa que se estende em direção nordeste/sudoeste por 1500 Km, do Estado de São Paulo ao Rio Grande do Sul. Contudo, existe uma distribuição desproporcional dos depósitos de carvão de importância econômica ao longo dessa formação.

Concentrando-se nos estados da região sul, o Rio Grande do Sul detém cerca de 90% desses recursos, seguido de Santa Catarina, com aproximadamente 10% das reservas e somente 0,5% no Paraná. A Bacia Carbonífera Grande Candiota (RS), é a maior de todas com recursos estimados em 8×10^9 toneladas (GÖETHE, 1993).

Segundo os dados estatísticos de 2002, divulgados pelo Sindicato da Indústria de Extração do Carvão do Estado de Santa Catarina (SIECESC) a produção de carvão mineral em Santa Catarina foi a maior do setor (6×10^6 toneladas), seguida do Rio Grande do Sul com 4×10^6 , e finalmente pelo Paraná, com uma produção em torno de 252 mil toneladas.

Ao contrário do que acontece no Rio Grande do Sul, onde as jazidas estão distribuídas em áreas, em geral, separadas entre si, em Santa Catarina o carvão concentra-se numa única região, no extremo sul do Estado. A bacia carbonífera sul-catarinense é uma das mais importantes bacias do sul do país, pois encerra as maiores reservas de carvão metalúrgico, economicamente exploráveis, no território nacional (COSTA, 2000).

O carvão mineral constitui-se na maior fonte mundial de energia não renovável empregada na geração de eletricidade, representando 38,4% de seu total, seguido pela energia nuclear (17%), gás natural (16%) e petróleo (9%) (BORBA, 2001).

Embora as reservas de carvão de Santa Catarina já fossem conhecidas desde 1827 e mineradas desde 1876, somente durante a primeira (1914-1918) e a segunda (1939-1945) guerras mundiais essas reservas passaram a mover a indústria do carvão. Nas décadas de 50 e 60 uma lei federal que forçava as siderúrgicas brasileiras a consumir pelo menos 20% do carvão nacional, impulsionou o consumo do combustível no país e, conseqüentemente, sua exploração (SANTOS, 1995). Além do mais, a instalação da Companhia Siderúrgica Nacional, em 1945, e a crise do petróleo em 1973, foram fatores determinantes para um incremento tecnológico modernizador

e para o aumento da produção do minério, que fizeram o governo repensar sua política energética (MILIOLI, 1999).

1.2 A mineração de carvão e o impacto ambiental

Intensificada nos últimos anos pela expansão da economia nacional, a atividade mineradora e seus processos (método de lavra, beneficiamento, transportes, uso e transformação), ao mesmo tempo em que proporcionaram um complexo dinamismo econômico, produziram também marcas profundas nos ecossistemas regionais e baixos índices de qualidade de vida e de qualidade ambiental (MILIOLI, 1999).

No solo os impactos são manifestados pela remoção do solo orgânico, na deposição de rejeitos, na ação erosiva, no impacto visual e na destruição da flora e fauna local. As drenagens ácidas das minas e as lixiviações são responsáveis pelo comprometimento da qualidade do solo, com efeitos deletérios sobre seu uso (RIGOTTI, 2002).

Quanto à poluição atmosférica, ela é ocasionada principalmente pela liberação de substâncias tóxicas oriundas da combustão do carvão. Dentre os vários poluentes emitidos pelas centrais térmicas a carvão, destacam-se tanto pela quantidade como pelo impacto ambiental, o material particulado (cinzas) e os óxidos de enxofre e de nitrogênio. No Brasil, as informações sobre as emissões atmosféricas de poluentes oriundos do uso e do processamento do carvão não são precisas, embora alguns estudos têm demonstrado o comprometimento do meio ambiente e da qualidade de vida da população residente nas áreas próximas das termelétricas do país (PIRES, 2002).

Além das formas de poluição do solo e do ar atmosférico, a exploração do carvão e os demais processos envolvidos também têm comprometido a qualidade de vida de muitos

trabalhadores do setor, ocasionando sérios problemas de saúde como a pneumoconiose, problemas psíquicos-emocionais, bronquites, asma, reumatismo, lombalgias e dermatites (COSTA, 2000).

Contudo, dentre os impactos ambientais relacionados com a mineração do carvão, o mais agravante deles é certamente a poluição dos mananciais hídricos, das regiões próximas às jazidas, onde o mineral é explorado. Segundo o relatório do Departamento Nacional da Produção Mineral, em Santa Catarina, a bacia carbonífera está situada dentro das bacias hidrográficas do Rio Araranguá, Urussanga e Tubarão, ocupando uma área de 1050Km, com atividade de mineração e beneficiamento, nos municípios de Criciúma, Içara, Urussanga, Siderópolis, Lauro Müller, Orleans e Alfredo Wagner. Toda essa região foi categorizada como a 14ª área crítica nacional para efeito de controle de poluição da qualidade ambiental, onde a rede hidrográfica desta região está bastante comprometida quanto à qualidade e usos (DNPM, 1987).

A poluição hídrica observada nas áreas de mineração é decorrente da geração de efluentes ácidos provenientes das minas e dos rejeitos de carvão. Esta característica ácida dos efluentes da mineração ocorre principalmente pela presença da pirita (FeS_2), um mineral sulfetado muito comum nos carvões brasileiros. Como destacou Göthe (1993), o teor de enxofre piritoso nos carvões brutos brasileiros cresce do sul para o norte, com cerca de 1% no Rio Grande do Sul, atingindo de 3 a 8% em Santa Catarina e até 9-10% no Paraná.

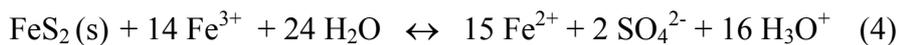
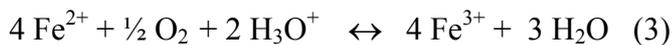
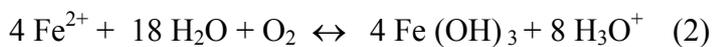
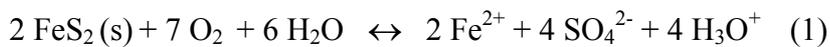
Conforme Ortiz e Teixeira (2002), a pirita se forma no ambiente deposicional redutor pela reação do gás sulfídrico com águas percolantes, que contém carbonato de ferro, ou ainda, pela redução do sulfato presente nestas águas, acompanhada da ação de bactérias sulfurredutoras e ferorrredutoras. A formação da pirita, durante os processos sedimentares, pode ocorrer em três estágios:

I – redução sulfídrica do meio por bactérias, formando H_2S ;

II – reação do H₂S com minerais de ferro, formando FeS;

III- transformação do FeS em FeS₂, pela combinação com enxofre elementar.

A pirita é rapidamente oxidada e dissociada quando exposta ao ar e à água, liberando Fe²⁺ em solução (reação 1), que pode ser rapidamente oxidado a Fe³⁺ e precipitado na forma de hidróxidos (reação 2). Depois de iniciada a reação 1, é desencadeado um ciclo onde o Fe²⁺ é oxidado a Fe³⁺ (reação 3) e, subseqüentemente, reduzido pela pirita (reação 4), liberando Fe²⁺ e acidez adicional (ORTIZ & TEIXEIRA, 2002):



O termo drenagem ácida, comumente aplicado às águas de rejeito da mineração, é usado para descrever a drenagem resultante da oxidação natural de minerais sulfetados que ocorre em rochas ou resíduos expostos ao ar e à água. A drenagem ácida é responsável pela poluição hídrica, que ocorre na maioria das áreas de mineração de carvão e de metais base, devido às alterações do pH das águas e a conseqüente liberação de substâncias e elementos-traço, muitas vezes com elevado potencial de toxicidade (BELL & BULLOCK, 1996).

Na região carbonífera de Santa Catarina, a poluição hídrica causada pelas drenagens ácidas é provavelmente o impacto mais significativo das operações de mineração, beneficiamento e rebeneficiamento (ALEXANDRE & KREBS, 1995). Esta poluição é decorrente da percolação da água de chuva através dos rejeitos gerados nas atividades de lavra e beneficiamento, alcançando os corpos hídricos superficiais e/ou subterrâneos.

Estudos realizados na década de 70 mostraram que diversos cursos d'água da região carbonífera de Santa Catarina estavam com sua qualidade comprometida pela descarga indiscriminada de drenagem ácida da mineração de carvão. Contudo, trabalhos mais recentes

destacaram o mesmo tipo de situação, mostrando que muito pouco tem sido feito em relação à proteção da qualidade dos mananciais dessa região (ORTIZ & TEIXEIRA, 2002).

Alexandre e Krebs (1995) realizaram estudos no município de Criciúma (SC) e constataram a contaminação do rio Criciúma e de outros afluentes da bacia hidrográfica do rio Sangão. Conforme a tabela 2, os autores mostraram que a maioria dos parâmetros analisados não estavam de acordo com as normas da legislação brasileira do CONAMA, (1992) para águas destinadas ao abastecimento público.

Tabela 2. Dados médios de pH, sulfato e metais (mg/L) nos principais afluentes da bacia hidrográfica do rio Sangão, região de Criciúma, SC.

Parâmetros	Rio Criciúma	Rio Maina	Rio Sangão	Resolução do CONAMA nº 020/86
pH	3,9	2,7	2,7	6 – 9
Sulfato	200	2171	1573	250
Fe	2,7	415	207	0,3
Mn	0,83	5,31	5,47	0,1
Cr	0,04	0,00	0,08	0,5
Pb	0,16	0,10	0,00	0,03
Zn	0,19	4,41	3,79	0,18
Cu	0,20	0,50	0,28	0,02

Fonte: Alexandre e Krebs, 1995.

Conforme assinalou Göthe (1993), além do elevado teor de enxofre do carvão brasileiro, soma-se a esse problema a alta vazão das águas drenadas das minas, bem como o grande volume de efluentes líquidos produzidos pelas usinas de beneficiamento do carvão. Reagindo com o próprio carvão e com as demais rochas da área, essas águas ácidas propiciam a liberação de altos teores de metais pesados. De acordo com o mesmo autor, os principais metais pesados que ocorrem nos efluentes das minas e plantas de lavação do carvão, em níveis superiores aos admitidos, são: Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Se, Ni, Ag, Hg, As, Ba, Cd e Al.

Em especial, a mineração de carvão além de promover a exposição de grandes áreas por meio dos processos de lavra, gera uma quantidade de rejeitos depositados em pilhas ou barragens próximas as áreas mineradas. Estes depósitos, ricos em sulfetos, podem tornar-se

fontes geradoras de drenagens com elevados níveis de metais. A partir de então, os lixiviados podem atingir rios e arroios, promovendo uma ampla dispersão dos contaminantes em solução e na forma particulada (SALOMONS, 1995).

Os cursos d'água que recebem descargas de drenagem ácida apresentam geralmente valores de pH na faixa entre 1,5 e 4,0 e concentração elevada de Fe dissolvido, além de níveis significativos de outros metais tóxicos. Em adição, o estado de oxidação de metais de transição, em particular o Fe, apresenta um papel importante na química redox das águas de superfície. Íons inorgânicos tais como sulfatos e nitratos, podem formar complexos com metais, influenciando na forma de transporte destes contaminantes para o meio hídrico (ORTIZ & TEIXEIRA, 2002).

Principalmente nos últimos anos, a partir da implementação mais efetiva da legislação ambiental, a qual prevê a recuperação completa das áreas degradadas pela atividade mineradora, as empresas mineradoras passaram a ter interesse direto em estudos que enfocassem a caracterização das áreas degradadas e avaliassem o impacto da atividade sobre o ambiente. A partir desses estudos houve um esforço na busca de medidas que fossem capazes de promover a recuperação das áreas degradadas (BINOTTO, 2002).

Muito embora, este esforço de recuperar as áreas degradadas pela mineração não tenha partido de uma consciência ecológica das mineradoras, mas sim pelo temor da aplicação do princípio de que “quem polui paga”, todas essas medidas, ainda que aplicadas tardiamente, são extremamente urgentes e importantes para assegurar uma boa qualidade de vida, tanto à população, quanto ao ecossistema como um todo.

1.3 Efeitos tóxicos associados com a contaminação aquática por metais

Embora os metais sejam usualmente relacionados como poluentes, é importante reconhecer que eles são elementos naturais, e que todos os metais, com exceção dos radioisótopos, estão presentes na terra desde sua formação (WALKER et al., 1996). Contudo, a geração de efluentes por certas atividades industriais, tem contribuído de forma significativa para o aumento da poluição aquática por metais pesados, tornando-se um sério problema ambiental que vem se intensificando nos últimos anos.

Uma vez no ambiente aquático, esses metais podem permanecer em solução como íons livres ou na forma de complexos aniônicos solúveis orgânicos e inorgânicos. Complexos insolúveis orgânicos ou de ânions inorgânicos, tais como carbonatos, precipitam depositando-se no sedimento. A captação de metais na água, pelos organismos, acontece principalmente na forma de ânions livres através da superfície respiratória, ou atravessando diretamente as membranas das plantas e das bactérias. Muitos metais são transferidos via cadeia alimentar na forma orgânica, e outros, são incorporados pelos animais bentônicos por meio da ingestão de sedimentos (HODSON, 1988).

Muitos desses metais são altamente tóxicos (Cd, Cr, Pb, Hg, entre outros), não são biodegradáveis e podem se acumular nos organismos vivos causando várias doenças e desordens. A detoxificação desses metais pelo organismo pode ocorrer através da captura dos mesmos, por proteínas tais como as metalotioneínas, ou podem ser depositados em grânulos intracelulares e tecido adiposo, onde podem ficar estocados por um longo tempo, ou serem excretados pelas fezes, rins ou bile (WALKER et al., 1996).

Os íons metálicos, embora sejam elementos necessários para a atividade adequada de uma grande variedade de enzimas e para a manutenção estrutural de proteínas, eles estão protegidos no interior das proteínas, pois desta forma, circundados e isolados, a célula está protegida do efeito tóxico destes metais. Ao contrário, livres ou fracamente ligados à

superfície das proteínas, DNA, lipídeos ou outras biomoléculas os íons metálicos são tóxicos, mesmo quando encontrado em baixos níveis (GALARIS & EVANGELOU, 2002).

O alumínio é um elemento que até pouco tempo atrás raramente chamava a atenção dos toxicologistas. Contudo, alguns trabalhos têm apresentado informações a respeito da toxicidade por alumínio. Evidências têm mostrado que a absorção de alumínio é capaz de induzir anemia e encéfalopatia em homens e animais (KAISER & SCHWARTZ, 1985). Não se sabe ao certo de que forma o alumínio desencadeia a anemia, contudo, Trapp (1983) sugere que o metal pode interagir com sítios de ligação de metais da transferrina e ser absorvido pela célula da mesma forma que o ferro. Assim, ao se ligar a transferrina, o alumínio poderia interferir na captação do ferro e induzir a anemia, levando a uma ruptura na via de biosíntese do grupamento heme da hemoglobina.

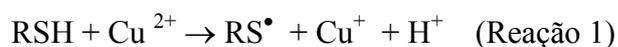
O cádmio é um elemento não essencial abundante que é continuamente acumulado no ambiente como resultado da atividade industrial. As principais fontes de exposição humana ao cádmio são o fumo, a alimentação e a poluição industrial. Desde 1993 este metal foi classificado como um carcinogênico, particularmente associado com o câncer de pulmão (SHIN et al., 2003). Embora o mecanismo da toxicidade do cádmio não esteja totalmente esclarecido, estudos *in vitro* sugerem que ele seja capaz de bloquear o processo de apoptose inibindo a caspase-3, a principal enzima ativadora deste processo de morte celular (YUAN et al., 2000). Além disto, estudos recentes com ciclídeos (tilápia) têm demonstrado a indução de estresse oxidativo pela exposição ao cádmio (ALMEIDA et al., 2002; BASHA & RANI, 2003).

O chumbo entra no sistema aquático por meio das fontes naturais e antropogênicas e é capaz de causar mortalidade, ou em concentração subletal causar mudanças no crescimento, na reprodução e no comportamento. Dentre os sintomas de intoxicação por chumbo em peixes

destacam-se: desordem neurológica, atrofia muscular, paralisia, perda de equilíbrio, dificuldade de nadar e degeneração da nadadeira caudal (BURDEN et al., 1998).

O manganês tem se mostrado como um elemento-traço essencial em todas as espécies animais estudadas. Esse metal é componente de certas enzimas como piruvato carboxilase, superóxido dismutase, glutamina sintetase e fosfatase alcalina (StCLAIR, 1996). Embora a deficiência por Mn seja rara, ela pode ocasionar má formação no esqueleto, prejudicar o crescimento e o funcionamento do aparelho reprodutivo (WELDER, 1993). Contudo, estudos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que o Mn é um potente agente neurotóxico dopaminérgico quando em concentrações elevadas. Sintomas de toxicidade aguda pelo Mn são similares aos sintomas de pacientes com o mal de Parkinson (STREDRICK et al., 2004). Conforme demonstrado por Slood e colaboradores (1996), o Mn pode levar a uma diminuição das defesas antioxidantes tais como tióis, catalase e glutatona, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse aumento de EROs e a diminuição dos níveis de antioxidantes podem perturbar o equilíbrio celular a favor da toxicidade.

O cobre é um metal largamente distribuído na natureza, sendo também um elemento essencial. No corpo humano há uma quantidade aproximada de 80 mg de Cu, parte da qual é requerida para o funcionamento de enzimas, tais como a superóxido dismutase, a citocromo oxidase, a lisina oxidase, dentre outras. A toxicidade desse metal está relacionada com a capacidade que o elemento possui, tal qual o ferro, de catalisar a formação do radical hidroxil. Além do mais, grupamentos tióis são facilmente oxidados pelo ataque direto de metais de transição como o Cu, formando tiorradicais (Reação 1). Essa capacidade oxidativa do cobre tem sido utilizada com frequência em experimentos *in vitro* com o objetivo de induzir oxidação em lipoproteínas de baixa densidade (GALARIS & EVANGELOU, 2002).



O ferro é um dos metais mais abundantes na Terra e é essencial para a maioria dos organismos. O corpo humano contém cerca de 4g de ferro, sendo que 60% do total está associado com a hemoglobina, facilitando o transporte do oxigênio. O restante está geralmente estocado na célula como ferritina ou transportado pela transferrina na forma de Fe^{3+} (GALARIS & EVANGELOU, 2002). Contudo, em certas condições, o “pool” intracelular de Fe é aumentado, podendo trazer complicações para a célula. Ao nível celular o ferro catalisa a reação de Fenton e a reação de Haber-Weiss (Figura 1), resultando na geração de radicais livres de oxigênio, particularmente o radical hidroxil, que potencialmente pode causar dano oxidativo celular (BURY & GROSELL, 2003).

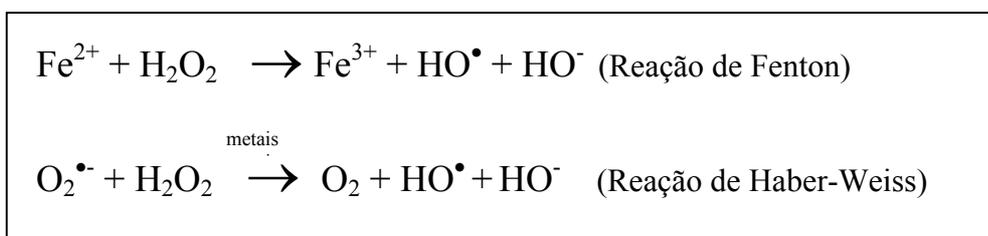


Figura 1. Reações de formação do radical hidroxil (HO^\bullet). Adaptada de Halliwell & Gutteridge, (1989).

