



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Laboratório de Defesas Celulares

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM PEIXES E BIVALVES  
COMO FERRAMENTAS DE MONITORAMENTO  
AMBIENTAL: ANÁLISE DE DOIS ECOSSISTEMAS  
CATARINENSES.**

**RAFAEL TREVISAN**

FLORIANÓPOLIS, JUNHO DE 2008.



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Laboratório de Defesas Celulares

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM PEIXES E BIVALVES  
COMO FERRAMENTAS DE MONITORAMENTO  
AMBIENTAL: ANÁLISE DE DOIS ECOSSISTEMAS  
CATARINENSES.**

**RAFAEL TREVISAN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Santa Catarina como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré,  
Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB,  
UFSC.

Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias  
Bainy, Departamento de Bioquímica, CCB,  
UFSC.

FLORIANÓPOLIS, JUNHO DE 2008.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho e que me acompanharam durante o período em que estive cursando Ciências Biológicas.

Ao professor e orientador Alcir Luiz Dafre, expressei minha gratidão pelo incentivo e paciência que demonstrou durante todos os anos desta iniciação científica, pela disposição em me orientar tanto nos trabalhos como na vida acadêmica, pela participação nos divertidos trabalhos de campo em Joinville e Florianópolis, pelas longas horas de trabalho no laboratório que acabavam em pizza, e principalmente, pela amizade durante estes quase quatro anos de convívio.

Agradeço também ao professor e co-orientador Afonso Celso Dias Bainy, que se colocou a disposição em auxiliar neste trabalho, e também à sua equipe de laboratório (principalmente ao Jacó, Karim e Marília) pela atenção e ajuda fornecida.

Ao doutorando Jeferson Luis Franco, agradeço pela orientação durante todo este tempo e principalmente por me incentivar a trabalhar de forma independente no laboratório. Também sou grato aos demais colegas de laboratório, Marcela, Péricles, Luiz, Marina, Ariana e Bettina, pela amizade, paciência e ajuda durante todos estes anos de trabalho.

Também agradeço à minha família, principalmente a meu pai e minha mãe, pela dedicação durante todos esses anos, e pela educação que me forneceram, permitindo que eu escolhesse o rumo de minha vida sem receios. Sou grato pelas reclamações, críticas e sermões, mas também pelas conversas francas, pelo afeto, carinho e pelo amor que nunca me foi negado. À minha mãe, ainda agradeço por esses últimos anos, aos quais se dedicou com muito amor e sacrifício pela nossa família, e ao meu irmão, também agradeço pela companhia e amizade além das inúmeras histórias que passamos juntos.

Não posso esquecer dos colegas de escola e faculdade, que me mostraram uma vida totalmente diferente, repleta de alegria e confusão. Aos grandes companheiros de biologia, Diego, Lobato e Ph, minha eterna gratidão e amizade, por agüentarem os dias em que adorava ficar discutindo e debatendo, pelas inúmeras festas na praia, no Tobar, nas nossas casas, pelas conversas em sala de aula, pelas risadas, churrascos, acampamentos, por todas as confusões em que nos metemos. Guardarei com carinho todas estas recordações, e espero que participar de inúmeras outras. Aos amigos de infância, Xico, André, Sérgio, Tonho, Zarpe e Mitt, agradeço pela amizade que dura até hoje, por todo apoio que me forneceram, pelas jantadas mais estranhas que já fizemos, e pelas histórias que passamos juntos, das quais dou risada até hoje.

Também tenho muito a agradecer à minha namorada Dani, que eu amo tanto e que me trouxe muita alegria nestes 3 anos, com quem pude compartilhar minhas felicidades, e que

por incrível que pareça, consegui fazer com que eu acertasse o rumo na faculdade. Também sou muito grato ajuda neste estudo, trabalhando quase 20 horas seguidas comigo no laboratório, e pela compreensão e auxílio prestado durante a confecção deste TCC. Sou eternamente grato a você.

Agradeço ainda aos apoios e financiamentos que permitiram a realização deste estudo, como IFS, CNPq, Fundação Municipal 25 de Julho, Grupamento de Busca e Salvamento de Florianópolis e UFSC.

## RESUMO

Atividades antrópicas geram uma quantidade significativa de poluentes que são lançados ao meio ambiente, muitas vezes ocasionando distúrbios ecológicos. Estes poluentes causam alterações biológicas em vários níveis: molecular, celular, tecidual, organismo, populações e comunidades. Entre os xenobiontes presentes nos ecossistemas aquáticos, inúmeros compostos químicos e orgânicos possuem um potencial oxidativo, ampliando o dano causado por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, as quantificações destes danos celulares e defesas antioxidantes podem ser usadas como biomarcadores de contaminação aquática. Este estudo foi realizado entre 2005 e 2007 em rios do complexo da Baía da Babilônia, em Joinville-SC, e também em diferentes pontos da Baía de Florianópolis, em 2008, através da exposição de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e ostras (*Crassostrea gigas*), respectivamente. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos foram analisados como um possível protocolo de monitoramento ambiental. Os resultados demonstraram uma forte contaminação em Joinville, com indução das defesas antioxidantes, enzimas de metabolização e de dano celular, além da inibição colinesterásica. Estes dados estão de acordo com as evidências da presença de metais, uso de pesticidas e de alta atividade industrial. Já em Florianópolis, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros estudados, possivelmente devido à falta de um ponto de referência adequado, que esteja livre de contaminação por efluentes domésticos. Concluímos que os parâmetros de estresse oxidativo podem ser importantes ferramentas complementares em trabalhos de monitoramento ambiental, junto a outros biomarcadores já estabelecidos, auxiliando a compreensão dos efeitos da contaminação sobre os organismos aquáticos e fornecendo importantes informações a respeito das modulações das defesas celulares.

Palavras chave: ecotoxicologia, biomarcadores, estresse oxidativo, glutathiona, defesas antioxidantes, citocromo P450, tilápia, ostra do Pacífico.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Desenvolvimento econômico e a questão sócio-ambiental.....	1
1.2 Contaminação aquática, xenobiontes e biomarcadores.....	2
1.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO), dano a biomoléculas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo.....	5
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	5
Lipoperoxidação.....	7
Oxidação de proteínas.....	10
Dano oxidativo ao DNA.....	10
Defesas antioxidantes.....	11
Estresse oxidativo.....	13
1.4 Defesas antioxidantes e monitoramento ambiental.....	14
1.5 Área de estudo.....	15
Joinville.....	15
Florianópolis.....	15
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais, exposição e coleta.....	19
4.2. Preparação das amostras.....	20
4.3 Parâmetros Bioquímicos.....	21
Glutationa redutase (GR).....	21
Glutationa peroxidase (GPx).....	21
Glutationa-S-transferase (GST).....	22
Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	22
γ-glutamil transpeptidase (GGT).....	22
Catalase (Cat).....	23
Acetilcolinesterase (AChE).....	23
Butirilcolinesterase (BuChE).....	23
Determinação dos níveis de glutaciona total (GSH-t) e oxidada (GSSG).....	24
Tióis totais (SH), protéicos (PSH) e não protéicos (NPSH).....	24
Determinação de produtos finais da lipoperoxidação (TBARS).....	25
Determinação dos níveis de peróxidos totais (PCA-FOX).....	25
Quantificação de proteínas.....	25
Glicemia, Hemoglobina (Hb) e Lactato sanguíneo.....	25
Imunoblotting das isoformas CYP1A, CYP2B e CYP3A.....	26
4.4 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Joinville.....	28
Joinville 2005.....	28
Joinville 2007.....	33
5.2 Florianópolis.....	38
6. DISCUSSÃO.....	41
6.1 Joinville.....	41
6.2 Florianópolis.....	47
7. CONCLUSÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico .....	4
Figura 2: Biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes .....	5
Figura 3: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobiontes .....	7
Figura 4: Processo de lipoperoxidação .....	8
Figura 5: O mecanismo de formação de produtos de guanina a partir de reações de oxidação com radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), elétrons livre ( $e^-$ ) e oxigênio <i>singlet</i> ( $^1\text{O}_2$ ) ...	11
Figura 6: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo .....	14
Figura 7: Área de estudo de Joinville .....	19
Figura 8: Área de estudo de Florianópolis .....	20
Figura 9: Estado tiol/dissulfeto no fígado de tilápias em 2005. ....	29
Figura 10: Níveis de tióis e hemoglobina no sangue de tilápias em 2005. ....	29
Figura 11: Atividade de enzimas antioxidantes no fígado de tilápias em 2005 .....	30
Figura 12: Atividade colinesterásica no fígado de tilápias em 2005. ....	31
Figura 13: Níveis de TBARS no fígado de tilápias em 2005. ....	31
Figura 14: Imunodeteção das isoformas de citocromos P450 nos microsomas hepáticos das tilápias em 2005 .....	32
Figura 15: Estado tiol/dissulfeto no fígado de tilápias em 2007 .....	34
Figura 16: Parâmetros sanguíneos de tilápias em 2007 .....	35
Figura 17: Enzimas antioxidantes no fígado de tilápias em 2007 .....	36
Figura 18: Atividade colinesterásica hepática e sanguínea de tilápias em 2007 .....	37
Figura 19: Níveis de TBARS no fígado de tilápias em 2007 .....	38
Figura 20: Níveis de tióis na brânquia de ostras.....	38
Figura 21: Enzimas antioxidantes na brânquia de ostras.....	39
Figura 22: Níveis de peróxidos totais e atividade colinesterásica em ostras.....	40
Tabela 1: Matriz de correlação entre parâmetros analisados no fígado de tilápias em 2005.....	33

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Desenvolvimento econômico e a questão sócio-ambiental.

A partir das décadas de 60 e 70, o intenso debate social e ambiental iniciado pelos países desenvolvidos do hemisfério norte, e posteriormente difundido a nível mundial, levantou grandes questionamentos a respeito do desenvolvimento condicionado pelo sistema econômico do pós-guerra da década de 40 e da noção de progresso e crescimento ilimitado. Esta ideologia de desenvolvimento postulava como ideal o modelo norte-americano, e o bem estar e conforto só seriam atingidos pelos países em desenvolvimento através de um grande e custoso crescimento econômico, o qual levou a um crescente endividamento e marginalização cultural, e conseqüentemente, à consolidação de uma política de hegemonia e dominância dos países do hemisfério norte. Porém, ficou claro o fracasso deste sistema na esfera social, onde não ocorreu a redução da pobreza, e também na esfera ambiental, onde o desenvolvimento e uso dos recursos naturais levaram à degradação e escassez dos mesmos, como observado na crise do petróleo na década de 70 (SCOTTO, CARVALHO & GUIMARÃES, 2007).

Segundo Scotto, Carvalho e Guimarães (2007), o desenvolvimento passa a estar intimamente relacionado a riscos de degradação ambiental, o que levou à criação de órgãos ambientais nacionais. Entre o início das décadas de 70 e 80, passaram-se de 10 para cerca de 1.000 os países que contavam com este tipo de organização. Além das agências oficiais, órgãos não-governamentais tiveram amplo crescimento, de aproximadamente 2.500 organizações em 1972 para aproximadamente 15.000 em 1981. Associada a esta tendência, houve intensa discussão através das conferências mundiais a respeito do meio ambiente no chamado “Ciclo Social da ONU” que ocorreu entre as décadas de 70 e 90. Isto resultou num intenso debate até os dias de hoje sobre a necessidade da conciliação entre crescimento econômico, superação da pobreza e preservação do meio ambiente, passando então, a utilizar a expressão desenvolvimento sustentável para designar este modelo (SCOTTO, CARVALHO & GUIMARÃES, 2007).

Dentro deste debate, merece destaque a Conferência de Dublin em 1992, cujo tema principal era a água. Neste encontro, colocou-se em questão a atividade humana como mais um fator atuante sobre os ecossistemas aquáticos (MEYBECK, 2003). Isso porque estes ecossistemas tornam-se cada vez mais delicados e pressionados por inúmeros fatores, como alterações climáticas, crescimento populacional, demanda por água e a própria poluição. Mesmo os lençóis freáticos, cobrindo vastas extensões ao longo do globo, demonstram sinais de contaminação pela sua elevada exploração entre 1950 e 1990, salinização, urbanização e intensificação da agricultura e da indústria (FOSTER & CHILTON, 2003). Desta forma,

grande parte do ambiente costeiro mundial sofre algum tipo de impacto devido à ação humana, afetando direta ou indiretamente a atividade pesqueira, saúde humana e biota local, tornando-se assim, uma questão fundamental a manutenção destes ecossistemas.