Vários estudos têm mostrado que a toxicidade por certos tipos de íons metálicos pode desencadear um processo carcinogênico. Os mecanismos pelos quais os metais podem induzir transformações na célula não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, a capacidade que os metais possuem de interferir no processo de formação de radicais livres pode estar relacionado com a indução da carcinogênese. Tem sido demonstrado que metais, tais como ferro, cobre, cádmio, cromo, níquel, entre outros, possuem a capacidade de produzir EROs. Quando essas espécies são formadas intracelularmente, elas podem induzir peroxidação lipídica, dano ao DNA, depleção de grupamentos tióis, alterar vias de transdução de sinais e a homeostase do cálcio (STOHS & BAGCHI, 1995).

Na figura 2, adaptada de Galaris e Evangelou (2002), há um esquema simplificado que tenta explicar os possíveis mecanismos de indução da carcinogênese por metais.

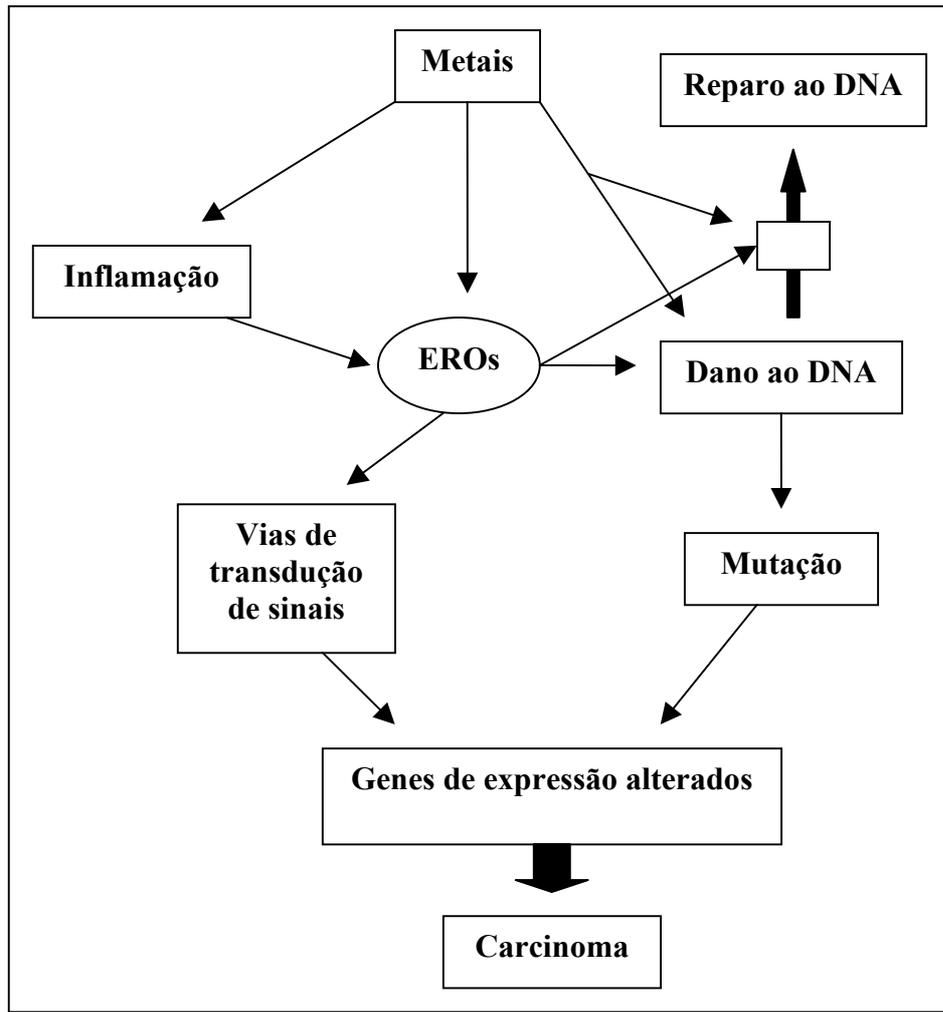


Figura 2. Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais. Adaptada de Galaris & Evangelou (2002).

De acordo com o esquema acima, os metais podem provocar dano ao DNA de forma direta ou indiretamente pela formação das EROs. A geração das EROs pode ser afetada pelos metais por muitas vias. Por exemplo, através da reação de Fenton, da indução do processo inflamatório, ou através da formação intermediária de tioradicaís. A maior parte do dano ao DNA é reparada pelo eficiente mecanismo celular de reparo, enquanto que uma pequena parte do dano resulta em mutação. Mudanças nos níveis das EROs também influenciam no equilíbrio redox intracelular, afetando fortemente as vias de transdução de sinais, as quais ativam ou inativam vários fatores de transcrição. Tanto a mutação quanto os fatores de

transcrição podem modular a expressão de uma variedade relevante de genes para a transformação celular, conduzindo finalmente ao desenvolvimento do câncer.

1.4 Bioindicadores e biomarcadores de poluição ambiental

Para se avaliar o grau de contaminação e a efetividade da remediação, faz-se necessário um processo de monitoramento. De um modo geral, os programas de monitoramento da contaminação aquática têm se preocupado com a quantificação dos níveis dos principais tipos de poluentes presentes na água, no sedimento e em alguns organismos de importância econômica. Embora este tipo de informação seja importante sob o ponto de vista econômico e social, por outro lado, essas análises químicas são dispendiosas e não fornecem informações a respeito do efeito tóxico provocado por estas substâncias (SCHLENK, 1999).

Mais recentemente, os programas de monitoramento de poluição ambiental incorporaram às análises físico-químicas testes biológicos que visam determinar a resposta ou o efeito de um poluente qualquer sobre os organismos expostos aos poluentes. Estes testes incluem a avaliação da toxicidade aguda utilizando organismos indicadores, a determinação da concentração de determinadas biomoléculas além da atividade de enzimas e proteínas transportadoras.

1.4.1 Bioindicadores: teste de toxicidade aguda e teste de inibição do crescimento de raiz de cebola

Muitos organismos são utilizados como bioindicadores em testes de toxicidade aguda. Dentre os bioindicadores empregados podemos citar as bactérias bioluminescentes (*Vibrio fischeri*), microcrustáceos (*Daphnia magna*, *Artemia salina*) e peixes (*Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio*). Esses testes de toxicidade associados com as análises físico-químicas tornam-se importantes ferramentas na avaliação da qualidade e da toxicidade de efluentes gerados pelas indústrias (BAPTISTA, 2001).

O princípio dos testes de toxicidade aguda constitui em expor organismos testes, representativos do ambiente, a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um período de tempo. O efeito agudo trata-se de uma resposta severa e rápida dos organismos expostos. Normalmente, o efeito é a letalidade, ou alguma manifestação anterior à morte, como a imobilidade. Para avaliar os efeitos agudos de agentes tóxicos nesses testes, em geral usa-se a concentração letal (CL_{50}) ou a concentração efetiva (CE_{50}) a 50% dos organismos em teste. Essa é a resposta mais significativa para ser extrapolada a uma população (BERTOLETTI).

Artemia salina (Crustacea, Anostraca) é um microcrustáceo de água salgada, o qual é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus cistos encontrados facilmente em lojas de aquaristas. O ciclo de vida da *Artemia* se inicia pela eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões encapsulados metabolicamente inativos. Esses cistos podem permanecer no estado dormente por muitos anos, desde que mantidos em lugar sem umidade. Quando esses cistos entram em contato com água salgada eles se tornam hidratados e reassumem o seu desenvolvimento (GOMES, 1986).

Nas últimas 3 décadas, os ensaios usando as larvas de *A. salina* foram empregados nos mais diferentes tipos de testes, avaliando uma grande variedade de compostos tais como antibióticos (MIGLIORE et al., 1997), pesticidas (BARAHONA & SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999), materiais dentários (PELKA et al., 2000) e toxinas naturais produzidas por outros

organismos (GIESE et al., 1996; SMITH, 1996; BEATTIE et al., 2003). Possivelmente esse interesse se deva às facilidades que o teste apresenta como baixo custo, rapidez e simplicidade (MEYER et al., 1982).

Os dafnídeos, especialmente a *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) também têm sido usados por muitos anos em testes padrão de toxicidade devido à sua elevada sensibilidade, fácil controle e elevada taxa de reprodução (VILLARROEL et al., 2003). *D. magna* é o organismo mais comumente empregado nos estudos e controle da qualidade da água e é usado para determinar a toxicidade de efluentes. O uso da *D. magna* na toxicologia ambiental é aceito em vários países para monitorar efluentes industriais, a fim de estabelecer um critério de qualidade que determine uma concentração permissível de poluente, que limite um nível de impureza nos efluentes despejados nos receptores de água natural e avalie a eficácia de um bom serviço de saúde pública (NAVARRO et al., 1999).

Da mesma forma, o uso de plantas superiores em sistemas de testes para o monitorar a presença de compostos tóxicos no ambiente aquático está sendo empregado satisfatoriamente. Plantas do gênero *Allium* têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e muitos compostos tóxicos e o parâmetro empregado mais comumente para estabelecer a relação entre a concentração e a toxicidade do efluente é a inibição do crescimento de raiz (ARAMBASIC et al., 1995; SMAKA-KINCL et al., 1996; RANK & NIELSEN, 1998).

1.4.2 Os biomarcadores de contaminação por metais

O uso de biomarcadores nos estudos de monitoramento das mais variadas formas de poluição tem recebido grande atenção nos últimos anos. Segundo Huggett et al. (1992), os biomarcadores são comumente descritos como alterações bioquímicas, fisiológicas e

histológicas que indicam a exposição ou o efeito tóxico, de um determinado poluente em organismos-teste.

Um grande número de classificações foi proposto para os biomarcadores. A classificação mais amplamente utilizada é a divisão entre os biomarcadores de exposição e os biomarcadores de efeito. São biomarcadores de exposição aqueles que indicam a exposição do organismo ao poluente, entretanto não fornecem informações sobre o grau de efeito adverso que essa mudança pode ocasionar. Por outro lado, biomarcadores de efeito são todos aqueles que demonstram algum tipo de efeito adverso no organismo exposto (WALKER et al., 1996).

O objetivo principal dos biomarcadores de exposição é estimar a dose interna ou a bioviabilidade de um xenobiótico particular ou do seu metabólito em um organismo. São exemplos de biomarcadores de exposição, a indução do sistema enzimático citocromo P450 seguida da exposição de hidrocarbonetos aromáticos planares, aumento dos níveis de vitelogenina pela estimulação a estrógenos, e a formação de aductos específicos de DNA pela exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SCHLENK, 1999).

Segundo Adams et al. (1989), o efeito adverso observado em organismos expostos por um período de tempo maior, pode ser decorrente de uma falha no mecanismo de defesa, aumentando o nível de dano, o que acaba ocasionando maiores injúrias histológicas e fisiológicas. Esse processo pode ser reversível, dependendo da capacidade do órgão ou do tecido afetado responder. São biomarcadores de efeito aberrações cromossômicas, micronúcleos, presença de tumores, mudanças comportamentais, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA.

Embora os biomarcadores não forneçam diretamente informações concernentes aos efeitos dos poluentes num nível elevado de organização biológica, eles podem advertir previamente sobre os impactos biológicos. Adicionalmente, estudos revelam que os biomarcadores são capazes de predizer a relação existente entre o estado fisiológico de um

organismo com parâmetros no nível populacional. Conseqüentemente, os biomarcadores podem ter um importante papel nas avaliações de risco ecológico (DI GIULIO, 1995).

A avaliação toxicológica da contaminação aquática através de ensaios subletais tornou-se relevante, pois os biomarcadores podem detectar precocemente efeitos adversos de agentes tóxicos, num organismo-teste em particular, antes que manifestações patológicas drásticas comecem a se evidenciar (ALMEIDA et al., 2002).

Muitos dos poluentes que são despejados nos mananciais hídricos podem potencialmente induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos incluindo os peixes (BARNHOORN & VUREN, *in press*; BAINY et al., 1996; WILHELM FILHO et al., 2001). Embora a poluição aquática seja a maior responsável pela formação do estresse oxidativo, através do ciclo redox dos poluentes, mesmo sem poluição ou biotransformação dos xenobióticos, há uma constante produção de espécies reativas de oxigênio nos sistemas vivos (KAPPUS, 1987).

O oxigênio molecular é essencial a vida dos organismos aeróbios, isto inclui a maioria dos organismos superiores. Sua função predominante nos eucariontes é servir como último acceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando será finalmente reduzido à água durante o complexo processo de fosforilação oxidativa. A redução completa do oxigênio à água requer 4 elétrons, e essa redução produz seqüencialmente do começo ao fim 3 produtos de redução (DI GIULIO et al., 1995).

Os produtos da redução do oxigênio molecular mostrados na figura 3 são o ânion superóxido ($O^{\bullet-}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}). Dessas espécies ativadas de oxigênio, especialmente o HO^{\bullet} é muito reativo e potencialmente deletério para os sistemas biológicos, e juntamente com o $O^{\bullet-}_2$ são radicais livres de oxigênio. Embora o H_2O_2 não seja um radical livre ele também é um produto reativo e via reação de

Haber-Weiss pode reagir com o $O^{\bullet-}_2$ servindo como um importante precursor de HO^{\bullet} (DI GIULIO et al., 1995).

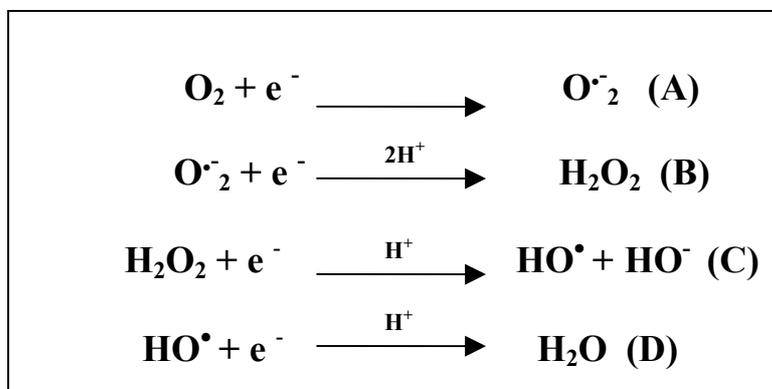


Figura 3. Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio a água. Adaptada de Winston, 1991.

De um modo geral, a exposição a longo prazo de um organismo a um poluente resulta primeiramente no acúmulo desse xenobiótico nos órgãos e tecidos e, secundariamente, mantida a exposição, alterações moleculares irreversíveis podem ocorrer devido à contínua ação deletéria. Um dos efeitos provocados pelos metais pesados é sua capacidade de catalisar reações oxidativas, levando à geração de EROs (YU, 1994).

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos (MEAGHER & FITZGERALD, 2000). Dentre os processos de oxidação induzidos por radicais livres, a lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica, é, provavelmente, o processo mais extensivamente investigado. A presença abundante de fosfolipídios de membranas faz desses compostos alvos endógenos facilmente acessíveis ao ataque dos radicais livres formados, especialmente as EROs. Principalmente os ácidos graxos poliinsaturados são o grupo de lipídeos mais facilmente susceptíveis às reações com os radicais livres. A LPO pode levar à formação de radicais livres em cadeia (ZWART et al., 1999).

As conseqüências mais comuns da LPO envolvem a perturbação da função das membranas das células e organelas essenciais. Isto inclui o processo de transporte, a manutenção do gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER & FITZGERALD, 2000).

As EROs podem potencialmente atacar qualquer estrutura celular ou molécula. Contudo, com respeito ao envelhecimento e o câncer, o DNA é considerado o principal alvo de ataque. A modificação oxidativa das bases do DNA pode resultar em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose pode induzir à liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (ZWART et al., 1999).

O teste Cometa é uma técnica amplamente utilizada na detecção de danos ao DNA em células isoladas e pode ser empregada virtualmente em qualquer tipo de célula eucariótica. A aplicação do teste Cometa, juntamente com outros biomarcadores, tem sido utilizada no monitoramento de ambientes contaminados por poluentes potencialmente genotóxicos (DEVAUX et al., 1998).

A despeito dos danos oxidativos que podem ocorrer nas membranas celulares e no material genético como resultado da formação de radicais livres, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que controlam a formação excessiva das EROs. Das defesas enzimáticas merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), enquanto que os compostos tais como α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutathione fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular (PENG et al., 2000).

A SOD é uma metaloenzima considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs, pois são responsáveis pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (Figura 4). Existem três tipos distintos de SODs, cada qual possuindo um metal

específico no sítio ativo. A SOD que contém manganês (MnSOD) é encontrada em bactéria e certas organelas (mitocôndria e cloroplastos) de organismos superiores. A SOD que possui cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD), está presente principalmente no citosol de eucariontes e cloroplastos de plantas superiores. E finalmente, a SOD que contém ferro (FeSOD) é encontrada em bactérias e algumas plantas superiores (RABINOWITCH & FRIDOVICH, 1983).

ois tipos de enzimas podem remover o peróxido de hidrogênio da célula, são elas a CAT (Figura 4) e a GPx. A maioria das células aeróbias possui CAT, com exceção de algumas bactérias. Nos animais, essa enzima está presente na maioria dos órgãos, mas concentra-se principalmente no fígado e nos eritrócitos. Ela é composta de quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um grupo heme (Fe(III)-protoporfirina) ligado ao sítio ativo. A cada subunidade da enzima existe uma molécula de NADPH ligada, que tem por função ajudar na estabilização da estrutura enzimática (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

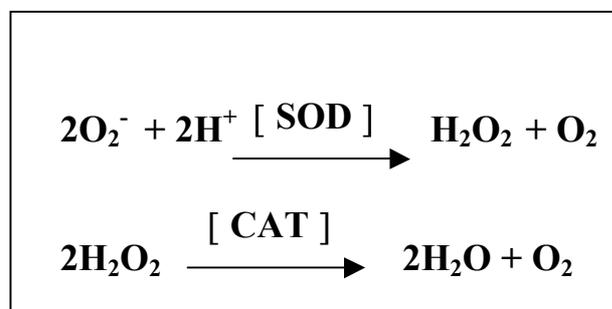


Figura 4. Esquema das reações envolvendo as enzimas SOD e CAT na neutralização das EROs. Adaptada de Di Giulio et al., 1995.

Embora as glutathione S-transferases (GST) atuem também diretamente contra as ERO, elas são uma das mais importantes enzimas da fase II de biotransformação. Esta superfamília de enzimas, presente principalmente no citosol, catalisa reações de conjugação de uma variedade de xenobióticos, bem como, de substratos endógenos com a glutathione (LÓPEZ et al., 2002).

Estas enzimas estão envolvidas no transporte de compostos lipofílicos endógenos e exógenos resultantes da fase I do metabolismo. Elas são capazes de formar ligações covalentes com epóxidos ativos derivados das reações da fase I de biotransformação, impedindo que os mesmos se liguem ao DNA ou a outras biomoléculas (DI GIULIO et al., 1995).

As GSTs têm sido extensivamente estudadas em organismos superiores, especialmente em mamíferos. Mas durante os últimos anos tem crescido o interesse de pesquisar essas isoformas em organismos aquáticos, com o objetivo de serem utilizadas como biomarcadores específicos de certos agentes químicos (OOST et al., 1996).

Durante o processo de combate do estresse oxidativo ocorre a redução do peróxido de hidrogênio bem como de peróxidos orgânicos. Esse processo envolve a concomitante oxidação da GSH para a glutatona oxidada (GSSG), a qual pode ser reduzida pela glutatona redutase oxidando o NADPH (HASSPIELER et al., 1994).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico associado com uma variedade de funções celulares, tais como integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, “scavenger” de radicais livres, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente perigosos (PEÑA et al., 2000).