No Brasil, inúmeros estudos têm demonstrado a presença de contaminantes no sedimento ou na coluna d'água de inúmeras regiões brasileiras, como por exemplo na Amazônia, onde algumas regiões com descarga direta de óleo e esgoto doméstico na água têm demonstrado menor riqueza e abundância de invertebrados (COUCEIRO *et al.*, 2006), e a contaminação do meio aquático e da biota por mercúrio, aliada ao intenso consumo de peixes pela população ribeirinha e ao precário atendimento médico, podem estar ocasionando sérios riscos às populações amazônicas. Já na região sudeste, a intensa atividade humana pode estar causando sérios danos aos ecossistemas costeiros, como observado pela elevada carga de poluentes derivados da indústria do petróleo em Angra dos Reis (RJ) (AZEVEDO, GONÇALVES & SILVA, 2007), ou da queima de combustíveis na Baía de Guanabara (DA SILVA, AZEVEDO & NETO, 2007). Em Santa Catarina, com seu extenso litoral e presença de atividades portuárias, agrícolas, industriais e de mineração, uma maior atenção deveria ser dada a este tema.

O processo de conservação destes ambientes é extremamente difícil, devido à complexa relação entre poluição, degradação do habitat, espécies invasoras, modificações de fluxo de corrente e super-exploração (DUDGEON *et al.*, 2006). A barreira existente entre a compreensão dos ecossistemas costeiros e as decisões político-sociais a respeito do uso, desenvolvimento e proteção destes recursos também dificulta suas conservações (YANEZ-ARANCIBIA & DAY, 2004). Desta forma, ainda é necessário o desenvolvimento de inúmeras ferramentas, tanto políticas como científicas, que facilitem a implementação de novos programas de conservação ambiental.

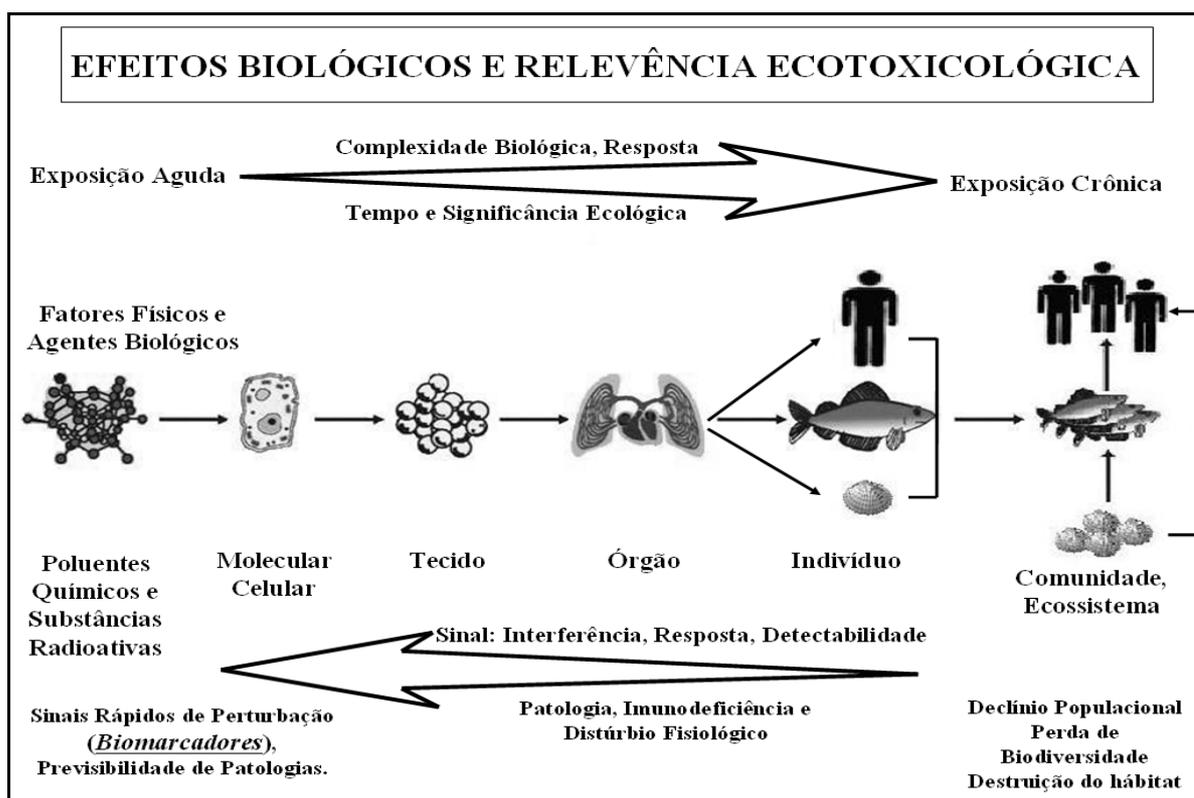
## **1.2 Contaminação aquática, xenobiontes e biomarcadores.**

O Brasil possui grandes reservas de água doce, que, além de estarem distribuídas de forma inconstante ao longo de seu território, sofrem intensa degradação através de contaminação gerada por grandes centros urbanos e pólos industriais, principalmente nas regiões sul e sudeste do país. Grande parte destes contaminantes (xenobiontes) acaba sendo levada para as regiões costeiras, tornando a conservação da água um processo difícil, porém de extrema importância. Uma vez que o ambiente aquático possui uma complexa rede de relações e interações entre animais, plantas e microrganismos, ele detém um papel

fundamental na manutenção de vários ecossistemas e também em inúmeras atividades econômicas brasileiras.

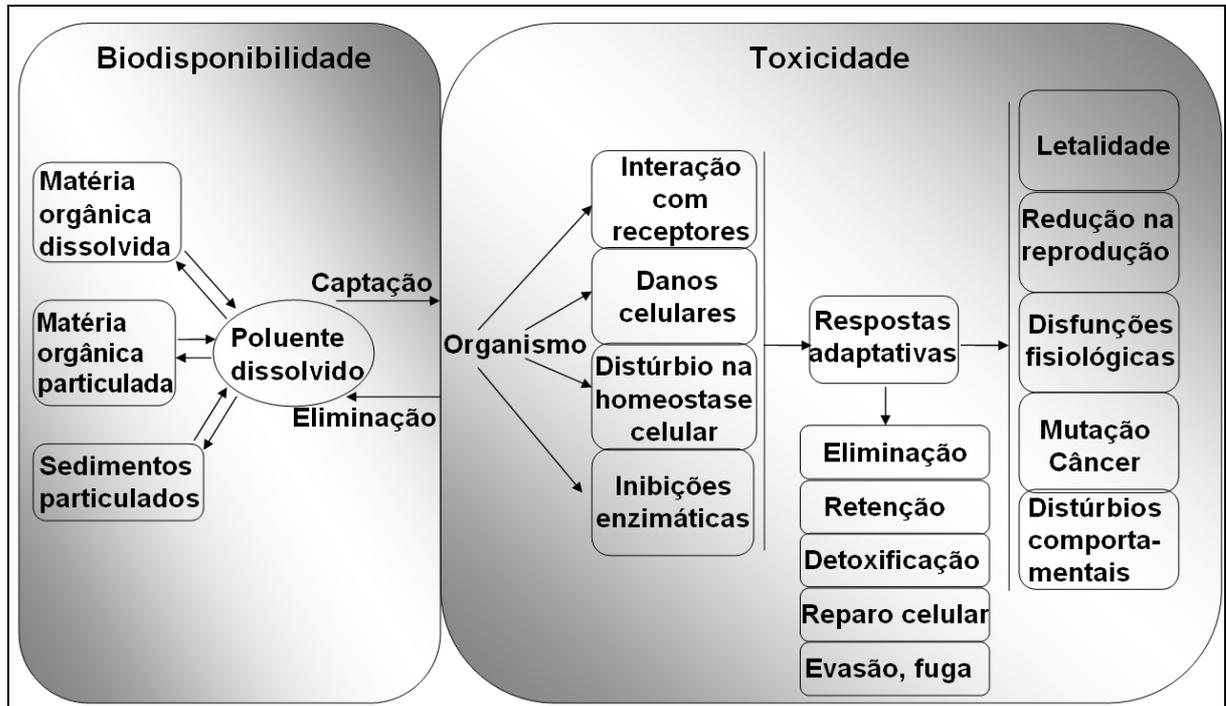
Avaliar o nível de risco de inúmeros poluentes e seus derivados ao meio ambiente através de estudos macroecológicos (populações, comunidades) é demasiadamente complexo, uma vez que os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição, além de sofrerem interferência de inúmeros fatores externos e serem de difícil detecção. Além disso, as observações identificadas são distúrbios ecológicos como perda de biodiversidade, destruição do hábitat, declínio populacional, que acabam sendo conseqüências irreversíveis da contaminação (MOORE *et al.*, 2004), como observado na Figura 1. Logo, elucidar os mecanismos iniciais (a níveis moleculares e/ou celulares) de resposta rápida na presença de contaminantes pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente, a tempo de evitar danos maiores a níveis macroecológicos. Neste contexto, chama-se de biomarcador qualquer substância, ou seu derivado, estrutura ou processo, que possa ser medido no organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença (WHO, 2001), e está intimamente associado com a ecotoxicologia, um domínio da ciência cujo objetivo é entender e prever efeitos de xenobiontes em comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002). Estes biomarcadores refletem a interação entre o sistema biológico e um ou mais contaminantes.

Esta interação entre o sistema biológico, biomarcadores e poluentes está intimamente associada à biodisponibilidade dos contaminantes (Fig. 2). Isto porque ele pode estar associado à matéria orgânica dissolvida, particulada e ao sedimento. Assim, sua concentração disponível é muito variável, e afetará o organismo através da relação entre sua taxa de captação e eliminação. Os efeitos diretos destes xenobiontes ocorrem através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática, danos a macromoléculas, entre outros (Fig. 2). O organismo então é capaz de responder, inicialmente a nível molecular e celular, a fim de evitar ou diminuir o efeito tóxico destes contaminantes através de respostas adaptativas. Caso estas respostas não sejam suficientes, poderá ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, mutação, câncer, distúrbios comportamentais ou a morte. Entretanto, a total adaptação pode ser alcançada caso as respostas desenvolvidas pelos organismos sejam eficientes para contrabalancear os distúrbios (Fig. 2) (FENT, 2004).



**Figura 1: Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico.** Ao se estudar níveis de organização de elevada complexidade biológica, a detectabilidade e a resposta são prejudicadas devido à grande interferência por fatores externos, enquanto que agentes biológicos mais simples possuem uma rápida resposta à perturbação (biomarcadores), com menor interferência e com capacidade de previsibilidade, o que é fundamental para estudos ecotoxicológicos (Adaptado de MOORE *et al.*, 2004).

Atualmente, dois grupos de animais são utilizados predominantemente como modelos em estudos de contaminação aquática: peixes e bivalves. Isso porque ambos contam com mecanismos acentuados de bioconcentração e biomagnificação (HEDOUIN *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007; WEISBROD *et al.*, 2007). Peixes estão presentes em praticamente qualquer corpo d'água, possuem uma vasta variedade de nichos ecológicos entre as espécies; já os bivalves possuem hábito sésil e de filtração, além de ampla distribuição. Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão: enzimas e produtos de biotransformação; parâmetros de estresse oxidativo; proteínas de estresse, metalotioneínas e proteínas que conferem resistência múltipla a drogas; parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, neuromusculares, fisiológicos, morfológicos e de genotoxicidade (VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003).



**Figura 2: Biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes.** A biodisponibilidade dos poluentes está relacionada tanto à sua associação com outras partículas presentes no meio aquático como à taxa de captação e eliminação do mesmo pelo organismo. Já a sua toxicidade é o resultado entre os efeitos diretos, a níveis celulares e moleculares, e a capacidade adaptativa do organismo frente a este poluente (Adaptado de FENT, 2004).

Efluentes podem possuir uma vasta variedade de poluentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), bifenis policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (e.g. DDT, Dieldrin) e organofosforados (e.g. Malathion), metais pesados e outros produtos químicos/orgânicos (MARTINEZ-ALVAREZ, MORALES & SANZ, 2005), a maioria com potencial oxidante, tornando as células suscetíveis a danos por espécies reativas de oxigênio (ERO) (WINSTON & DI GIULIO, 1991). Logo, a quantificação de danos oxidativos e os níveis de defesas contra danos celulares, têm o potencial de serem usados como biomarcadores de contaminação aquática (AHMAD, PACHECO & SANTOS, 2006; FUNES *et al.*, 2006).

### 1.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO), danos a biomoléculas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo.