Além da utilização dos biomarcadores de defesa antioxidante e de dano oxidativo (LPO e dano ao DNA), outros biomarcadores têm sido empregados no monitoramento da poluição por metais. A inibição da atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D) tem sido relacionada com a exposição por metais pesados. A ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade normal. Ela apresenta grupamentos sulfídricos na sua estrutura e sua atividade é altamente sensível à presença de alguns metais

pesados como mercúrio, chumbo e outros compostos que podem oxidar grupamentos sulfídricos (VIEIRA et al., 2000).

A ALA-D está diretamente envolvida na síntese do grupamento heme, e catalisa a condensação de duas moléculas do ácido delta aminolevulínico para formar o composto porfobilinogênio, o qual é o primeiro anel aromático precursor dos compostos tetrapirrólicos que formam o grupamento da hemoglobina (BURDEN et al., 1998).

1.5 Tratamento tradicional de efluentes gerados pela mineração de carvão

As atividades relacionadas à atividade mineradora vêm gerando, desde o século passado, profundas alterações ambientais, tornando praticamente inviável a manutenção da vida aquática, ocasionando sérios problemas à indústria pesqueira, à saúde humana, dificultando o desenvolvimento vegetal e provocando o assoreamento dos rios, constituindo-se num dos principais problemas da região Sul de Santa Catarina (ALEXANDRE & KREBS, 1996).

O desenvolvimento de tecnologias adequadas ao tratamento de efluentes e das águas de rejeito tem sido objetivo de grande interesse nos últimos tempos, devido ao aumento da rigidez das leis ambientais. A descarga de um determinado efluente, num receptor hídrico, deve estar dentro de certos parâmetros, adotados pela legislação vigente, e que tem como objetivo principal diminuir o impacto das atividades humanas sobre o ambiente aquático.

A aeração é a forma mais simples de tratamento químico de efluentes de carvão e pode levar à precipitação de Fe e Mn na forma insolúvel, com elementos-traço associados. Contudo, as taxas de oxidação destes elementos são fortemente dependentes do pH, tornando a neutralização química imprescindível, antes de sua descarga nos cursos d'água. Aditivos

como floculantes e coagulantes podem também ser utilizados para facilitar a precipitação sólida dos contaminantes em solução (ORTIZ & TEIXEIRA, 2002).

Os reagentes alcalinos, normalmente utilizados na neutralização convencional do pH da drenagem ácida (CaO , CaCO_3 , NaOH , Na_2CO_3) são onerosos, potencialmente perigosos e podem resultar na descarga de águas excessivamente alcalinas, além de constituir uma solução de curto prazo, pois a drenagem ácida pode continuar a ser gerada mesmo após passadas décadas do fechamento das minas (ORTIZ & TEIXEIRA, 2002).

Segundo Salomons (1995), além do elevado custo do tratamento químico, há ainda, a produção de um volume considerável de resíduos sólidos ricos em ferro e outros metais, cuja disposição representa outro problema ambiental e custos adicionais. Para Ortiz e Teixeira (2002), o controle da drenagem ácida é um fator-chave para prevenir a liberação de metais dissolvidos para o meio hídrico a partir das áreas de mineração em atividade ou abandonadas, tendo em vista a solubilidade de muitos sais metálicos sob condições de pH ácido.

1.6 Remoção de metais em solução usando adsorventes naturais

A rápida industrialização tem aumentado a disponibilidade de metais para o ambiente. O tratamento de efluentes é hoje em dia uma das mais importantes metas para as indústrias e outras instituições, especialmente naquelas onde o efluente gerado contém uma complexa mistura de diferentes contaminantes como compostos orgânicos e metais. Muitos métodos incluindo precipitação química, eletrodeposição, troca iônica, separação por membranas e adsorção têm sido empregados no tratamento de efluentes com elevado teor de metais (TARLEY & ARRUDA, 2004).

De acordo com Juang e Shao (2002), de todos esse métodos citados acima, a precipitação química é a mais comumente empregada. Entretanto, algumas limitações do processo podem ser apontadas tais como custo, operação laboriosa, falta de seletividade do processo de precipitação e baixa eficiência na remediação de soluções diluídas.

O tratamento através da adsorção é uma das poucas alternativas promissoras que existem para remoção de metais em solução, especialmente usando adsorventes naturais de baixo custo como rejeitos da indústria e da agricultura, materiais argilosos e biomassa (KUMAR & DARA, 1982). Embora o uso desses materiais não seja ainda comum, em geral eles apresentam boa capacidade de adsorção. Inúmeros estudos têm objetivado a busca de um material adsorvente natural que seja de baixo custo, contudo, tenha grande eficiência em remover metais em meio líquido (KUMAR & DARA, 1982; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; YABE & OLIVEIRA, 2003; TARLEY & ARRUDA, 2004).

Tarley e Arruda (2004) publicaram recentemente um trabalho onde avaliaram a capacidade de remoção de metais, de um efluente de laboratório, usando casca de arroz moída. Os autores avaliaram alguns fatores que poderiam influenciar no processo de adsorção como o pH do efluente, o diâmetro das partículas do material e o fluxo de efluente pela coluna. Após o tratamento de uma amostra do efluente, os autores constataram que a concentração dos metais Zn, Cu, Al, Cd e Pb ficou dentro das normas estabelecidas pelo CONAMA para despejo de efluentes em mananciais hídricos.

Kapoor e Vararaghavan (1985), fizeram uma revisão na literatura sobre o potencial da utilização da biomassa de fungo como uma alternativa para o tratamento de metais em águas de rejeito. O levantamento desses dados mostrou que a adsorção de metais pesados (Cu, Zn, Pb, Fe, Ni, Ag, Th, Ra e U) por fungos filamentosos, embora tenha apresentado resultados promissores foram bastante variáveis. Os autores concluíram que a bioadsorção fúngica depende fortemente de fatores tais como pH, relação entre íon metálico e concentração de

biomassa, pré-tratamento físico e químico da biomassa, temperatura e presença de várias espécies químicas em solução.

Da mesma forma, Bailey et al. (1999) apresentaram uma revisão bastante interessante que focalizou o potencial de uma extensa variedade de adsorventes de baixo custo para metais pesados. De acordo com os autores, alguns dos adsorventes analisados como lignina, quitosana, algodão, turfa e alga demonstraram elevada capacidade de adsorção para alguns metais como Cd, Cr, Pb e Hg. Para esses autores, um bom adsorvente natural não deve ter apenas um baixo custo, mas que necessite de um processamento prévio mínimo, que seja abundante na natureza e que preferencialmente seja algum material de rejeito de indústria.

1.7 Remoção de metais em solução usando quitosana

A quitina é um biopolímero linear de alta massa molar formado por unidades de $\beta(1\rightarrow4)2$ -acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (VARMA et al., 2004). É o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose. Está presente no exoesqueleto de artrópodes, principalmente nos insetos e crustáceos (siri, caranguejo, camarão, lagosta, entre outros), na parede de alguns fungos e na pena interna de lulas (BAILEY et al., 1999). Segundo dados de Onsoyen e Skaugrud (1990), o descarte de quitina pelas indústrias pesqueiras de crustáceos está em torno de 40 mil toneladas ao ano.

As carapaças de crustáceos contém cerca de 5-20% de quitina, 25-40% de proteínas e 40-45% de carbonato de cálcio. Este biopolímero é praticamente insolúvel em água, ácidos diluídos, álcalis concentrados e solventes orgânicos. O seu emprego com adsorvente é pouco utilizado em função de sua baixa capacidade de adsorção.

Contudo, mais importante que a quitina, em termos de adsorção, é o seu principal derivado, a quitosana, obtida quimicamente através da desacetilação da quitina (Figura 5). A quitosana, além de ser obtida quimicamente, é encontrada naturalmente nas paredes celulares de algumas espécies de fungo como *Aspergillus niger* e *Mucor rouxii* (FELSE & PANDA, 1990). Diferente da quitina, a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, entre outros, mas é insolúvel em ácido sulfúrico (VARMA et al., 2004).

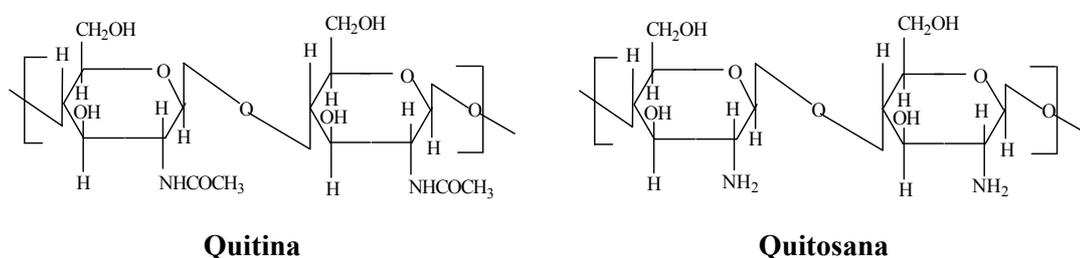


Figura 5. Estrutura química da quitina e da quitosana.

Uma ampla revisão das inúmeras possibilidades de aplicações da quitina e da quitosana foi apresentada recentemente por Kumar (2000). Além de destacar a versatilidade física que pode ser obtida a partir desses polímeros, como a obtenção de fibras, filmes, géis, microesferas e membranas, o autor relaciona diversas pesquisas onde a quitina e a quitosana estão sendo empregadas. Dentre esses inúmeros estudos destacam-se o tratamento de água, a remoção de metais e de corantes em efluentes, atividade anticoagulante e antibacteriana, preparação de pele artificial, produção de curativos para aumentar a cicatrização e liberação controlada de certos fármacos.

A capacidade da quitosana de formar complexos com íons metálicos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores (MUZZARELLI et al., 1989; FÁVERE, 1994; TSENG et al., 1999; CÁRDENAS et al., 2001; JUANG & SHAO, 2002; RHAZI et al., 2002; VARMA

et al, 2004). Segundo Yang e Zall (1984), a presença de um grande percentual de grupos amino livres expostos durante o processo de desacetilação, confere à quitosana uma capacidade de adsorção de 5 a 6 vezes maior que a da quitina.

Conforme destacou Guibal (2004), a principal característica que pode afetar a propriedade de adsorção da quitosana é o grau de desacetilação, uma vez que controla a fração de grupos amino livres que podem estar disponíveis para interagir com íons metálicos em solução. Outros fatores como cristalinidade, afinidade pela água e massa molar também podem influenciar no processo de adsorção.

Uma das mais interessantes características da quitosana é sua versatilidade físico-química. Esse material pode ser fisicamente modificado com muita facilidade, obtendo-se diferentes formulações do polímero tais como pó, nanopartículas, membranas, géis, filmes, fibras, microcápsulas e microesferas, para serem aplicados nos mais diversos campos (RHAZI et al., 2002).

Uma microcápsula é definida como uma partícula esférica com tamanho que varia de 50 nm a 2 mm, contendo uma substância no seu centro. Microesferas são, num sentido restrito, partículas esféricas vazias. Porém, os termos são geralmente confundidos e, freqüentemente, usados como sinônimos. As esferas e as partículas esféricas são largamente usadas devido ao seu grande tamanho e morfologia rígida (KUMAR, 2000).

Por outro lado, a quitosana pode ser quimicamente modificada. A reticulação da quitosana (“cross-linked”) com diferentes agentes bi-funcionais, tais como glutaraldeído e epícloridrina, impede que o polímero seja dissolvido, quando o processo de adsorção de metais estiver ocorrendo em soluções ácidas. Outras modificações podem ser realizadas com o objetivo de interagir com algum metal específico (GUIBAL, 2004).

Dentro desse contexto ambiental, o processo de estocagem do carvão mineral não deve ser desconsiderado, pois pode contribuir com a poluição hídrica, produzindo lixívia ácida que

contém poluentes tóxicos como metais pesados. Muitos estudos têm avaliado a aplicação da quitosana na remoção de metais pesados em solução aquosa e sua possível utilização na remediação de efluentes ricos em metais. A avaliação da toxicidade dos efluentes industriais gerados e da efetividade dos sistemas de tratamento e de remediação, através do uso de bioindicadores e de biomarcadores de poluição vem ganhando cada vez mais espaço dentro da legislação ambiental de muitos países. Desta forma, o presente trabalho constitui-se num estudo avaliativo preliminar da eficácia da remediação de efluentes de lixiviação de carvão utilizando alguns bioindicadores e biomarcadores de efeito e exposição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

1. Avaliar o potencial da quitosana, na forma de microesferas, na remediação de efluentes gerados durante a lixiviação do carvão mineral.
2. Avaliar a utilização de determinados bioindicadores e biomarcadores de poluição aquática na remediação de efluentes de lixiviação de carvão mineral.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar os níveis de contaminação decorrente da lixiviação do carvão mineral com relação à acidez, concentração de metais e compostos fenólicos antes e após a remediação com microesferas de quitosana.
2. Avaliar a toxicidade aguda do efluente não remediado e remediado com microesferas de quitosana através de testes de toxicidade para microcrustáceos (*Daphnia magna* e *Artemia salina*) e teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (*Allium cepa*).
3. Avaliar a toxicidade do efluente não remediado e remediado com microesferas de quitosana, através da medida da atividade das enzimas SOD, CAT, GST e ALA-D, dos níveis de GSH, da medida do dano a lipídios e ao DNA, e do índice somático do fígado.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

Os reagentes: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), glutationa reduzida (GSH), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), ácido delta aminolevulínico, brometo de etídio, di-tiotreitol (DDT), p-dimetilaminobenzaldeído foram adquiridos junto a Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). Os tampões HBSS (Solução de sal balanceada de Hanks) e PBS (Solução fosfato) e as agaroses de ponto de fusão baixo (LMPA) e normal (NMPA), foram obtidos da Gibco BRL (New York, USA). A quitosana foi obtida junto a PuriFarma (São Paulo). Todos os demais reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico.

3.2 Coleta das amostras de efluente

Para realização dos ensaios, foram coletadas amostras de efluente das pilhas de estoque de carvão provenientes da caixa de embarque de uma indústria mineradora localizada no município de Siderópolis/SC. As pilhas de carvão ficam expostas ao tempo e, ao cair a chuva sobre as mesmas, forma-se o efluente lixiviado, o qual é recolhido num tanque para posterior tratamento pela empresa. As amostras do efluente foram coletadas sem nenhum tratamento prévio e armazenadas em galões de polietileno. A partir dessas amostras foram realizadas análises químicas, remediação com microesferas de quitosana e ensaios de toxicidade.

3.3 Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas foram obtidas pelo método de inversão de fases (STOLBERG et al., 1999). Uma solução de quitosana 3% (m/v) foi dissolvida em de ácido acético 5% (v/v) para obtenção de uma solução viscosa. A solução viscosa foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec) num banho contendo solução de NaOH (2,0 M). As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada para eliminar o NaOH residual e secas a 60°C em estufa. A morfologia da microesfera foi analisada empregando um microscópio eletrônico de varredura (modelo PHILIPS XL 30,) do Laboratório de Materiais da UFSC (LABMAT). O diâmetro médio das microesferas de $1,0 \pm 0,06\mu\text{m}$ foi determinado a partir da micrografia de vinte microesferas, através dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal de cada partícula. As microesferas de quitosana foram produzidas pelo grupo QUITTECH (Grupo de Pesquisa em Quitina e Quitosana e aplicações Tecnológicas) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelos professores Mauro C. M. Laranjeira e Valfredo T. de Fávère.

3.4 Caracterização da quitosana

O grau médio de desacetilação ($\overline{\text{GD}}$) foi determinado por titulação condutométrica, empregando um condutivímetro Micronal e um titulador automático Schott Geräte (RAYMOND et al., 1993). A quitosana utilizada no presente trabalho para preparação das microesferas possuía $\overline{\text{GD}}$ de 91%.

3.5 Remediação do efluente utilizando microesferas de quitosana

O efluente a ser tratado passava por uma coluna de vidro com altura de 60 cm e diâmetro de 3 cm empacotada com 80 gramas de microesferas de quitosana. Uma bomba peristáltica estava acoplada ao sistema e mantinha constante o fluxo do efluente que passava pela coluna ($2,6 \text{ ml min}^{-1}$). O pH do efluente tratado foi monitorado durante todo o processo através de um eletrodo colocado logo após a saída do efluente pela coluna. Após a saturação da coluna, o material empacotado foi retirado para sua re-ativação. As microesferas foram colocadas em contato com HCl diluído para remoção dos metais, e posteriormente, foram colocadas em contato com uma solução diluída de NaOH para neutralização dos grupos NH_3^+ protonados do polímero e lavado com água até pH neutro.

3.6 Análises físico-químicas

3.6.1 Determinação do pH

A partir de alíquotas retiradas dos efluentes não remediado e remediado com microesferas de quitosana, foi medido o pH por potenciometria, utilizando um pHmêtro, calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

3.6.2 Determinação da concentração de metais

A concentração dos metais nos efluentes não remediado e remediado com microesferas de quitosana foram determinados por espectrometria de absorção atômica (VARIAN Spectra – AA-50). Para os metais chumbo e cádmio, as determinações foram realizadas por meio de espectrometria de absorção atômica (Analyst 100 Perkin Elmer) acoplado com forno de grafite (HGA 800 Perkin Elmer).

3.6.3 Determinação da concentração de compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos no efluente não remediado e remediado com microesferas de quitosana foi realizada através de método colorimétrico usando o kit para dosagem de fenóis da Permachem Reagents[®]. O método baseia-se na reação do fenol com a 4-aminoantipirina na presença de ferrocianeto de potássio, formando uma antipirina colorida (amarela). O complexo colorido é extraído da solução aquosa com clorofórmio e medido a 460 nm.

3.7 Testes de toxicidade

3.7.1 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados conforme método de MEYER et al. (1982). Cistos de *A. salina* foram incubados durante 48 horas em solução de sal marinho sintético (30g L⁻¹), com aeração e iluminação constantes (1000 lux) e a uma temperatura de 30°C (GOMES, 1986). Após a eclosão, dez larvas do microcrustáceo foram incubadas, em

placas de "multiwell", durante 48 horas a 25°C, na ausência de luz, em 2 mL de amostra dos efluentes não remediado e remediado com microesferas de quitosana diluídos em solução de sal marinho sintético (30g L⁻¹). Os efluentes foram testados em concentrações seriadas (100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3 e 1%) para melhor obtenção da CL₅₀. Controles negativos foram conduzidos paralelamente usando apenas solução de sal marinho sintético. Após 24 e 48h de incubação, foi feita a contagem do número de larvas mortas e a CL₅₀ foi calculada através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), usando o software da Burlington Research-INC. Para cada concentração testada foram realizadas 3 replicatas com 10 larvas em cada. As larvas eram consideradas mortas se não exibissem nenhum movimento interno ou externo durante 20 segundos de observação.

3.7.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade aguda com *D. magna* foram realizados de acordo com as normas da ABNT (NBR 12713: 1993). Antes de analisar a toxicidade dos efluentes, os microcrustáceos passaram por um teste de sensibilidade usando dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) que tem por objetivo avaliar a qualidade do lote das matrizes. Os testes foram feitos em béqueres de 25 ml, em duplicata para cada concentração, além dos controles com água de diluição. Em cada béquer foram colocados 10 dafnídeos jovens (6-24h de vida). Os efluentes não remediado e remediado com microesferas de quitosana foram avaliados em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5 e 6,25%). O ensaio foi mantido a uma temperatura de 20 ± 2°C por 48 horas, em ambiente escuro e sem alimentação. Após 24 e 48h de incubação, os organismos imóveis foram contados e a EC₅₀ foi calculada através do método

matemático Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), usando o software da Burlington Research-INC.