#### *Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)*

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas

fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

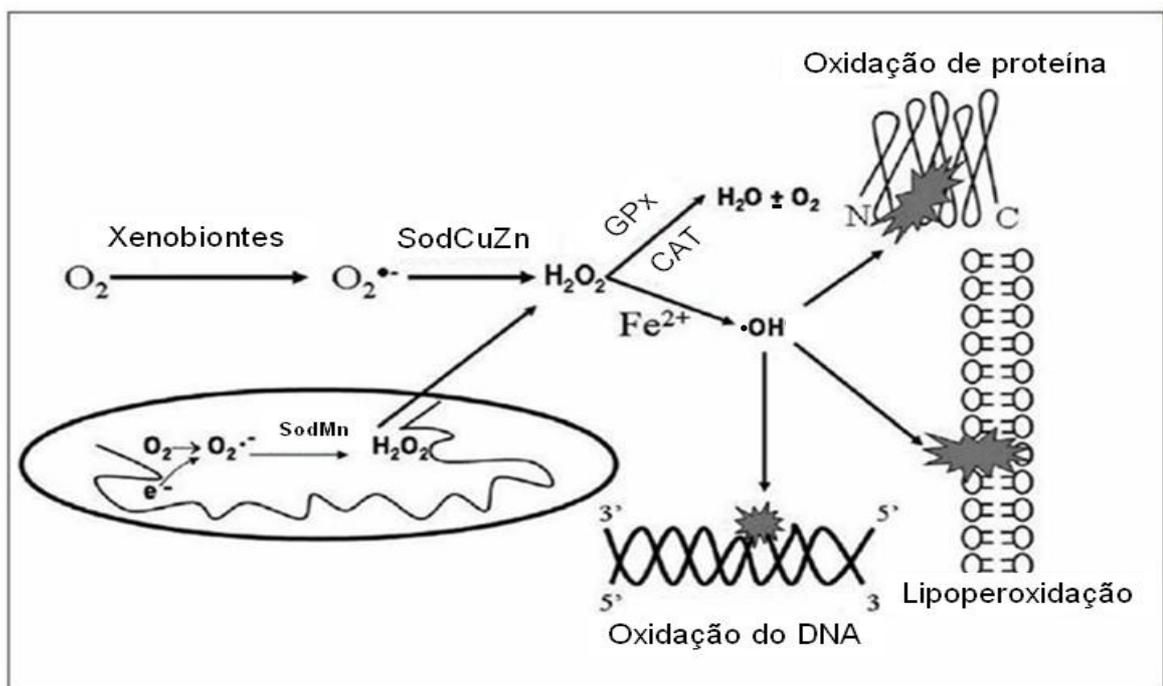
Algumas dessas ERO são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares (como o peróxido de hidrogênio). O próprio termo “reativo” acaba criando certa confusão, uma vez que há bastante diferença entre as constantes de reatividade do peróxido de hidrogênio ( $k = 2.26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (CARBALLAL *et al.*, 2003) e do radical hidroxil com a albumina ( $k = >10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), por exemplo. Além disto, algumas destas moléculas reagem rapidamente apenas com algumas substâncias, como é o caso do peróxido de hidrogênio, enquanto outras, como radical hidroxil, reagem rapidamente com inúmeras moléculas. Estas características geram diferentes níveis de efeitos biológicos, dependendo da sua taxa e local de formação, ambiente, compartimento celular, etc. Para uma melhor explicação do termo radical livre, ele acaba sendo designado para qualquer espécie capaz de existência independente (por isso o termo livre), que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), além de incluir outras espécies radicalares que não somente as ERO, como por exemplo, aquelas centradas em carbono e nitrogênio.

Para lidar com este paradoxo, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas ERO geradas pelo metabolismo aeróbio, organizada em diferentes níveis. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Estas estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO, a neutralização destas espécies reativas e a reparação de danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). É interessante observar que, mesmo a nível fisiológico, não há uma total prevenção na formação/atuação das ERO. Alguns trabalhos têm demonstrado que, mesmo em pequenas concentrações, estas moléculas não só não causam grandes danos, como podem adquirir importantes funções celulares. Por exemplo, a sinalização celular, ao longo da história evolutiva dos seres vivos, utiliza processos oxidativos como sinalizadores, além de outros mecanismos. Alguns exemplos são: controle da ventilação

respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE, 2002).

Por outro lado, o ataque de ERO a biomoléculas pode causar disfunções celulares (YU, 1994). Alterações relacionadas ao ataque de ERO podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, gerando o chamado estresse oxidativo. Este pode ocorrer devido à ação de xenobiontes, através da alteração na regulação redox celular, pelo metabolismo de citocromos P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (REGOLI *et al.*, 2002).

Os tipos de dano oxidativo causado pelas ERO a biomoléculas pode ser dividido em 3 categorias principais, conforme visualizado na Figura 3, e descritos a seguir.

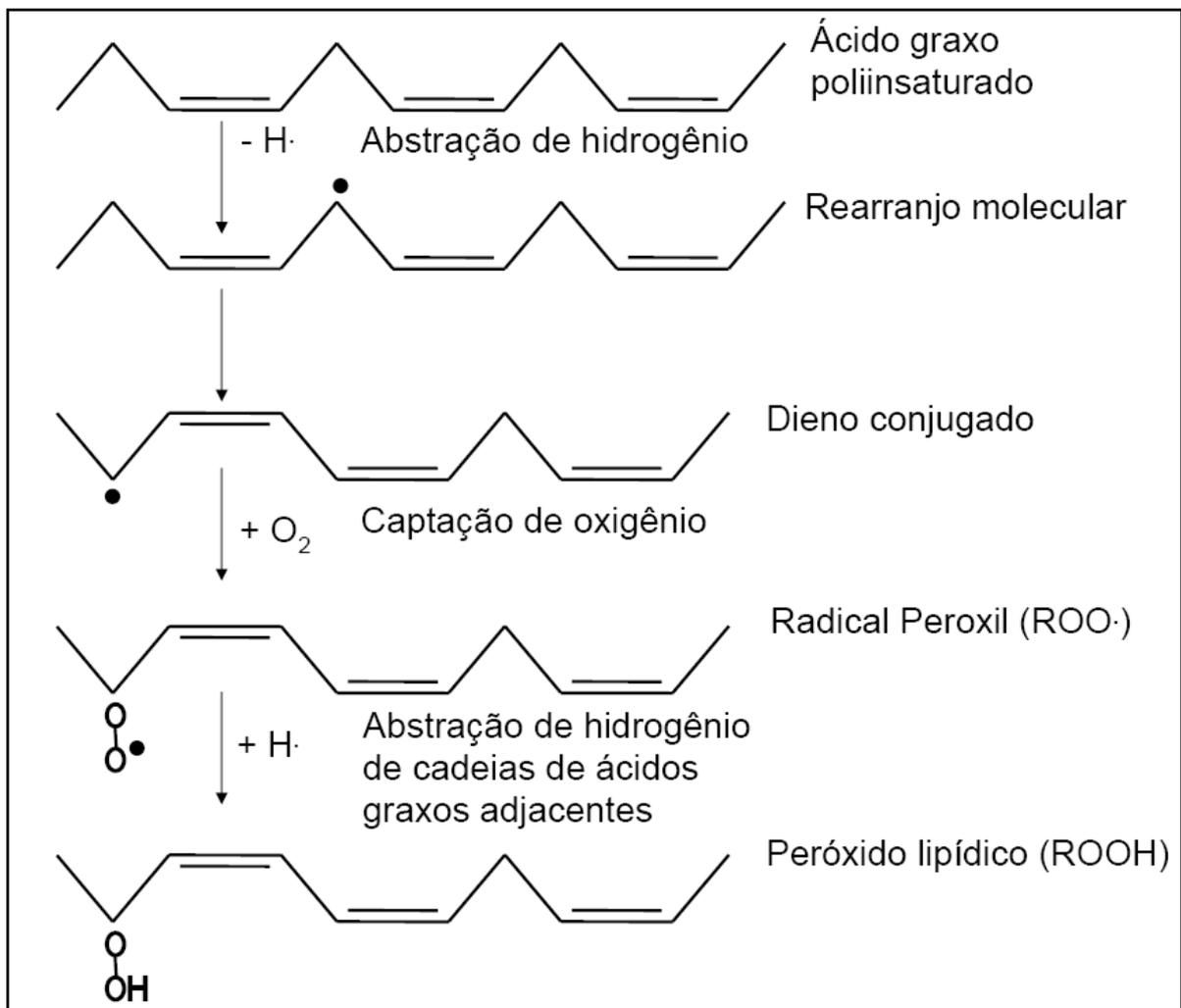


**Figura 3: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobiontes.** Xenobiontes podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA caso as defesas antioxidantes celulares não sejam capazes de neutralizar seus efeitos.  $O_2^{\cdot-}$  - Ânion superóxido;  $H_2O_2$  - Peróxido de Hidrogênio;  $\cdot OH$  - Radical hidroxil; SodMn - Superóxido Dismutase-Manganês; SodCuZn - Superóxido Dismutase-Cobre/Zinco; GPx - Glutathiona Peroxidase; Cat - Catalase (Adaptado de RAMAKRISHNAN, RAJESH & SULOCHANA, 2007).

### Lipoperoxidação

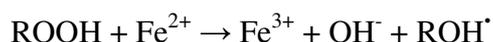
O ataque a cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (com dois ou mais carbonos de sua cadeia com ligação dupla) pode ocorrer através de processos de peroxidação, que é uma

reação em cadeia envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo  $\text{ROO}\cdot$ . Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Fig. 4) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



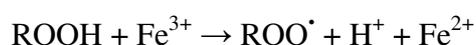
**Figura 4: Processo de lipoperoxidação** (Adaptado de MOSIALOU, 1993). A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico.

Ao mesmo tempo, quando o  $\text{ROO}^\bullet$  abstrai o átomo de hidrogênio das cadeias adjacentes, forma-se um peróxido lipídico ( $\text{ROOH}$ ) (Fig. 4). Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos, pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação  $\text{O-O}$ , formando um radical alcoxil ( $\text{ROH}^\bullet$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Estes radicais alcoxilas também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metilenos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia.

Outro grande problema destas reações é a formação de  $\text{Fe}^{3+}$ , o qual também pode reagir com peróxidos lipídicos formando radicais peroxilas e  $\text{Fe}^{2+}$ , em um ciclo autosustentável (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros.

Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxyononal (4-HNE). Acredita-se que níveis elevados de 4-HNE (acima de  $1\mu\text{M}$ ) atuem em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais, inibindo a ação de chaperonas e algumas isoformas de citocromos P450 (CYP2E1 e CYP1A1), síntese de DNA e de proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, o 4-HNE também é um potente indutor de defesas antioxidantes. Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina). Ele ainda pode reagir com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Outra importante característica do MDA é sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto com cor que pode ser detectada em 532 nm (DRAPER & HADLEY, 1990), base para método de detecção de produtos finais de lipoperoxidação.

### *Oxidação de proteínas*

O dano a proteínas pode ocorrer pelo ataque direto de ERO à sua estrutura, ou através de moléculas originadas de processos de oxidação, como o MDA e 4-HNE.