3.7.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (*Allium cepa*)

O teste de inibição do crescimento de raiz foi conduzido de acordo com método de Arambasic et al. (1995) com modificações. Bulbos de cebola (18-26g) foram adquiridos comercialmente de supermercados e mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Anteriormente ao teste de toxicidade os bulbos foram selecionados através de um pré-teste. As raízes velhas foram cuidadosamente removidas e a base dos bulbos foi colocada em tubos Falcon (50 mL) contendo água mineral. Após 3 dias de exposição à temperatura de 25°C e na ausência de luz o crescimento da raiz foi observado. Apenas os bulbos que apresentaram o mesmo padrão de crescimento durante os 3 dias foram selecionados para os testes usando os efluentes. As raízes crescidas durante o pré-teste foram removidas e os bulbos foram reutilizados após ficarem secando por 5 dias. Nos testes de inibição de raiz a base dos bulbos foi colocada em tubos Falcon (50 mL) contendo os efluentes não remediado e remediado com microesferas de quitosana diluídos em água mineral. Para cada concentração dos efluentes (100, 75, 50, 25 e 10%) foram incubadas 5 cebolas durante 9 dias. A cada 3 dias os efluentes eram trocados e as maiores raízes eram medidas usando um paquímetro. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente e no escuro, usando como controle negativo cebolas expostas apenas em água mineral.

3.8 Animais

A espécie de peixe escolhida para os estudos foi a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por tratar-se de uma espécie bastante resistente e por apresentar pequeno tamanho corpóreo mesmo na fase adulta. Foram utilizados somente animais machos (peso= $26 \pm 3,15$ g e comprimento= $11,5 \pm 0,93$ cm) para evitar influência das alterações hormonais e de massa corpórea nos parâmetros avaliados. Os animais foram adquiridos de uma fazenda de criação no Município de Palhoça (SC) e ficaram mantidos em tanques durante 15 dias para aclimação, em condições controladas (sistema claro/escuro natural, temperatura de 25 °C e aeração constante) recebendo ração comercial diariamente (12-13h). Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 diferentes grupos de exposição e transferidos para aquários de vidro (1 animal para cada 5 L de água). Um grupo foi exposto a 10% do efluente de lixiviação não tratado, o segundo grupo foi exposto a 50% do efluente remediado com microesferas de quitosana, e o último grupo foi mantido apenas em água sem cloro (controle negativo). A escolha da concentração de 10% do efluente não remediado foi baseada no teste de toxicidade aguda realizado com as tilápias, o qual indicou uma CL_{50} de 26%. Dessa forma, a concentração de 10% foi a maior concentração do efluente que não causou mortalidade dos animais durante os 7 dias de exposição ao teste de toxicidade. Por outro lado, foi necessário diluir o efluente remediado em 50% pois como processo de remediação estava numa etapa inicial de bancada não era possível remediar um volume muito grande de efluente num espaço curto de tempo. Além do mais, a necessidade de uma renovação constantemente dos efluentes dos aquários, não possibilitou que o efluente remediado fosse usado sem diluição. A cada 3 dias 2/3 dos efluentes dos aquários eram trocados e a cada 7 dias todo o efluente dos aquários era inteiramente substituído. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental, apenas não recebiam alimentação no dia anterior aos testes. Após os períodos

de 7, 15 e 30 dias de exposição 6 animais de cada grupo foram sacrificados, através de transecção cefálica, pesados em balança analítica e medidos com fita métrica. Amostras do sangue foram coletadas da artéria dorsal usando seringa heparinizada e o fígado foi retirado. Todas as amostras foram mantidas em gelo e utilizadas imediatamente para realização das análises. Os fígados dos animais foram pesados em balança analítica para posterior cálculo do índice somático do fígado. A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-UFSC, sob número de cadastro 147/CEUA e protocolo 23080.007332/2002-48.

3.9 Índice somático do fígado (ISF)

Após a morte dos animais os fígados foram removidos e pesados em balança analítica. O índice somático do fígado foi determinado segundo Sloff et al. (1983) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ISF} = \frac{\text{Peso do fígado (g)}}{\text{Peso inteiro do corpo (g)}} \times 100$$

3.10 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)

Após a morte, os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente no gelo. Uma pequena porção foi separada e pesada para a preparação dos homogenatos, obtidos em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogenização foi realizada a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguida de centrifugação a 5.000 g durante 5 minutos.

Os sobrenatantes foram divididos em duas partes: a primeira para a determinação imediata da peroxidação lipídica (TBARS), e a segunda congelada a -20°C até a sua utilização para as diferentes análises dos indicadores de estresse. A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, pela detecção em A_{535} nm dos seus derivados lipoperóxidos, através da determinação das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (OHKAWA, 1979; BIRD & DRAPER, 1984). Os homogenatos foram precipitados com TCA a 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos. Em seguida, incubados em tampão Tris-HCl 60 mM pH 7,4 (0,1 mM DTPA) e TBA 0,73 % durante 60 minutos a 100°C . Após este período o material foi resfriado durante 15 minutos a 4°C e posteriormente centrifugado (5 minutos a 10.000 g). A absorbância foi medida em 535nm, sendo os valores expressos em nmol de TBARS formado g^{-1} .

3.11 Glutathiona reduzida (GSH)

Amostras de fígado foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:10 (p/v) homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 5.000 g durante 5 minutos. Imediatamente após foi realizada a determinação de GSH nestes sobrenatantes. A concentração de pequenos tióis foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos hepático (BEUTLER et al., 1963). A adição de 0,2 ml de DTNB (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão fosfato de potássio pH 8,0 e 0,1 ml do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412nm. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

3.12 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm (MISRA & FRIDOVICH, 1972) mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que gera o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação é retardada pela enzima presente na amostra. Numa cubeta contendo 1,95 ml de glicina 50 mM, pH 10,0 foram adicionados 50 µl de adrenalina 60 mM (mantida em gelo, frasco âmbar e pH em torno de 2,0 para evitar a oxidação). A velocidade de formação do adenocromo foi acompanhada durante cerca de 90 segundos antes do início da reação, para então adicionar a alíquota da amostra (em torno de 20 a 70 µl, dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 4 a 7 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD nestas condições. Os valores da SOD foram expressos em U SOD g⁻¹, ou seja, em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

3.13 Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, quantificou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em 240 nm, pela enzima presente na amostra (AEBI, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 ml da solução de H₂O₂ e 20 µl de amostra. Após homogeneização

a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

3.14 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

As GSTs são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioéteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm (KEEN et al., 1976). A amostra foi adicionada em um meio contendo 10 μl de CDNB (0,1 M), 10 μl de GSH (0,1 M) e 970 μl de tampão fosfato (0,1 M) pH 7,0, sendo que na cubeta de referência o volume de amostra foi substituído por tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressos em $\mu\text{mol de CDNB conjugado min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

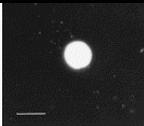
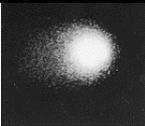
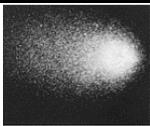
3.15 Avaliação do dano ao DNA (fragmentação do DNA)

A fragmentação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal e microscopia de fluorescência utilizando o teste COMETA (SINGH et al., 1988). Amostras do fígado (0,1 g) foram lavadas em 1 ml de tampão HBSS gelado contendo 20 mM EDTA e 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e cortadas em pequenos pedaços. Para o teste utilizando o sangue, 10 μl de sangue foi diluído em 1 ml de PBS. As demais etapas são as mesmas realizadas para o fígado. As células isoladas (10 μl) foram então embebidas em 75 μl de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; 0,75 %) a 37°C. Esta mistura (células / LPMA) foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal

(NMPA, 1 %). As lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada que continha 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO e 10 mM Tris pH 10, por no mínimo 2 horas. Após este período, as lâminas foram incubadas por 25 minutos em tampão alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) e o DNA liberado foi submetido a uma eletroforese horizontal sobre voltagem de 25V e uma corrente elétrica de 280 mA por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) e coradas com brometo de etídeo (2 µg/ml). A visualização foi feita em um microscópio de fluorescência (400x) com filtro de excitação de 515 e filtro de extinção de 560 nm.

Como controle interno da técnica foram, usados controles positivos a cada eletroforese realizada. Esses controles foram realizados usando 100 µl de H₂O₂ (100 µM) misturados às amostras de sangue e fígado dos animais do grupo controle e incubados durante 15 minutos a 25°C. Para cada animal foram analisadas aleatoriamente imagens de 100 núcleos (50 núcleos por lâmina, em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi classificado visualmente dentro de 5 classes de dano, variando de 0 (cometas sem dano) a 4 (cometas com dano máximo) de acordo com metodologia proposta por Collins et al., (1995). A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação de acordo com as características próprias de cada classe de dano, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Pontuação	0	1	2	3	4
Imagem do cometa					

Para cada animal foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

$$\text{Índice de dano ao DNA} = [(N^\circ \text{ de cometas classe } 0 \times 0) + (N^\circ \text{ de cometas classe } 1 \times 1) + (N^\circ \text{ de cometas classe } 2 \times 2) + (N^\circ \text{ de cometas classe } 3 \times 3) + (N^\circ \text{ de cometas classe } 4 \times 4)].$$

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

3.16 Atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D)

A metodologia de análise da atividade enzimática da ALA-D baseia-se na reação entre o porfobilinogênio (PBG) com o reativo de Erlich modificado, formando um complexo de coloração rosa que é determinada em 553 (SASSA,1982). O fígado dos animais foi homogenizado (1:4 p/v) com tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,4), com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem a 4°C. Em 250 µl de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 5,8) contendo ALA (8 mM) e DDT (20 mM) foi adicionado 25 µl do homogenato e incubado a 37°C durante 1 hora no escuro. A reação foi terminada adicionando 750 µl de TCA (6%) contendo HgCl₂ (0,1 M). Após centrifugação (1.000 g 5 min⁻¹.) 750 µl do sobrenadante foi misturado a 750 µl do reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído 2,5%, ácido acético glacial 75,5%, ácido perclórico 24,5% e cloreto de mercúrio 0,25%) e após 10 minutos foi feita a leitura das amostras em 553nm. Para cada amostra de homogenato foi feito um branco sem adição de ALA, nas mesmas condições acima descritas, e um outro branco sem homogenato para zerar o aparelho. Para o cálculo da atividade enzimática, foi usada a absorbância do teste diminuída da absorbância do branco para cada respectivo teste.

As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressos em nmol de PBG formado g de fígado h⁻¹.

3.17 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância mínimos de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análises físico-químicas

A tabela 4 sumariza os resultados obtidos referentes às análises químicas realizadas no efluente não remediado e remediado com microesferas de quitosana. Com relação à concentração de metais, os dados obtidos demonstram que a remediação do efluente com microesferas de quitosana promoveu uma remoção de 100% de todos os metais com exceção do Mn. Contudo mesmo após a remediação a concentração dos íons sulfatos permaneceu elevada no efluente de lixiviação de carvão. As análises realizadas para determinação de fenol não detectaram a presença desse composto nas amostras. O efluente de lixiviação de carvão é extremamente ácido, todavia após a remediação do mesmo ocorreu uma elevação do pH do efluente para valores próximos à neutralidade.

Tabela 4. Características físico-químicas do efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana. Determinações realizadas em duplicata.

Parâmetros analisados	Efluente não remediado	Efluente remediado
Concentração de metais		
Cd	4,86 µg/L	ALD
Pb	4,96 µg/L	ALD
Cu	0,23 mg/L	ALD
Zn	1,74 mg/L	ALD
Mn	7,24 mg/L	5,60
Al	34,62 mg/L	ALD
Fe	112,00 mg/L	0,07
Concentração de sulfato (mg/L)		
SO ₄ ²⁻	1600,00	1040,00
Concentração de compostos fenólicos (mg/L)		
Fenóis	ALD	ALD
Determinação do pH		
pH	2,1	7,7

ALD= Abaixo do limite de detecção

4.2 Testes de toxicidade

4.2.1 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

A figura 6 apresenta os resultados referentes ao teste de toxicidade aguda usando o microcrustáceo *A. salina* para o efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana. Esses resultados mostraram que o efluente em estudo apresenta elevada toxicidade, causando expressiva mortalidade dos microcrustáceos, sendo que, após a remediação com microesferas de quitosana houve uma redução significativa do índice mortalidade, não sendo possível estabelecer a CL_{50} do efluente remediado, uma vez que somente nas 3 maiores concentrações (100, 75 e 50%) houve mortalidade .

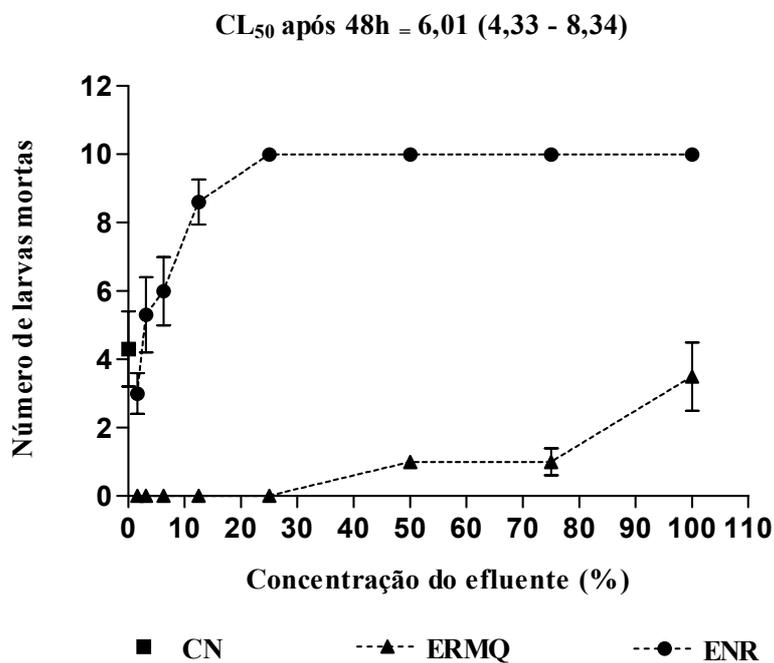


Figura 6. Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *A. salina* após 48h de exposição em diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ), efluente não remediado (ENR) e grupo controle (CN) (solução de sal marinho sintético 3%). Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como média \pm EPM, n=10.

4.2.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O resultado apresentado na figura 7 para o teste de toxicidade aguda com *D. magna* demonstrou, do mesmo modo que para *A. salina*, uma elevada toxicidade do efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado. Novamente, a remediação com microesferas de quitosana diminuiu substancialmente a toxicidade do efluente percebida pela redução significativa do índice mortalidade, não sendo possível estabelecer a CE_{50} do efluente remediado, uma vez que somente na maior concentração houve mortalidade .

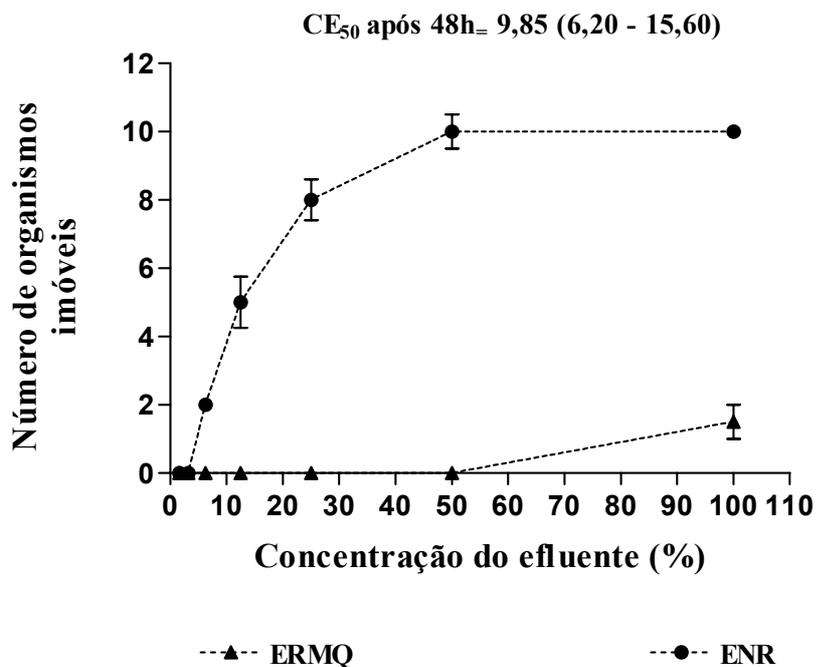


Figura 7. Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *D. magna* após 48h de exposição em diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e efluente não remediado (ENR). Os testes foram realizados em duplicata e os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 10$.

4.2.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (*Allium cepa*)

A tabela 5 apresenta os resultados referentes ao teste de inibição do crescimento de raiz de cebola expostas ao controle negativo (água mineral), ao efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana. Conforme mostra a tabela 5, a inibição do crescimento de raiz foi proporcional à concentração do efluente não remediado e mesmo na menor concentração do efluente (10%) a inibição foi de aproximadamente 30 % com relação ao controle após 9 dias de exposição. Por outro lado, as raízes das cebolas expostas ao efluente remediado com microesferas de quitosana apresentaram um cumprimento 21% maior quando comparado ao grupo controle após o período de exposição.

Tabela 5. Inibição de raiz de cebolas (*Allium cepa*) expostas em água mineral (controle negativo), em diferentes concentrações do efluente de lixiviação de carvão mineral não remediado e remediado com microesferas de quitosana durante 3, 6 e 9 dias de exposição. Os valores foram expressos como média \pm EPM, n =5. (*), (**) e (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao grupo controle (α) e ao grupo do efluente não remediado 10% (β).

Amostras	Crescimento de raiz (cm) durante o tempo de exposição			Inibição de raiz (%) após 9 dias em relação ao controle
	3 dias	6 dias	9 dias	
Controle negativo	3,10 \pm 0,27	6,27 \pm 0,44	7,30 \pm 0,45	0,00
Efluente remediado	2,40 \pm 0,35	β ***6,23 \pm 0,30	α, β ***8,88 \pm 0,27	-21,60
Efluente não remediado 100 %	α ***0,33 \pm 0,08	α ***0,37 \pm 0,07	α ***0,45 \pm 0,10	95,50
Efluente não remediado 75 %	α ***0,63 \pm 0,07	α ***0,68 \pm 0,10	α ***0,72 \pm 0,07	90,40
Efluente não remediado 50 %	α ***0,55 \pm 0,10	α ***0,66 \pm 0,10	α ***0,85 \pm 0,13	89,70
Efluente não remediado 25 %	α ***1,40 \pm 0,15	α ***1,46 \pm 0,21	α ***1,67 \pm 0,10	81,20
Efluente não remediado 10 %	α *1,97 \pm 0,10	α ***3,57 \pm 0,55	α ***5,13 \pm 0,46	29,70

4.3 Índice somático do fígado (ISF)

A figura 8 mostra os resultados referentes ao índice somático do fígado dos animais expostos de 7 a 30 dias ao efluente não remediado ou remediado com microesferas de quitosana. Somente após 30 dias de exposição ao efluente não remediado, os animais apresentaram um ISF 51% maior em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença significativa em relação grupo controle foi observada, para esse parâmetro, nos peixes que ficaram expostos a 50% do efluente remediado.