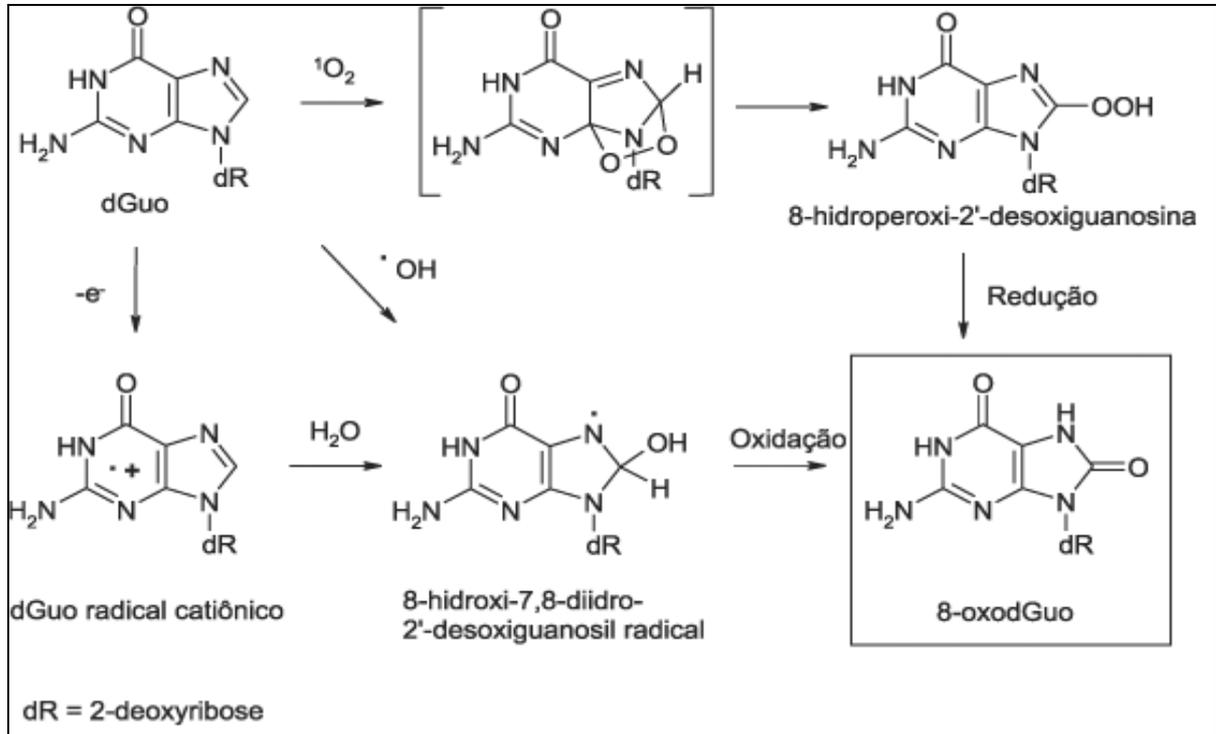
Como a estrutura primária de uma proteína pode ser muito variável, esta pode sofrer inúmeros tipos de processos oxidativos, gerando diferentes produtos finais. Além disso, as próprias ligações peptídicas podem ser atacadas, como por exemplo, na abstração de hidrogênio pelo radical hidroxil. No geral, este radical exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os SH. Uma vez que as proteínas podem facilmente combinar-se a íons metálicos, e caso sejam posteriormente expostas a peróxido de hidrogênio, pode ocorrer a reação de Fenton, e conseqüentemente, a formação de radical hidroxil. Inicialmente, o ataque de  $\cdot\text{OH}$  pode gerar outros radicais capazes de combinar com o  $\text{O}_2$ , gerando radicais alcóxilas e peróxilas, os quais podem fazer a abstração de  $\text{H}^\cdot$  e formar peróxidos nas cadeias laterais ou na cadeia central das proteínas. Os radicais alcóxil podem ainda realizar fragmentações de proteínas, formando grupos carbonilas. Assim como os peróxidos lipídicos, os peróxidos aminoacídicos são estáveis à temperatura fisiológica, mas na presença de calor ou de íons metálicos podem formar novos radicais orgânicos, gerando reações cíclicas. Eles também podem atacar grupos tiólicos de outras proteínas, assim como os peróxidos lipídicos, e sua degradação é extremamente difícil por não serem substratos para as enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase ou a peroxiredoxina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

### *Dano oxidativo ao DNA*

Os radicais livres estão envolvidos com processos de envelhecimento, desenvolvimento de câncer, mutações e morte celular, através de alterações químicas, tanto nas bases nitrogenadas, na ribose do DNA e na quebra de suas ligações.

A ERO com maior capacidade de causar danos ao DNA é o radical hidroxil. Ele tem a capacidade de adicionar ligações duplas nas bases heterocíclicas de DNA, assim como, de abstrair hidrogênio da base nitrogenada timina e de cada um dos carbonos da desoxirribose. Além disso, reações de adição podem formar adutos de radical  $\cdot\text{OH}$  que, na presença de oxigênio, pode vir a formar radicais peróxil. O processo de formação de adutos pode ser utilizado como marcador de dano oxidativo ao DNA. O produto 8-oxo-7,8-diidro-2'-

deoxiguanosina (comumente chamado de 8-oxodGuo) pode ser detectado através da técnica de cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica (HPLC-ECD) (Fig. 5) (DIZDAROGLU *et al.*, 2002).



**Figura 5:** O mecanismo de formação de produtos de guanina a partir de reações de oxidação com radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), elétrons livre ( $e^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (BERRA, MENCK E DI MASCIO, 2006).

A abstração de átomos de hidrogênio feita por este radical leva à formação de radicais de carbono, que na presença de oxigênio são rapidamente convertidos a radicais peróxido de açúcares. A partir de processos de rearranjo molecular, fragmentação e liberação de água podem-se gerar mais de 20 tipos de produtos (DIZDAROGLU *et al.*, 2002).

Algumas proteínas nucleares podem ser atacadas pelo radical hidroxil, e posteriormente realizar ligações cruzadas com o DNA, ocasionando falhas no reparo celular, replicação, transcrição e descondensamento da cromatina (DIZDAROGLU *et al.*, 2002).

### *Defesas antioxidantes*

Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathiona (GSH), todos sendo captadores de radicais. A GSH é composta por gamma-glutamil-cisteinil-glicina, atuando contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos. Essa capacidade antioxidante

se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína e a GSH (REISCHL *et al.*, 2007).

As defesas antioxidantes enzimáticas também são fundamentais. Entre as principais estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical  $O_2^-$  dismutando-o a  $H_2O_2$  e protegendo em até 97% os alvos do ataque do ânion superóxido. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo). Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a Cat e a GPx. A Cat tem como função dismutar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , e está localizada em maior abundância em peroxissomos, já a GPx está relacionada à função antioxidante da GSH com atividade peroxidásica contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Processos oxidativos celulares e a atividade GPx geram o dissulfeto da glutatona ou glutatona oxidada (GSSG). Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos (SIES & MOSS, 1978; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutatona redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da glutatona também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante (SLEKAR, KOSMAN & CULOTTA, 1996).

A gamma-glutamil transpeptidase (GGT) é uma glicoproteína ligada à membrana celular, responsável pela transferência de grupos glutamyl da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos. Sua ação possibilita a captação de cisteína, elemento limitante para a síntese de GSH (MEISTER, 1973). A GGT também é responsável pela degradação da glutatona, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese protéica (TATEISHI *et al.*, 1977).