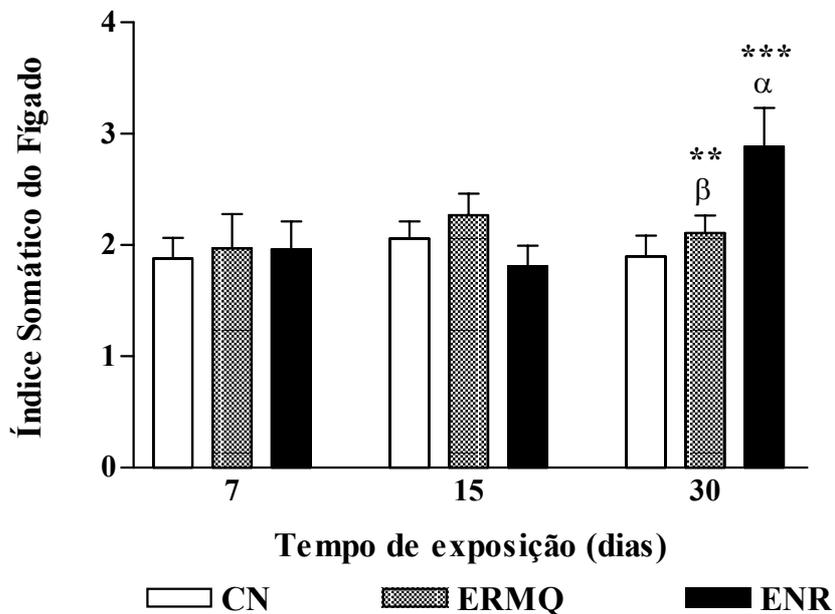


Figura 8. Índice somático do fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.4. Indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

4.4.1 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)

Durante 7 e 15 dias de exposição a 10% do efluente de lixiviação de carvão não remediado, houve um aumento aproximado de 100 e 86%, respectivamente, nos níveis de TBARS dos animais expostos (Figura 9). Após 30 dias o dano tecidual foi reduzido não apresentando diferença com relação ao grupo controle. Por outro lado, nos animais que ficaram expostos a 50% do efluente remediado com microesferas de quitosana, os níveis de peroxidação lipídica não diferiram significativamente do grupo controle durante os tempos de exposição.

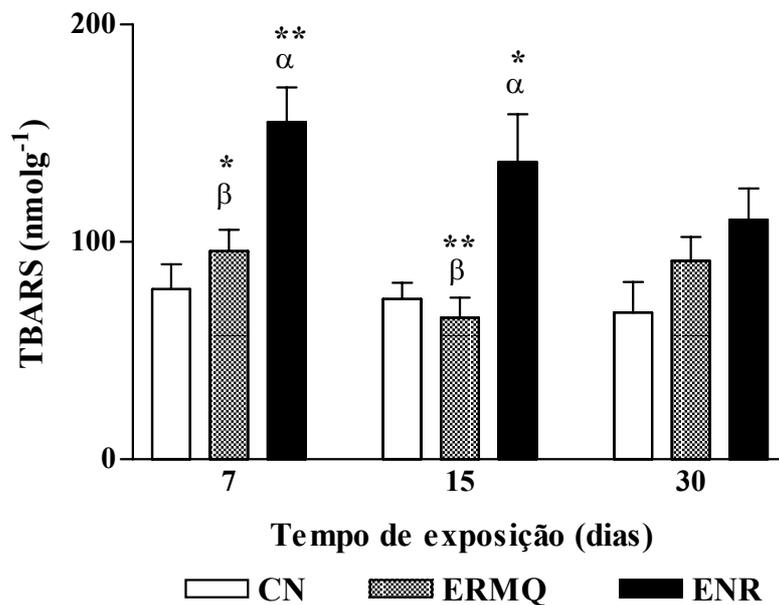


Figura 9. Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol g⁻¹) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (*) e (**) representam diferenças estatísticas significativas (p<0,05) e (p<0,01) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.4.2 Glutationa reduzida (GSH)

Após 7 e 15 dias de exposição, houve uma depleção de aproximadamente 33 e 34%, respectivamente, nos níveis da GSH de tilápias exposta a 10% do efluente de lixiviação de carvão não remediado, quando comparado ao controle negativo. Por outro lado, a exposição de tilápias a 50% do efluente remediado com microesferas de quitosana não alterou os valores de GSH quando comparados aos valores do controle negativo (Figura 10).

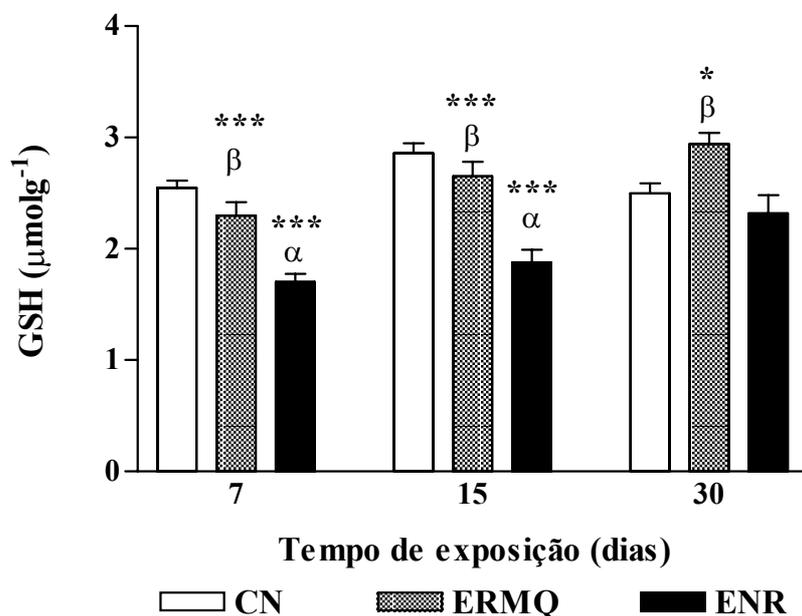


Figura 10. Concentração de GSH (μmolg^{-1}) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*) e (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.4.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A exposição dos peixes por 15 e 30 dias no efluente de lixiviação não remediado causou uma elevação na atividade da SOD em 30 e 36%, respectivamente, quando comparada ao controle negativo (Figura 11). Entretanto, a remediação do efluente com as microesferas de quitosana foi capaz de normalizar a atividade enzimática em relação ao grupo controle, durante os diferentes períodos de exposição. Por outro lado, quando comparado ao grupo exposto ao efluente não tratado, o processo de remediação até mesmo reduziu esta atividade.

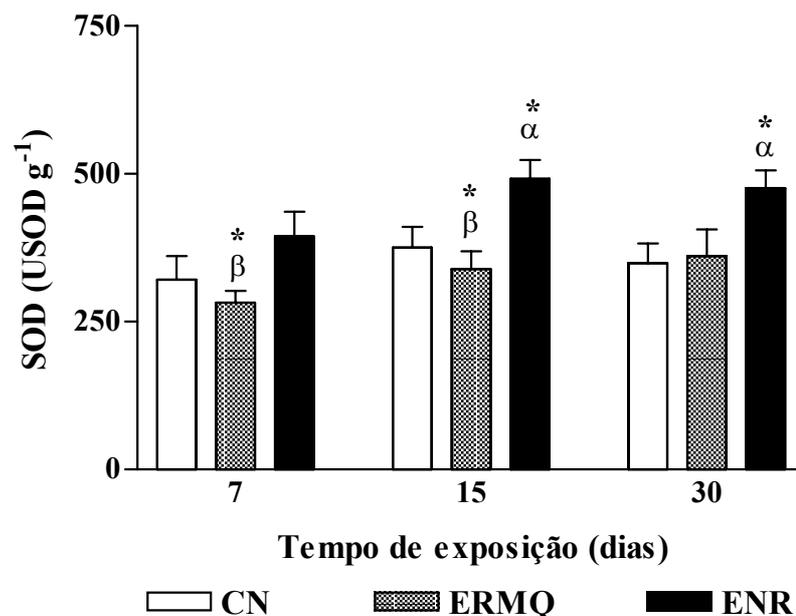


Figura 11. Atividade da SOD (USODg⁻¹) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (*) representa diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.4.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade enzimática da CAT foi alterada significativamente nos peixes expostos ao efluente de lixiviação de carvão sem tratamento. Houve um aumento tempo-dependente na atividade da enzima se comparado com os valores obtidos para o grupo controle. Esse aumento foi de 46, 50 e 56% para os períodos de exposição de 7, 15 e 30 dias, respectivamente. Por outro lado, a atividade da enzima não foi alterada de forma significativa com relação ao controle, nos animais expostos ao efluente remediado com microesferas de quitosana (Figura 12).

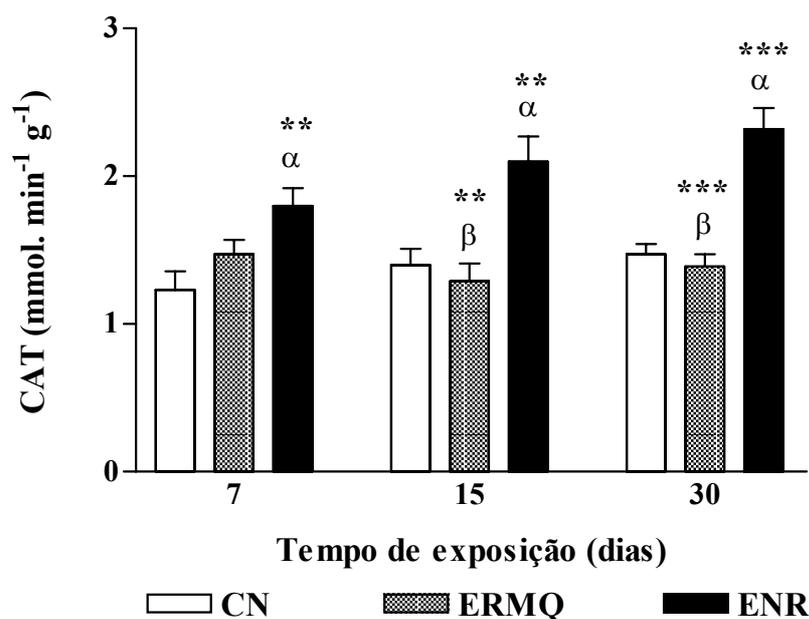


Figura 12. Atividade enzimática da CAT (mmol de H₂O₂ consumido min⁻¹.g⁻¹) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (**) e (***) representam diferenças estatísticas significativas (p<0,01) e (p<0,001) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.4.5 Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST)

Conforme apresentado na figura 13, a atividade da GST só apareceu significativamente alterada, em relação ao grupo controle, após 30 dias de exposição dos peixes ao efluente de lixiviação de carvão não remediado. Para esse grupo, em particular, a atividade da enzima aumentou em 106% quando comparado ao grupo controle. Após remediação do efluente com microesferas de quitosana, a atividade da enzima não diferiu de forma significativa com o grupo controle negativo.

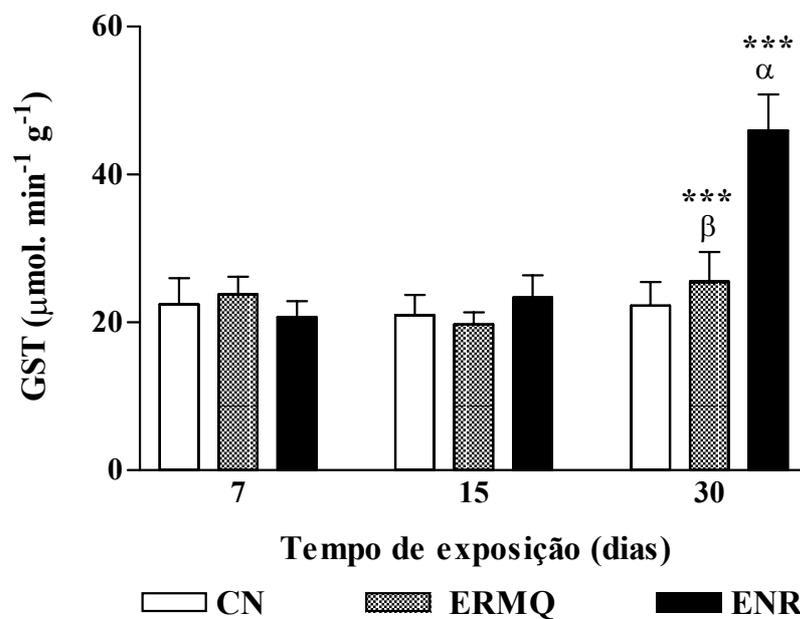


Figura 13. Atividade enzimática da GST (μmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.5 Avaliação do dano ao DNA (fragmentação do DNA)

4.5.1 Avaliação do dano ao DNA em hepatócitos

A figura 14 apresenta a frequência de distribuição de cometas em cada classe para cada grupo analisado ao longo dos períodos de exposição. Os dados para o grupo controle e quitosana mostram uma predominância das classes de menor dano (classes 0 e 1). Por outro lado, no grupo exposto a 10% do efluente de lixiviação não remediado, houve um aumento na frequência das classes de maior dano (classes 2, 3 e 4) em relação ao grupo controle. Semelhante ao grupo controle, no grupo exposto ao efluente remediado houve um predomínio das classes de menor dano.

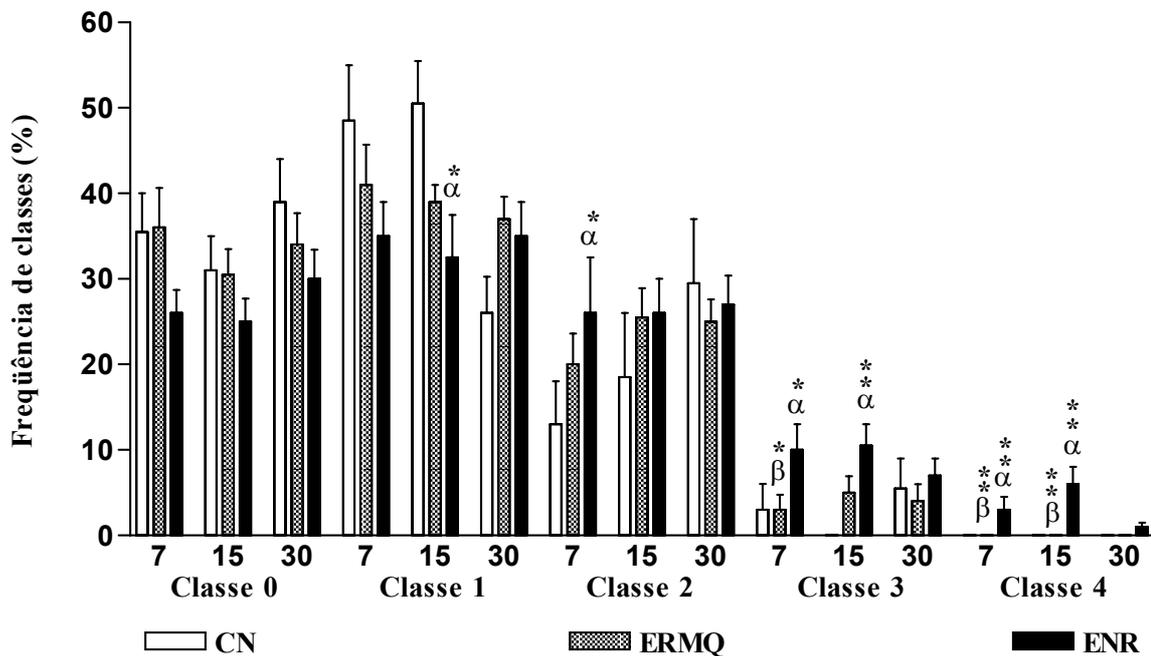


Figura 14. Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados em hepatócitos de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

A partir da frequência das diferentes classes de danos nos cometas, foi possível calcular o índice de dano ao DNA atribuindo valores arbitrários as diferentes classes. Desse modo, o índice de dano pode variar entre 0 (ausência de dano) a 400 (dano máximo). Conforme apresentado na figura 15, o índice de dano ao DNA esteve aumentado, com relação ao grupo controle, em torno de 50% nos hepatócitos dos animais expostos a 10% do efluente de lixiviação de carvão, tanto em 7, quanto em 15 de exposição. No final de 30 dias de exposição ao efluente não remediado, o dano ao DNA teve uma expressiva redução, alcançando níveis equivalentes aos do grupo controle. Nos animais expostos ao efluente remediado com microesferas de quitosana, o índice de dano foi reduzido em aproximadamente 26 e 24% após 7 e 15 dias de exposição, respectivamente, em relação ao grupo exposto ao efluente não remediado. Após remediação do efluente, não houve variações significativas entre o índice de dano do grupo controle e do grupo remediado.

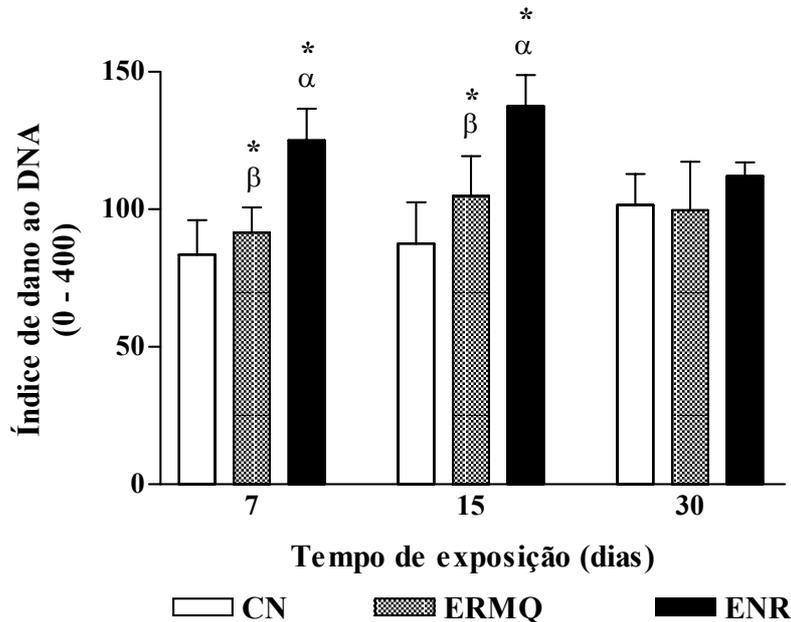


Figura 15. Índice de dano ao DNA em hepatócitos de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.5.2 Avaliação do dano ao DNA em sangue total

A frequência das classes de dano no sangue total dos diferentes grupos expostos é apresentada na figura 16. No grupo exposto a 10% do efluente de lixiviação de carvão não tratado, a frequência de cometas de classe 3 foi 4 vezes maior, comparado ao grupo controle, ao longo dos períodos de exposição. Após a remediação do efluente com microesferas de quitosana a frequência das classes de maior dano (3 e 4) foi expressivamente diminuída em relação ao grupo não remediado.

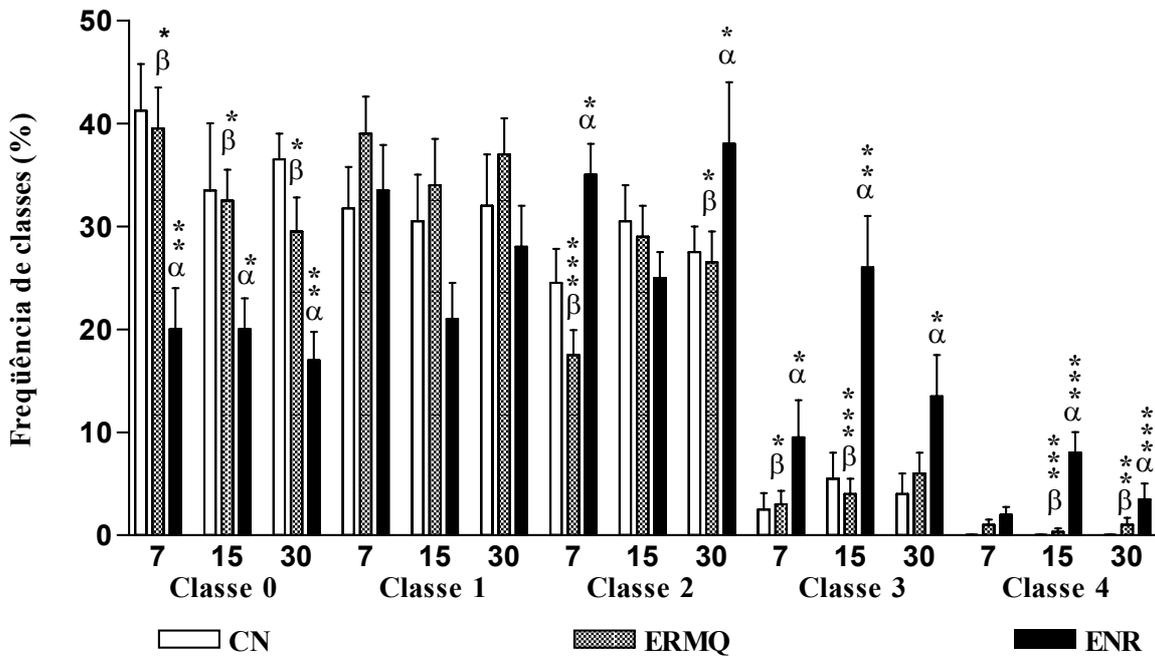


Figura 16. Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados no sangue total de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*), (**) e (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

Os resultados referentes ao índice de dano ao DNA para o sangue total de tilápias exposta as diferentes condições de tratamento são apresentados na figura 17. O índice de dano esteve aumentado, ao longo de todos os períodos de exposição, nos peixes expostos a 10% do efluente de lixiviação de carvão não remediado quando comparados aos animais do grupo controle. Esse aumento foi de 79, 77 e 48% em 7, 15 e 30 dias de exposição, respectivamente. Contudo, após a remediação do efluente com microesferas de quitosana, o dano foi revertido e os valores se normalizaram com o grupo controle.

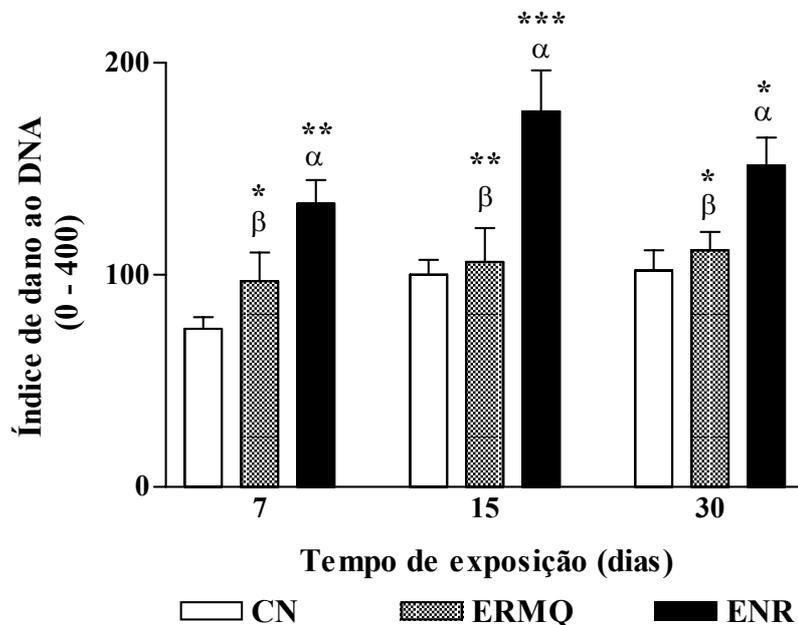


Figura 17. Índice de dano ao DNA no sangue total de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR) durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*), (**) e (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao CN (α) e ao ENR (β).

4.6 Atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D)

Conforme apresentado na figura 18, a atividade da enzima ALA-D nos animais expostos ao efluente de lixiviação de carvão não remediado e remediado, não sofreu alterações estatisticamente significativas quando comparados com os resultados obtidos para o grupo controle.

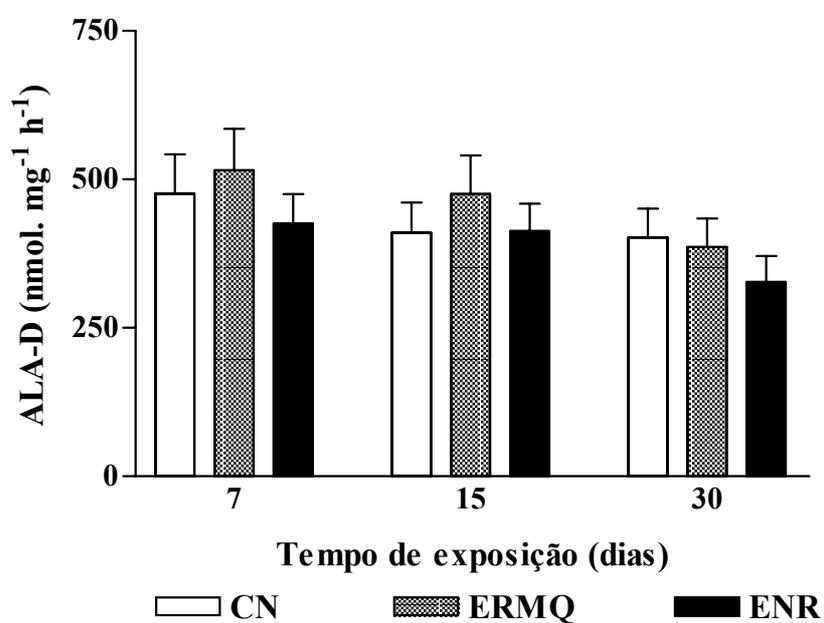


Figura 18. Atividade enzimática da ALA-D (nmol de PBG formado mg de tecido⁻¹h⁻¹) em fígado de tilápias do Nilo expostas à água sem cloro (CN), a 50% do efluente de lixiviação de carvão remediado com microesferas de quitosana (ERMQ) e a 10% do efluente não remediado (ENR), durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6.

5 DISCUSSÃO

Bailey e colaboradores (1999) numa revisão bibliográfica avaliaram a remoção de metais usando adsorventes potencialmente eficientes e de baixo custo. Os adsorventes naturais analisados, foram a lignina, algodão, argila, quitosana, dentre outros. Dentre os adsorventes analisados, a capacidade de retenção da quitosana destacou-se dos demais para os metais Pb (796 mg/g de quitosana), Hg (1123 mg/g de quitosana), Cr (92 mg/g de quitosana) e Cd (558 mg/g de quitosana). Outros trabalhos também têm demonstrado que a quitosana é uma alternativa bastante promissora no processo de adsorção de metais em solução (CÁRDENAS et al., 2001; JUANG e SHAO, 2002; RHAZI et al., 2002; GEREMIAS, et al., 2003; VARMA et al, 2004; FÁVERE et al., *in press*).

As águas de drenagem resultantes do processo de mineração de carvão são caracterizadas pela elevada acidez e alta concentração de metais pesados (MAYO et al., 2000). Estudos realizados em rios de Criciúma por Alexandre e Krebs (1995) concluíram que os parâmetros analisados como pH, concentração de sulfato e de metais (Fe, Mn, Pb, Zn e Cu) não estavam dentro dos limites estabelecidos pela CONAMA para águas que são utilizadas no abastecimento humano.

O efluente de lixiviação de carvão mineral analisado neste trabalho mostrou-se ser extremamente ácido (pH 2,1), além de muito rico em sulfato e em metais como o Fe, o Al e o Mn, principalmente (Tabela 4). De acordo com os critérios do CONAMA estabelecidos pela resolução nº 20 (1992), os efluentes de qualquer fonte poluidora só poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos d'água, desde que obedeçam algumas condições, como pH entre 5 a 9, concentração de Fe de 15mg/L e de Mn de 1 mg/L. Apenas considerando estes 3 critérios o efluente gerado pela lixiviação já não se enquadra dentro dos limites dessa resolução, uma vez que a concentração de Fe e de Mn no efluente é cerca de 7 vezes maior

que o limite permitido, sendo portanto necessário, um tratamento do mesmo antes de liberá-lo para o meio aquático.

Após a remediação do efluente de carvão com microesferas de quitosana, houve uma redução de quase 100% de todos os metais detectados no efluente, exceto para o Mn que sofreu uma redução de apenas 22,65%, além da elevação do pH para 7,7. Esse mesmo padrão de adsorção de metais usando microesferas de quitosana foi observado por Fávere et al. (*in press*). Os autores analisaram a concentração de metais, antes e após o tratamento com microesferas de quitosana, de efluentes gerados de depósitos de carvão. A remediação com microesferas de quitosana reduziu aproximadamente em 100% a concentração de Fe e elevou o pH de 2,5 para 4 do efluente. Por outro lado, para melhorar o desempenho da quitosana tem sido propostas modificações químicas no polímero que visam aumentar a performance do processo de remoção de metais através da complexação com outros compostos (CÁRDENAS et al., 2001; VARMA et al., 2004).

Segundo Ortiz e Teixeira (2002), pelo fato do efluente de carvão ser muito ácido, é necessária uma etapa de neutralização desse efluente para que haja uma melhor precipitação dos metais presentes. Alguns reagentes alcalinos como CaO, CaCO₃, e NaOH são utilizados normalmente na neutralização do pH das águas de drenagem.

Todavia, o tratamento com microesferas de quitosana, como observado na tabela 4, foi eficiente em promover a elevação do pH do efluente de lixiviação para valores próximos à neutralidade. Este efeito da quitosana está provavelmente associado à protonação dos grupamentos amino presentes nas unidades glicosaminas do polímero (YANG & ZALL, 1984). Estes resultados são interessantes, uma vez que a capacidade de elevação do pH no tratamento com quitosana dispensa a necessidade de uma pré-neutralização da acidez do efluente, a qual é previsto nos tratamentos convencionais. Desta forma, pode-se reduzir o

número de etapas necessárias no processo de tratamento dos efluentes de mineração de carvão e também os custos deste tratamento.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos são realizados desde 1940, com o objetivo de prever o impacto do lançamento de agentes tóxicos em recursos hídricos. As informações geradas por esses testes foram utilizadas em alguns países para estabelecer as concentrações limites de certos poluentes que poderiam ser despejados no ambiente, sem provocar sérios desequilíbrios nas comunidades aquáticas (BERTOLETTI, 1990).

O uso dos testes de toxicidade aguda também tem sido uma ferramenta bastante importante na avaliação dos processos de tratamento de efluentes industriais ou esgoto doméstico (BAPTISTA, 2001; SILVA et al., 2004). Guerra (2001) avaliou a toxicidade de efluentes industriais ricos em compostos fenólicos. O autor comparou a sensibilidade de 4 testes de toxicidade aguda usando como organismos testes bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*), *D. magna*, *A. salina* e rotíferos (*Brachionus plicatilis*). Após a exposição dos organismos a 6 diferentes amostras de efluentes não tratado e tratado, o autor estabeleceu uma ordem de sensibilidade entre os organismos expostos. O microcrustáceo *A. salina* mostrou-se menos sensível que os demais organismos utilizados nos testes. Por outro lado, *D. magna* apresentou similar padrão de sensibilidade com *V. fischeri* e *B. plicatilis*.

A resposta estabelecida para o teste de toxicidade aguda com *A. salina* foi a concentração letal média (CL₅₀) capaz de matar 50% das larvas expostas durante 48h de exposição. O critério utilizado para o teste de toxicidade aguda com *D. magna* foi a concentração efetiva média (CE₅₀), que estabelece a concentração do efluente que pode ocasionar a imobilidade de 50% dos organismos expostos durante 48h nos diferentes efluentes.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a toxicidade do efluente de lixiviação de carvão foi bastante elevada, tanto para *A. salina* quanto para *D. magna*, uma vez

que a concentração do efluente que causou efeitos severos (morte ou imobilidade) em 50% da população de ambas as espécies ficou em torno de 10%. Este resultado sugere uma boa correlação de resposta para a toxicidade do efluente em estudo para os dois organismos, embora as larvas de *A. salina* mostraram-se um pouco mais sensíveis que *D. magna*, para esse efluente em particular.

A portaria 17 criada em abril de 2002 pela Fundação do Meio Ambiente (FATMA) estabeleceu os limites do fator de diluição (FD) de diferentes efluentes para *D. magna* e *V. fisheri*. Para os efluentes não relacionados na citada portaria, o FD deve ser igual ou maior que 12,5% para que possam ser eliminados sem tratamento prévio. Isto quer dizer que, nesta concentração não deve ser evidenciado nenhum efeito tóxico (imobilidade ou pouca luminescência) nos organismos expostos. Nos presentes resultados, a toxicidade do efluente de lixiviação de carvão foi elevada para *D. magna*, uma vez que causou a imobilidade de 50% dos organismos expostos, mesmo numa concentração menor (9,8%) a que foi estabelecida por essa portaria. Dessa forma, o efluente analisado neste trabalho não pode ser eliminado em corpos hídricos sem devido tratamento.

Nesse sentido, a remediação do efluente com microesferas de quitosana conseguiu reverter eficientemente a toxicidade do efluente em estudo (Figura 6), diminuindo fortemente a mortalidade dos dafnídeos expostos nas amostras remediadas, de forma que não foi possível estabelecer a CE_{50} do efluente remediado, para a espécie analisada, uma vez que ocorreu mortalidade apenas nas maiores concentrações do efluente remediado.

O teste de toxicidade aguda usando *A. salina* foi utilizado por Geremias et al., (2003) para monitorar o processo de remediação utilizando microesferas de quitosana complexadas. As larvas foram expostas por 24h a dois efluentes de carvão (mina subterrânea e lixiviação de depósitos) não remediados e remediados. Os autores observaram uma redução aproximada de 90% da mortalidade das larvas após a remediação com microesferas de quitosana

complexadas. Embora as microesferas de quitosana usadas em nosso trabalho não possuíssem nenhuma complexação com outros compostos, ela conseguiu reduzir eficientemente a toxicidade do efluente e, conseqüentemente, a porcentagem de larvas mortas em 65%.

Villegas-Navarro et al., (1999) avaliaram a eficiência nos processos de tratamento de efluentes têxteis de 5 indústrias do México. Para tanto, os autores usaram *D. magna* para monitorar a toxicidade dos efluentes, antes e após o tratamento das empresas. Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que, apesar de ter havido uma redução na toxicidade dos efluentes, os sistemas de tratamento adotados pelas empresas eram deficientes, uma vez que CL_{50} dos efluentes tratados variou de 66 a 14%.

Desta forma, considerando uma avaliação similar à realizada por estes autores podemos sugerir que o tratamento com microesferas de quitosana reduziu fortemente os níveis de metais presentes no efluente e elevou o pH do mesmo, refletindo na redução da toxicidade do efluente, já que a mortalidade dos microcrustáceos diminuiu drasticamente após a remediação.

Outro parâmetro comumente utilizado para uma rápida avaliação da toxicidade de um efluente é o teste de inibição do crescimento de raiz de cebola. Rank e Nielsen (1998) analisaram a inibição do crescimento de raiz de cebolas expostas a diferentes concentrações de lodo de esgoto doméstico obtido de 3 estações de tratamento. Após exposição de 5 dias foi determinada a concentração de lodo capaz de inibir em 50% o crescimento das raízes. Os autores encontraram uma boa correlação entre o grau de inibição do crescimento e a concentração de metais das 3 amostras. Neste caso, a maior inibição do crescimento de raiz ocorreu na amostra que apresentava a maior concentração de metais pesados.

Smaka-Kincl et al. (1996) utilizaram o teste de inibição do crescimento de raiz, o índice mitótico, a presença de micronúcleo e as aberrações cromossômicas, para avaliar a toxicidade de 7 amostras de água com diferentes níveis de poluição. Os resultados mostraram

que as cebolas expostas por 7 dias à amostra de água com maior toxicidade apresentaram inibição no crescimento de raiz maior que 50%, queda de 36% no índice mitótico, aumento de 3% no número de micronúcleos e a presença de núcleos aberrantes 10 vezes maior, em comparação ao controle.

No presente estudo, a inibição do crescimento de raiz foi proporcional à concentração do efluente de lixiviação de carvão (Tabela 5). A maior inibição do crescimento da raiz ocorreu em cebolas expostas a 100% do efluente (inibição de 90%) e a menor inibição foi observada em 10% do efluente (inibição de 29%), quando comparado ao grupo controle (água mineral).

Contudo, as cebolas que ficaram expostas ao efluente remediado com microesferas de quitosana não apresentaram inibição no crescimento de suas raízes, mas ao contrário, houve um aumento de 21%, em relação ao controle, no tamanho final das raízes de cebolas expostas ao efluente remediado. Esse aumento pode ser resultado da variabilidade natural dos bulbos adquiridos para o teste e não um efeito promotor de crescimento que tenha surgido após o tratamento com a quitosana. Mais uma vez, estes resultados confirmaram os dados obtidos com os ensaios com *A. salina* e *D. magna* onde se observou claramente uma redução da toxicidade do efluente de lixiviação de carvão após a remediação com microesferas de quitosana.

Um outro parâmetro que pode ser utilizado no estudo da toxicidade de um efluente qualquer é o índice somático do fígado (ISF). Isto porque, durante o período de alta captação de energia, o crescimento de tecidos e a estocagem de energia nos músculos e no fígado podem ocasionar um aumento dos órgãos acima da média encontrada para uma certa idade. Esse excesso de peso é conhecido como fator de condição e tem sido utilizado como um índice em muitos estudos com peixes (EVERAARTS, 1993; HOQUE et al., 1998).

A exposição a poluentes ambientais pode resultar num aumento do ISF dos peixes, embora a exposição a outros contaminantes (efluentes ácidos e metais pesados) pode reduzir o ISF comparado ao controle (RICARD et al., 1998). Norris et al. (2000) observaram uma significativa redução no ISF de truta marrom exposta por dois anos em rio contaminado principalmente por Cd e Zn, em relação aos animais do local não poluído.

Contrariamente a estes dados da literatura, no presente trabalho o ISF esteve aumentado nos peixes expostos ao efluente de lixiviação de carvão não remediado após 30 dias, enquanto que nos animais expostos ao efluente não remediado nenhuma diferença significativa foi observada com relação ao grupo controle para esse parâmetro.

Wilhelm Filho et al. (2001) relataram que o ciclídeo acará capturado de um rio poluído apresentou um ISF maior que o encontrado para os animais do local controle. Os autores observaram através de estudos histológicos uma elevada infiltração de lipídeos no órgão dos animais expostos ao rio contaminado.

Também é possível que o aumento do ISF nos peixes expostos ao efluente não remediado seja o reflexo da indução de algumas proteínas detoxificadoras e/ou uma maior mobilização de moléculas para produção de energia no fígado na tentativa de reverter o desequilíbrio provocado pela condição de injúria.

O efluente empregado neste estudo apresentou uma elevada concentração de Fe, Cu e Zn. Embora esses metais sejam essenciais para o bom funcionamento de certos sistemas biológicos, em excesso ou livres no interior da célula eles podem ser prejudiciais, pois podem atuar como catalisadores nas reações que levam a formação do radical hidroxil (BURY & GROSELL, 2003). Essa espécie particular de EROs é a mais reativa delas e pode causar oxidação de biomoléculas importantes como DNA e proteínas, além de comprometer a estabilidade das membranas celulares oxidando os lipídios presentes nas mesmas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A determinação das espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma medida indireta do processo de oxidação que ocorre nos lipídios das membranas celulares, principalmente nos ácidos graxos poliinsaturados por serem mais susceptíveis ao ataque oxidativo das EROs. Dentre os peróxidos de lipídeos formados, que reagem com o TBA, destaca-se o malondealdeído, embora outros compostos como açúcar, aminoácidos e bilirrubina podem reagir também com o TBA (MEAGHER & FITZGERALD, 2000).

No presente trabalho os níveis de TBARS das tilápias expostas a 10% do efluente de lixiviação de carvão não remediado estiveram elevados durante 7 e 15 dias de exposição (Figura 9). Decorridos 30 dias de exposição, o dano tecidual nesses animais foi reduzido e os níveis de TBARS não apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo controle. Possivelmente, esse aumento nos níveis de TBARS observado nos animais expostos ao efluente não remediado seja decorrente da elevada concentração de metais de transição presentes nesse tipo de efluente. A ausência de dano após 30 dias de exposição, pode ser provavelmente uma resposta adaptativa dos peixes expostos a um período de tempo maior, refletida na elevação das defesas antioxidantes, como a GSH e as enzimas citoprotetivas (SOD, CAT e GST). Após o processo de remediação, os níveis de TBARS foram reduzidos em cerca de 38 e 52% após 7 e 15 dias de exposição, respectivamente, quando comparados aos valores do grupo exposto ao efluente não remediado para os mesmo períodos.

Diferentemente, nos animais que ficaram expostos a 50% do efluente remediado com microesferas de quitosana, os níveis de peroxidação lipídica não diferiram significativamente do grupo controle durante os diferentes tempos de exposição. Esse resultado reforça a idéia de que os metais de transição podem ter sido a causa do dano observado nos animais expostos ao efluente não remediado, uma vez que após a remediação houve uma redução de quase 100% desses metais contidos no efluente.

Ahmad et al. (2000) encontraram uma boa correlação entre os níveis de TBARS e os demais biomarcadores analisados em peixes expostos a poluentes ambientais. Os autores observaram que, em *Channa punctatus* exposto 60 dias em efluente (1% v/v) da indústria de papel, houve um aumento nos níveis de TBARS nas brânquias e nos rins, embora no fígado esses níveis não diferiram dos controles. Segundo os autores, essa resposta diferencial dos níveis de TBARS entre os tecidos é explicada pelo fato do fígado ser o principal órgão de biotransformação do animal, o que pode levar a uma maior geração de EROs, e por isso, as defesas antioxidantes são mais atuantes no fígado do que nos outros órgãos.

A alteração nas defesas antioxidantes representa um mecanismo de defesa celular para combater a toxicidade das EROs e que tem sido muito usado em vários estudos para determinar a toxicidade dos poluentes (WILHELM FILHO, 1996). A GSH é o principal tiol não protéico associado a uma variedade de funções celulares. Dentre essas funções, duas estão envolvidas na detoxificação, como na conjugação com intermediários eletrofílicos, principalmente via atividade da GST na fase II da biotransformação e participando como um importante antioxidante pela neutralização direta, não enzimática de metabólitos reativos (GALLAGHER & DI GIULIO, 1992.). Por outro lado, existe uma consistente correlação entre o elevado nível de GSH endógena e a proteção contra exposição a xenobióticos.

Os resultados mostraram que o nível de GSH sofreu uma significativa depleção com relação ao controle, nos animais expostos ao efluente de lixiviação não remediado durante 7 e 15 dias (Figura 10), coincidindo com uma elevação do TBARS. Ao final da exposição, o nível de GSH atingiu valores próximos ao controle, período no qual os níveis de TBARS também se normalizaram. Por outro lado, após a remediação do efluente com microesferas de quitosana, os níveis de GSH não apresentaram variações significativas durante os diferentes períodos de exposição, mantendo valores semelhantes ao do grupo controle negativo. Esse fato sugere que as defesas antioxidantes não foram acionadas e corroboram os dados obtidos

com a lipoperoxidação onde os níveis de TBARS mantiveram-se num patamar de normalidade nos animais expostos ao efluente remediado.

Uma vez que o ciclo tiol redox da GSH é um importante mecanismo de defesa antioxidante, a depleção celular da GSH, como observada neste trabalho com os peixes expostos ao efluente não remediado, pode produzir um estado pró-oxidante intracelular (WINSTON, 1991). Maracine e Segner (1998) investigaram a importância da GSH na proteção de células de peixe contra metais pesados. Eles observaram que o aumento da citotoxicidade por Hg, Cu e Cd foi acompanhado pela depleção dos níveis celulares de GSH indicando uma função protetora desse tripeptídeo frente a uma exposição por metais.

Por outro lado, conforme pontuou Canesi et al. (1999), a GSH é capaz de complexar e detoxificar metais pesados tão logo eles entrem na célula, representando desta forma, uma primeira linha de defesa contra a toxicidade gerada por metais. A resposta celular modulatória da GSH frente à exposição por metais, deve estar relacionada com a função de quelação da molécula, isto é, através do seqüestro de metais pelos grupamentos sulfrídila da GSH. Portanto, é possível que a depleção dos níveis de GSH, observada nos primeiros 7 e 15 dias de exposição ao efluente de lixiviação não remediado, esteja associada, tanto com a sua função de “scavenger” de EROs, quanto à quelação de metais.

No presente estudo, os níveis de GSH, a concentração de TBARS e dano ao DNA no fígado de tilápias expostas ao efluente de lixiviação não remediado, mostraram uma correlação inversa. Ou seja, enquanto os níveis de TBARS e o dano ao DNA estiveram elevados durante 7 e 15 dias nos animais expostos, o conteúdo de GSH havia sofrido significativa redução nos mesmos períodos. De igual modo, o aumento do conteúdo de GSH ao final da exposição, coincidiu com uma diminuição do dano tecidual e da fragmentação do DNA nesses animais. Provavelmente, a diminuição desses danos após 15 dias de exposição, não esteja relacionada somente ao aumento dos níveis intracelulares de GSH, mas também

com a ativação das enzimas citoprotetivas que também promovem a retirada das EROs do meio intracelular.

A elevação da atividade da SOD observada neste trabalho sugere que os animais enfrentaram uma situação de estresse oxidativo com um aumento na geração de $O_2^{\bullet-}$, já que a dismutação desse ânion ficou evidenciado pela elevação da atividade da enzima. Como observado em nos resultados (Figura 11), após 15 e 30 dias de exposição ao efluente não remediado, houve um aumento estatisticamente significativo da atividade da SOD em relação ao grupo controle.

Também a atividade enzimática da CAT foi aumentada nos peixes expostos ao efluente de lixiviação de carvão sem tratamento, com o passar do tempo de exposição (Figura 12). O aumento da atividade da CAT sugere a presença de compostos tóxicos no efluente de carvão não remediado que tenham favorecido a formação de peróxido de hidrogênio, potencializando a produção do radical hidroxil via reação de Haber-Weiss. Também esta elevada atividade da CAT, nos animais expostos ao efluente não remediado, poderá ser um indicativo de uma forte geração de $O_2^{\bullet-}$ que foi dismutado pela SOD, uma vez que esse radical livre de oxigênio pode ser facilmente convertido em peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição como o Fe e Cu. De fato, os dados obtidos com a CAT acompanham o aumento da atividade da SOD nos diferentes tempos avaliados.

Portanto, este aumento progressivo da atividade enzimática poderia estar relacionado com uma resposta adaptativa do animal frente a uma exposição continuada aos poluentes tóxicos do efluente de carvão. De forma semelhante, em *Channa punctatus* exposto a 1% do efluente da indústria de papel, a atividade da CAT esteve aumentada, com relação ao controle, após 60 e 90 dias de exposição (AHMAD et al., 2000).

O aumento concomitante das atividades da SOD e da CAT frente à exposição por poluentes que induzem estresse oxidativo também tem sido demonstrado por outros trabalhos.

Siraj e Rani (2003) observaram que as atividades da CAT e SOD estavam aumentadas no fígado de tilápias expostas durante 7, 15 e 30 dias à concentração sub-letal de cádmio. Diferentemente, Bainy et al., (1996) evidenciaram um aumento na atividade da SOD (242%) no fígado de tilápias do Nilo mantidas em local poluído da represa Billings em São Paulo, enquanto que a atividade da CAT sofreu uma redução de 25% com relação ao grupo controle .

Nos animais expostos ao efluente remediado com microesferas de quitosana, as atividades dessas enzimas não foram alteradas de forma significativa com relação ao controle, mostrando mais uma vez que o processo de remediação foi eficiente na remoção de Fe e outros metais poluentes que potencialmente induziram o estresse oxidativo em peixes.

Segundo Lenártova et al.(1997), os peixes expostos a contaminantes tendem a se ajustar às condições de estresse oxidativo, como reflexo de um processo de adaptação a esse ambiente hostil na qual estão expostos. Essa resposta adaptativa está geralmente acompanhada da indução das enzimas de defesas antioxidantes, com a concomitante depleção de compostos antioxidantes não enzimáticos como GSH e vitaminas (E e C), fato parcialmente observado neste estudo.

Ainda com relação ao dano oxidativo e a proteção antioxidante, este trabalho mostrou que o dano provocado, possivelmente pela formação das EROs, prosseguiu até os 15 dias de exposição, voltando a normalizar ao final dos 30 dias. A redução nos níveis de TBARS e no dano ao DNA no fígado coincidiram com o aumento das defesas antioxidantes (GSH, GST, CAT e SOD) nos peixes expostos ao efluente de lixiviação de carvão não remediado. Embora esse comportamento indique uma adaptação dos animais a uma exposição sub-crônica ao efluente, este estado aparentemente adaptativo dos animais expostos ao efluente poderia ter sido obtido às custas de energia adicional e à manutenção deste estado adaptativo poderia ser rompida se os peixes fossem expostos cronicamente ao efluente.

As GSTs têm sido reportadas como biomarcadores para avaliar o impacto ambiental de compostos orgânicos que geram estresse oxidativo, além de estarem envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos reativos (DI GIULIO et al., 1995). Curiosamente, a atividade da GST esteve significativamente aumentada (Figura 13) no fígado de tilápias expostas a 10% do efluente de lixiviação de carvão não remediado após 30 dias de exposição, sugerindo a existência de processos oxidativos de biotransformação, particularmente fase I, com a geração de metabólitos reativos. Contudo, a análise que realizamos para avaliar a presença de compostos orgânicos aromáticos, não detectou compostos fenólicos no efluente de lixiviação de carvão, embora a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos tenha sido confirmada no carvão por outros estudos (SRÁM et al., 1985).

Da mesma forma, é possível que o aumento da atividade da GST nos peixes expostos ao efluente não remediado se deva à participação desta enzima na manutenção celular das defesas antioxidantes. Pois, como salientado por Stephensen et al. (2002), embora as GSTs não sejam enzimas relacionadas diretamente com a defesa antioxidante celular, elas contribuem indiretamente com esse mecanismo, uma vez que podem conjugar GSH a produtos gerados durante a lipoperoxidação das membranas.

Neste sentido, é importante ressaltar que a indução da GST coincidiu com o aumento dos níveis de GSH observado no mesmo período nesses animais. Esse aumento da atividade da GST com a concomitante elevação dos níveis da GSH, em animais expostos a poluentes ou a ambientes poluídos, tem sido demonstrado em outros trabalhos com peixes de água doce (WILHELM FILHO, 1997; PANDEY et al.; 2003; SAYEED et al., 2003).

No efluente remediado com microesferas de quitosana, não foram encontrados mudanças na atividade da GST, que fossem significativamente diferentes do grupo controle. Esse fato talvez seja atribuído à eliminação de outros possíveis compostos orgânicos presentes

no efluente ou ainda, uma redução na concentração de substâncias com potencial oxidativo que foram removidas após a remediação do efluente.

Suposições semelhantes foram levantadas por Geremias et al. (2003) onde a remediação de efluente de beneficiamento de carvão usando microesferas de quitosana complexadas promoveu uma maior captação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, uma vez que a toxicidade aguda do efluente foi reduzida, se comparado ao tratamento apenas com a quitosana.

Durante o ataque das EROs ao DNA poderia haver oxidação das bases do DNA e quebras de fita simples e dupla na molécula (ZWART et al., 1999). Nas duas últimas décadas houve um grande desenvolvimento na pesquisa de novas metodologias para a determinação de danos ao DNA. Rydberg e Johanson, em 1978, foram os primeiros a quantificar o dano ao DNA em células lisadas misturadas à agarose em meio alcalino. Posteriormente, em 1984, Ostling e Johanson aumentaram a sensibilidade de detecção do dano em células isoladas ao desenvolverem uma técnica de eletroforese em microgel, que ficou conhecida como teste Cometa. Modificações dessa técnica permitiram a detecção de quebras de fita dupla devido à condição neutra da eletroforese e, subseqüentemente, foi possível a detecção de quebras de fita simples usando uma condição alcalina para a eletroforese (ROJAS et al., 1999).

A aplicação do teste Cometa nos programas de biomonitoramento ambiental ganhou forças devido a algumas vantagens do uso dessa técnica tais como simplicidade, sensibilidade, rápida resposta e necessidade de uma quantidade pequena de célula. Pelo fato de que qualquer célula eucariótica pode ser avaliada através desse teste, diferentes organismos sentinelas expostos (peixes, mexilhões e anfíbios) estão sendo empregados no monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por poluentes potencialmente genotóxicos (COTELLE & FÉRARD, 1999).

Neste estudo houve uma maior frequência das classes 3 e 4 nos hepatócitos (Figura 14) dos peixes expostos ao efluente de lixiviação de carvão não remediado durante 7 e 15 dias quando comparado ao controle negativo, o que significou uma maior fragmentação do DNA, como revelado pelo índice de dano. Contudo, o dano ao DNA diminuiu ao final de 30 dias de exposição ao efluente não remediado (Figura 15), normalizando com o grupo controle, sugerindo que, possivelmente, as enzimas de reparo foram acionadas.

Silva et al., (2000) avaliaram a fragmentação do DNA, pelo teste Cometa, e a frequência de micronúcleos de roedores fossoriais de duas regiões de intensa atividade mineradora do Rio Grande do Sul. Os resultados com micronúcleo não se apresentaram diferentes dos obtidos para o controle, contudo, o teste Cometa indicou que o carvão e seus produtos, não só induziram dano ao DNA das células sanguíneas, como de outros órgãos, principalmente fígado, rins e pulmão.

Com o propósito de comparar a resposta de dano ao DNA entre tecidos diferentes, realizamos o teste Cometa utilizando o sangue dos animais em estudo. Da mesma forma que para o fígado, a fragmentação do DNA no sangue foi maior nas tilápias expostas ao efluente não remediado (Figura 16), se comparada ao grupo controle. Por outro lado, enquanto que no fígado o dano foi atenuado ao final da exposição, no sangue esse dano permaneceu elevado após 30 dias (Figura 17). Outra diferença entre os dois órgãos é que o índice de dano ao DNA foi mais elevado no sangue do que no fígado dos animais expostos ao efluente não remediado.

Essa resposta diferencial poderia ser fruto de um sistema de reparo mais eficiente no fígado do que no sangue, uma vez que a maior parte dos danos observados no teste Cometa poderiam ser facilmente reparados, com exceção das lesões de classe 4 que indicam estágio de apoptose (COLLINS et al., 1995). Infelizmente, não foi realizado neste trabalho o teste do micronúcleo no sangue dos animais expostos. O aumento da frequência dos micronúcleos nas células dos animais expostos poderia fornecer uma maior certeza em afirmar que no sangue o

sistema de reparo estaria sendo menos eficiente e, por isso, o dano tenderia a ser maior e mais prolongado. Adicionalmente, sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de endobióticos e pela biotransformação de compostos tóxicos e onde as defesas enzimáticas atuam mais intensamente que em outros órgãos (BUHLER & WILLIAMS, 1988).

Por outro lado, quando os animais foram expostos ao efluente remediado com microesferas de quitosana o dano ao DNA, observado tanto no fígado quanto no sangue, manteve-se dentro dos níveis encontrados para os controles, indicando que o processo de remediação removeu possíveis contaminantes genotóxicos presentes neste tipo de efluente. Diferentemente deste resultado, Lima et al. (2004) observaram que em tilápias do Nilo expostas ao efluente de suinocultura tratados em lagoas de estabilização, o dano ao DNA permaneceu elevado quando comparado ao controle, mostrando que o processo de tratamento não conseguiu eliminar a carga tóxica do efluente gerado, ou ainda, que o agente agressor presente neste tipo de efluente teria um maior potencial genotóxico.

Claxton e colaboradores (1998), numa pequena revisão, mencionaram estudos onde o tratamento de efluente da indústria de polpa e papel de celulose, em lagoas de aeração conseguiu reduzir ou eliminar a genotoxicidade desse efluente após o tratamento. Contudo, em muitos outros casos, conforme citado pelos autores, o processo de remediação pode elevar a genotoxicidade de certos efluentes. Por exemplo, a biorremediação de óleo cru usando certas espécies de fungos aumentou o potencial genotóxico do óleo, ao invés de diminuí-lo. Portanto, mais uma vez a remediação do efluente de lixiviação mostrou-se interessante já que revelou, por meio do teste Cometa, que a genotoxicidade do efluente foi drasticamente reduzida após a remediação do mesmo.

A determinação da atividade da ALA-D é uma importante ferramenta utilizada no biomonitoramento de ambientes contaminados por metais pesados. É sabido que metais

pesados, particularmente o chumbo, é capaz de inibir a atividade desta enzima mesmo em baixas concentrações (ASTRIN et al., 1987). Já o Cd, Zn e Cu podem inibir a enzima somente em concentrações superiores a 500 µg/dl. Também outros metais podem inibir esta enzima de forma inespecífica desde que estejam em elevadas concentrações (superiores a 2000 µg/dl) (KHANDELWAL et al., 1987). Embora a concentração de Pb tenha sido muito baixa no efluente de lixiviação, para outros metais ela foi elevada, mesmo assim essa concentração não foi suficiente para alterar significativamente a atividade da ALA-D nos animais expostos a 10% do efluente não remediado (Figura 18). Com o passar do tempo de exposição, observou-se uma tendência de inibição da atividade da ALA-D ao final dos 30 dias, porém essa variação não foi estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Do mesmo modo, não houve diferença entre a atividade da ALA-D do grupo controle e do grupo exposto ao efluente remediado com microesferas de quitosana.

Campana e colaboradores (2003) não observaram, após 7 dias, uma inibição significativa da ALA-D no fígado de peixes que receberam uma injeção intraperitoneal de Pb (100µg/L). Os autores argumentaram que provavelmente a ausência de inibição da ALA-D, por um metal pesado que reconhecidamente inibe essa enzima, pode ser devido a um aumento dos níveis de metalotioneínas (MTs) encontrado no fígado desses animais após 7 dias de tratamento.

As MTs são uma família de proteínas induzíveis que se ligam a metais e possuem uma função importante na regulação do conteúdo intracelular de metais e no processo de detoxificação. A indução de MTs já foi observada em peixes expostos a Zn, Hg, Cu, Pb e Cu. O aumento da concentração de metais no interior da célula estimula uma nova síntese de MTs que podem se ligar aos metais e diminuir os efeitos tóxicos dos mesmos sobre a célula (LINDE, et al., 2001).

Embora neste trabalho não tenha sido determinado a atividade das MTs, é possível especular que a indução dessas enzimas, ao longo do experimento, possa ter contribuído para uma manutenção satisfatória da atividade da ALA-D nos peixes expostos ao efluente não remediado. Do mesmo modo, a falta de resposta para ALA-D em outros experimentos que avaliaram a toxicidade de ambientes contaminados por metais pesados pode ter sido decorrente da indução das MTs durante o período de exposição (ALVES, 2003).

Por outro lado, da mesma forma que no teste Cometa, onde houve uma resposta diferenciada para os tipos celulares, é possível que a atividade da ALA-D seja melhor evidenciada no eritrócito do que no fígado, uma vez que este tipo celular concentra grande parte do conteúdo de hemoglobina, portanto de grupamento heme, do organismo animal. Infelizmente, devido ao pequeno volume sanguíneo coletado dos peixes expostos não foi possível realizar a determinação desta enzima no sangue.

Em resumo, o presente trabalho demonstrou que a exposição aguda dos microcrustáceos, bem como da raiz de cebola ao efluente de lixiviação de carvão não remediado acarretou uma importante toxicidade para estes organismos, com elevada mortalidade dos animais e forte redução do crescimento das raízes. Por outro lado, a remediação do efluente com microesferas de quitosana, reduziu sensivelmente a toxicidade desse efluente, devido principalmente a elevação do pH e a remoção dos metais presentes no efluente, com exceção do Mn. Além do disto, a exposição de peixes a curto e médio prazo, ao efluente não remediado, causou uma maior expressão dos indicadores de estresse oxidativo e das defesas antioxidantes: elevação dos níveis de TBARS, fragmentação do DNA e atividade da SOD, CAT e GST, associado a uma redução de GSH. Da mesma forma que na exposição aguda, o processo de remediação conseguiu normalizar a maioria dos biomarcadores avaliados, demonstrando que este agente remediador foi muito eficiente na remoção dos poluentes responsáveis pela elevada toxicidade do efluente de lixiviação de carvão mineral.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

O efluente de lixiviação de carvão apresenta valor de pH extremamente baixo e uma elevada concentração de metais, e remediação com microesferas de quitosana foi capaz de provocar a elevação do pH do efluente para valores próximos à neutralidade, bem como remover significativamente a maioria dos metais presentes no mesmo.

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com os microcrustáceos *A. salina* e *D. magna* revelaram que o efluente de lixiviação de carvão possui elevada toxicidade, causando expressiva mortalidade dos organismos expostos, e, após a remediação com microesferas de quitosana houve uma redução significativa do índice de mortalidade quando comparados aos valores obtidos nas amostras não remediadas, demonstrando a efetividade do tratamento.

Da mesma forma, a toxicidade do efluente de lixiviação de carvão mostrou-se também elevada para os vegetais, causando uma significativa redução no crescimento das raízes de cebolas expostas. A remediação com microesferas de quitosana igualmente reverteu esse efeito tóxico do efluente e promoveu um crescimento superior das raízes em relação aos controles.

Desta forma, é possível concluir que os organismos bioindicadores (*A. salina*, *D. magna* e *Allium cepa*) selecionados para avaliação da toxicidade aguda de efluentes de lixiviação de carvão são bons indicadores da qualidade do ambiente aquático avaliado, uma vez que foram capazes de detectar o grau de toxicidade do efluente em diferentes

concentrações, bem como de diferenciar a toxicidade de um efluente não remediado de um remediado.

Os resultados obtidos mostraram uma situação de estresse oxidativo nas tilápias expostas a 10% do efluente de lixiviação de carvão, durante os 7 e 15 dias de exposição. Essa situação pró-oxidativa foi constatada pelo aumento dos níveis de TBARS, pelo aumento do dano ao DNA e pela depleção dos conteúdos da GSH.

Novamente, a remediação com microesferas de quitosana foi capaz de reverter esta situação de estresse oxidativo, uma vez que manteve dentro dos níveis normais as condições bioquímicas e fisiológicas dos animais expostos ao efluente remediado, não apresentando nenhuma diferença significativa com relação ao grupo controle entre os parâmetros analisados.

Após 30 dias de exposição ao efluente não remediado, o dano tecidual e ao DNA e os níveis de GSH no fígado foram normalizados nos animais expostos ao efluente não remediado. Essas mudanças coincidiram com o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GST, indicando uma possível adaptação dos animais expostos.

Os danos ao DNA no fígado e no sangue total de peixes expostos ao efluente sem tratamento, apresentaram um padrão de resposta diferente. No fígado dos animais expostos, o dano ao DNA foi semelhante ao do grupo controle após 30 dias de exposição. Por outro lado, no sangue a fragmentação do DNA permaneceu superior à do grupo controle para o mesmo período. Além do mais, o índice de dano ao DNA foi maior no sangue do que no fígado dos animais expostos. Essas diferenças poderiam estar relacionadas com uma resposta de reparo

mais eficiente no fígado do que no sangue, ou ainda, ser resultado da maior indução das defesas antioxidantes no fígado ao final da exposição.

A atividade da enzima ALA-D não sofreu alterações significativas em nenhum dos grupos expostos. Possivelmente, a atividade desta enzima no fígado não constitui um biomarcador com boa sensibilidade para ser utilizado no monitoramento desse tipo de efluente.

A determinação dos níveis de TBARS e GSH, o dano ao DNA pelo teste Cometa e a indução das enzimas citoprotetivas (SOD, CAT e GST) mostraram ser ferramentas bastante úteis e sensíveis no diagnóstico de agentes poluidores, bem como no acompanhamento dos processos de remediação e tratamento de efluentes.

Finalmente, diante desses aspectos avaliados, podemos dizer que a quitosana utilizada na forma de microesferas, mostrou-se uma alternativa bastante promissora e eficiente no processo de remediação de efluentes ácidos e ricos em metais, como o efluente de lixiviação de carvão avaliado no presente estudo.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar modificações estruturais na quitosana de forma a permitir aumentos na capacidade de remoção de Mn, uma vez que a concentração desse metal no efluente de carvão permaneceu elevada após a remediação com as microesferas de quitosana.
- Aplicar o teste Cometa em raízes de cebolas expostas aos diferentes tratamentos com o objetivo de avaliar o dano ao DNA também em vegetais expostos aos efluentes, uma vez que este organismo mostrou-se sensível ao teste de toxicidade.
- Estudar o dano ao DNA em outros tecidos como brânquias, baço e rins com o objetivo de estabelecer diferenças nas respostas de dano entre os diferentes órgãos, já que o sangue e o fígado apresentaram particularidades distintas para esse parâmetro.
- Empregar o teste do micronúcleo no sangue dos peixes expostos aos efluentes, objetivando esclarecer o quanto do dano observado pelo teste Cometa é reparado ou se torna dano permanente.
- Avaliar a oxidação das proteínas durante o estresse oxidativo por meio da carbonilação de proteínas, pois assim como os lipídeos de membrana e o DNA, as proteínas são passíveis de oxidação durante uma situação de estresse.
- Avaliar a atividade da ALA-D no sangue dos peixes expostos, uma vez que pode haver uma diferença na expressão desta enzima nos eritrócitos.

- Analisar a indução das metalotioneínas no fígado e sangue dos animais expostos, uma vez que essa enzima pode estar induzida nos animais expostos a um efluente rico em metais, como o de lixiviação de carvão mineral.
- Observar a resposta dos animais expostos ao efluente não remediado frente a uma exposição crônica (60 e 90 dias) com o objetivo de saber quando se dará a ruptura do processo de homeostase do animal e, conseqüentemente, a perda do processo adaptativo frente a uma exposição continuada ao poluente.
- Iniciar estudos de biomonitoramento em bacias hidrográficas que estão expostas à contaminação de efluentes de mineração de carvão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Água – ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* sp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 1993.

ADAMS, S. M., et al. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environment Research**, v.28, p. 459-464, 1989.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ALEXANDRE, N. Z.; KREBS A. S. J. Discussão da aplicação do método do IQI na avaliação da qualidade das águas da região carbonífera de Santa Catarina. **Revista Tecnologia e Ambiente**, v. 2, p. 31-52, 1996.

ALEXANDRE, N. Z.; KREBS, A. S. J. Qualidade das Águas Superficiais do Município de Criciúma, SC. **Relatório Final**. PROGESC–CPRM. Porto Alegre, 1995. (Série Recursos Hídricos, v. 5).

ALMEIDA, J. A. et al. The use of the stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, p. 673-679, 2002.

ALVES, S. R. C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC**. 2003. 52f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ARAMBASIC, M. B.; BJELIC, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals, phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigation and the practical applications. **Water Research**, v. 29, p. 497-503, 1995.

ASTRIN, K.H. et al. (1987) Delta aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. **Annals of New York Academic Science**, v. 514, p. 23-29, 1987.

BAILEY, S. E. et al. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. **Water Research**, v. 33, p. 2469-2479, 1999.

BAINY, A. C. D. et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BAPTISTA, I. E. **Avaliação da toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense**. 2001. 133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of antropine, BW284c51, isso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469-476, 1999.

BARNHOORN, I. E. J.; VUREN, J. H. J. The use of different enzymes in feral freshwater fish as a tool for the assessment of water pollution in South Africa. **Ecotoxicology and Environmental Safety** (*in press*).

BASHA, P. S.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 218-221, 2003.

BEATTIE, K. A. et al. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 219-226, 2003.

BELL, F. G.; BULLOCK, S. E. T. The problem of acid mine drainage, with an illustrative case history. **Environmental an Engineering Geoscience**, v. 2, p. 369-392, 1996.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciência e Cultura**, v. 42, p. 271-277, 1990.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BINOTTO, R. B. Contaminação das águas subterrâneas. In: **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização**. Cadernos de planejamento e gestão ambiental – nº 2 Porto Alegre: FEPAM, 2002, p. 341-368.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BORBA, R. F. SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DA EXTRAÇÃO DE CARVÃO DO ESTADO DE SC. **Balço Mineral Brasileiro 2001 (Carvão Mineral)**. Disponível em:<<http://www.siecesc.com.br>>. Acesso em: 26 maio 2004.

BUHLER, D. R.; WILLIAMS, D. E. The role of biotransformation in toxicity of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 19-28, 1988.

BURDEN, V.M.; SANDHEINRICH, M.B.; CALDEWELL, C.A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, v. 101, p. 285-289, 1998.

BURY, N.; GROSELL, M. Iron acquisition by teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 97-105, 2003.

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO, J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 116-125, 2003.

CANESI, L. et al. Heavy metal and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 46, p. 67-76, 1999.

CÁRDENAS, G., ORLANDO, P., EDELIO, T. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 167-174, 2001.

CLAXTON, L. D., HOUK, V. S., HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 410, p. 237-243, 1998

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 4 ed. Resoluções CONAMA 1984-1991, Brasília, 1992.

COSTA, S. S. **A atividade carbonífera no sul de Santa Catarina e suas conseqüências sociais e ambientais, abordadas através de análises estatísticas multivariadas.** 2000. 180f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COTELLE S.; FÉRARD J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 246-255, 1999.

DEPARTAMENTO NACIONAL DA PRODUÇÃO MINERAL (DNPM). **Perfil analítico do carvão.** Boletim nº 6. Ministério das Minas e Energia. Porto Alegre, 1987. p. 140.

DEVAUX, A. et al. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 257-262, 1998.

DI GIULIO, R. T. et al. A. biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.** RAND, G. M. (ed.) 2ed. Taylor & Francis. 1995. p. 523-560.

EVERAARTS, J. M. Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 101-107, 1993.

FATMA (Fundação de Meio Ambiente). Estabelece os limites máximo de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. Portaria n. 17, de 18 de abril de 2002. Disponível em: <http://www.fatma.sc.org.br/temas/tema3/PORTARIA_17_2002.htm>. Acesso em: 15 de abril de 2004.

FÁVERE, V. T. **Adsorção de ions Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb(II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas.** 1994. 153f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FÁVERE, V. T. et al. Use of chitosan microspheres as remedial material for acidity and iron (III) contents of coal mining wastewaters. **Environmental Technology** (*in press*).

FELSE, P.A.; PANDA, T. Studies on applications of chitin and is derivates. **Bioproceedings and Engineering**, v. 9, p. 505-512, 1990.

GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 42, p. 93-103, 2002.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. 1992. A comparasion of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 543-547, 1992.

GEREMIAS, R. et al. Remediation of coal mining wastewater using chitosan microspheres. **Environmental Technology**, v. 24, p. 1509-1515, 2003.

GIESE, C.; MEBS, D.; WERDING, B. Resistance and vulnerability of crustaceans to cytolytic sea anemone toxins. **Toxicon**, v. 34, p. 955-958, 1996.

GOMES, L. A. **O Cultivo de crustáceos e moluscos**. São Paulo: Nobel, 1986. 226 p.

GÖTHE, C. A V. **Avaliação dos impactos da indústria carbonífera nos recursos hídricos da região sul de Santa Catarina**. 1993. 123f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, v. 44, p. 1737-1747, 2001.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation Purification Technology**, v. 38, p. 43-74, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1989. 543 p.

HAMILTON, M. A. et al. Trimmed Sperman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity biossays. **Environmental Science Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

HASSPIELER, B. M.; BEHAR, J. V.; DI GIULIO, R. T. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bulhead (*Ameriurus nebulosus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 28, p. 82-90, 1994.

HODSON, P.V. The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 3-18, 1988.

HOQUE, M. T. et al. Effect of hydrogen sulphide on liver somatic index and Fulton's conditions factor in *Mystus nemurus*. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 23-30, 1998.

HUGGETT, R. J. et al. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. 1 ed. Chelsea: Lewis Publishers, 1992. 335p.

JUANG, R.S.; SHAO, H.J. A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan. **Water Research**, v. 36, 2999-3008, 2002.

KAISER, L.; SCHWARTZ, K.A. Aluminum-induced anemia. **American Journal of Kidney Disease**, v. 6, p. 348-352, 1985.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KAPPUS H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 60, p. 144-149, 1987.

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

KHANDELWAL, S.; KACHRU, D. N.; TANDON, S. K. Influence of metal chelators on metalloenzymes. **Toxicology Letters**, v. 37, p. 213-219, 1987.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUMAR, P.; DARA, S.S. Utilisation of agricultural wastes for decontaminating industrial/domestic wastewaters from toxic metals. **Agricultural Wastes**, v. 4, p.213-223, 1982.

LENÁRTOVA, V. et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. **Biomarkers**, v. 2, p. 247-252, 1997.

LIMA, P. L. et al. DNA damage and oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluent of swine industry. **XII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International**. Buenos Aires, 2004. p. 143, 2004.

LINDE, A. R. et al. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 60-63, 2001.

LÓPEZ, M. P.; VALINÃS, C. N.; RIOL, M. J. M. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. **Toxicology Letters**, v. 136, p. 97-106, 2002.

MARACINE, M.; SEGNER, H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 83-88, 1998.

MAYO, A. L.; PETERSEN, E. C.; KRAVITS, C. Chemical evolution of coal mine drainage in a non-acid producing environment, Wasatch Plateau, UTA, USA. **Journal of Hydrology**, v. 236, p. 1-16, 2000.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGLIORE, L. et al. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Water Research**, v. 31, p. 1801-1806, 1997.

MILIOLI, G. **Abordagem ecossistêmica para a mineração: uma perspectiva comparativa para Brasil e Canadá**. 1999. 403f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MUZZARELLI, R. A. et al. Removal of trace metals ions from industrial waters nuclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked *N*-carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.11, p. 293-306, 1989.

NAVARRO, A. V. et al. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewater. **Environment International**, v. 25, p. 619-624, 1999.

NORRIS, D. O. et al. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 71-78, 2000.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ONSOYEN, E., SKAUGRUD, O. Metal recovery using chitosan. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 395-404, 1990.

OOST, R. et al. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical response. **Aquatic Toxicology**, v. 36, p. 189-222, 1996.

ORTIZ, L.; TEIXEIRA, E. C. Influência das atividades de processamento do carvão sobre a qualidade dos recursos hídricos superficiais. In: **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização**. Cadernos de planejamento e gestão ambiental – nº 2. Porto Alegre: FEPAM, 2002, p. 301-340.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environment**, v. 309, p. 105-115, 2003.

PELKA, M. et al. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v. 28, p.341-345, 2000.

PEÑA S. et al. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 51-56, 2000.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1598-1606, 2000.

PIRES, M. Emissões oriundas da combustão do carvão. In: **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização**. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Cadernos de planejamento e gestão ambiental – nº 2. Porto Alegre: FEPAM, 2002, p. 253-274.

RABINOWITCH, H. D.; FRIDOVICH, I. Superoxide radicals, superoxide dismutases, and oxygen toxicity in plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, p. 679-690, 1983.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.

RHAZI, M., et. al. Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste. **European Polymer Journal**, v. 38, p. 1523-1530, 2002.

RICARD, A. C. et al. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, p. 377-381, 1998.

RIGOTTI, N. Recuperação de áreas degradadas: estudo de caso. In: **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização**. Cadernos de planejamento e gestão ambiental – nº 2. Porto Alegre:FEPAM, 2002, p. 99-113.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SALOMONS, W. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 52, p. 5-23, 1995.

SANTOS, M. A. **Crescimento e crise na região sul de Santa Catarina**. 1995. 186f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SASSA, S. Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Assay. **Enzyme**, v. 28, p. 133-145, 1982.

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

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 48-53, 1999.

SHIN, H. J. et al. Identification of genes that are induced after cadmium exposure by suppression subtractive hybridization. **Toxicology**, v. 191, p. 121-131, 2003.

SILVA, A. C.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA Jr., G.L. Treatment and detoxification of a sanitary landfill leachate. **Chemosphere**, v. 55, p. 207-214, 2004.

SILVA, J. et al. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research**, v. 470, p. 39-51, 2000.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DA EXTRAÇÃO DE CARVÃO DO ESTADO DE SC. **Carvão mineral: Dados estatísticos ano 2002**. Disponível em: <<http://www.siecesc.com.br/estatisticas/>>. Acesso em: 26 de maio de 2004.

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

SIRAJ, P.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) **Ecotoxicology Environmental safety**, v. 56, p. 218-221, 2003.

SLOOFF, W. et al. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface water in the Netherlands. **Aquatic Toxicology**, v. 4, p. 1-14, 1983.

SLOOT, W. N. et al. Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation in vivo. **Experimental Neurology**, v. 138, p. 236-245, 1996.

SMAKA-KINCL, V. et al. The evaluation of waste and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179, 1996.

SMITH, P. T. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). **Toxicon**, v. 34, p. 857-869, 1996.

SRÁM, R. J. et al. Chromosomal abnormalities in soft coal opencast mining workers. **Mutation Research**, v. 144, p. 271-275, 1985.

StCLAIR, D. K. Tumor suppression by manganese superoxide dismutase: A novel function of MnSOD? A commentary. **Oncology Reports**, v. 3, p. 429-432, 1996.

STEPHENSON, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 435-442, 2002.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

STOLBERG, J. et al. Microsphere of chitosan/poly (vinylalcohol) incorporating tetrasulphonated copper (II) phthalocyanine: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 431-438, 1999.

STREDRICK, D. L. et al. Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. **Neurotoxicology**, v. 25, p.543-553, 2004.

TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z. Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents. **Chemosphere**, v. 54, p. 987-995, 2004.

TRAPP, G. Plasma aluminum is bound transferrin. **Life Science**, v. 33, p. 311-316, 1983.

TSENG, R. L., WU, F. C., JUAN, R. S. Pore structure and metal adsorption ability of chitosans prepared from fishery wastes. **Journal of Environmental Science Health**, v. 34, p. 1815-1828, 1999.

VARMA, A. J., DESHPANDE, S. V., KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2004.

VIEIRA, V. L. P. et al. Effect of aluminium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. **Toxicology Letters**, v. 117, p. 45-52, 2000.

VILLEGAS-NAVARRO, A. et al. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. **Environment International**, v. 25, p. 619-624, 1999.

VILLRROEL, M. J. et al. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 53, p. 857-864, 2003.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996. 321p.

WELDER, F. C. Biological significance of manganese in mammalian systems. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 89-133, 1993.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses- a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1735-1742, 1996.

WILHELM FILHO, D. et al. The effect of pulp mill effluent on two fish species. **Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Curitiba: PR, 1997. p.612 – 619.

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

WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 173-176, 1991.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Heavy metals removal in industry effluents by sequential adsorbent treatment. **Advances in Environmental Research**., v. 7, p. 263-272, 2003.

YANG, T. C.; ZALL, R. R. Adsorption of metals by natural polymers generated from seafood processing wastes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 23, p. 168-172, 1984.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Review**, v. 74, p. 139-162, 1994.

YUAN, C. et al. Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 321-329, 2000.

ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 1999.