Xenobiontes, em geral, ativam as duas das primeiras etapas de defesa do organismo, as enzimas de biotransformação de fase I e II. As enzimas de fase I, conhecidas como monooxigenases (um grupo de enzimas composto pelas várias isoformas do citocromo P450, citocromo  $b_5$  e NADPH citocromo P450 redutase), são responsáveis pela metabolização de

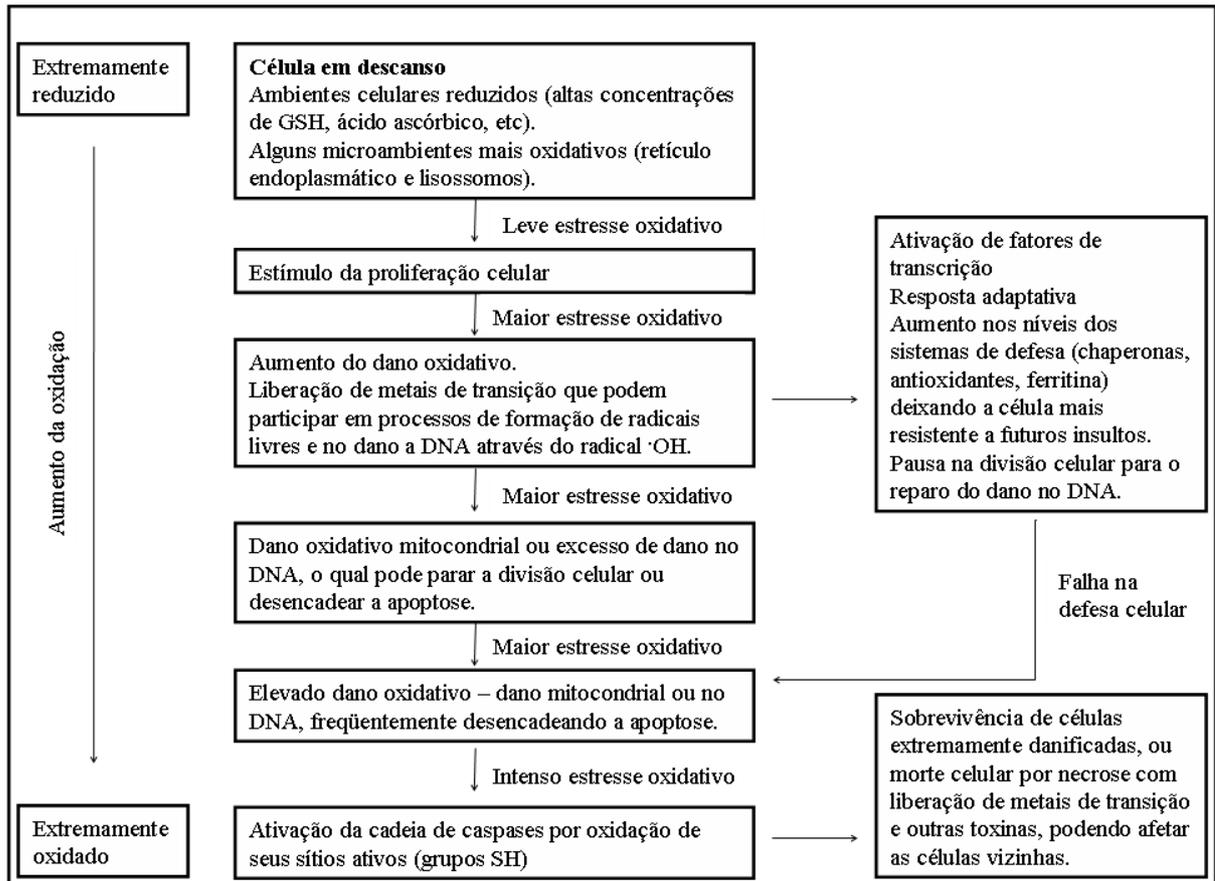
compostos endógenos e xenobióticos, tornando-os hidrofílicos. Isto facilita sua eliminação da célula através de sistemas de transporte tipo ABC ou pela conjugação através de enzimas de fase II, tais como a glutationa-S-transferase (GST) (STEGEMAN & LECH, 1991). A GST é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a GSH, reduzindo sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico. A GST e o citocromo P450, por serem enzimas sensíveis a compostos exógenos, têm sido largamente utilizados como biomarcadores (STEGEMAN *et al.*, 1990; BUCHELI & FENT, 1995).

### *Estresse oxidativo*

Assim, a partir de um balanço entre as defesas antioxidantes e os efeitos tóxicos das ERO a biomoléculas, os seres vivos conseguem manter o metabolismo e o funcionamento celular inalterados. Porém, em situações específicas, este panorama pode ser comprometido através do excesso de produção de ERO, falha das defesas antioxidantes ou ambos, gerando estresse oxidativo.

As conseqüências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade (Fig. 6). Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), os principais efeitos são:

1. **Proliferação celular:** algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular.
2. **Adaptação:** aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutationa, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida (a célula estará mais resistente frente a futuros insultos oxidativos mais intensos). Além disto, os alvos de dano oxidativo podem ser redirecionados, ou ainda, a produção basal de ERO pode ser reduzida.
3. **Dano celular:** pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo.
4. **Senescência:** sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido.
5. **Morte celular:** após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.



**Figura 6: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo** (Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

#### 1.4 Defesas antioxidantes e monitoramento ambiental

As defesas antioxidantes podem ser induzidas, como também podem ser esgotadas frente a substâncias pró-oxidantes, dependendo do tempo e intensidade da exposição. Ao mesmo tempo, a alteração nestas defesas também está relacionada às diferentes classes de xenobiontes, diferenças de sensibilidade entre as espécies e a fatores ambientais e biológicos (WINSTON & DIGIULIO, 1991). Assim, a dificuldade em entender os processos oxidativos e antioxidantes celulares acaba sendo vista por muitos como um problema na sua utilização como biomarcadores (REGOLI *et al.*, 2002), recorrendo então a parâmetros clássicos como enzimas de biotransformação de fase I e II, colinesterases, metalotioneínas e marcadores de genotoxicidade. Porém, a fim de uma melhor compreensão do potencial tóxico de um ambiente e seus efeitos sobre a biota local, é necessária uma visão ampla que envolva conhecimentos relacionados à genética, proteômica, metabolismo celular e de níveis de organização biológica mais elevados, a fim de tornar este tipo de estudo com biomarcadores uma ferramenta fundamental para o manejo e conservação do meio ambiente (MOORE *et al.*,

2004). Assim, o desenvolvimento de novos protocolos ecotoxicológicos com amplos marcadores de estresse oxidativo é essencial para a melhor compreensão de sua regulação e funcionamento, a fim de que, posteriormente, possam ser incorporados em projetos de monitoramento ambiental junto com outros biomarcadores previamente já estabelecidos.

## **1.5 Área de estudo**

### *Joinville*

Joinville está localizada no litoral norte de Santa Catarina, a 180 km de Florianópolis, sendo a cidade mais populosa (436.585 habitantes) e principal pólo industrial do estado (FATMA, 2003). Baseado em dados do IBGE e da Prefeitura Municipal de Joinville, a FATMA (2003) reporta que entre 1950 e 2000, houve uma intensa urbanização, onde a população urbana passou de 49 % para 97 %. A agropecuária baseia-se na fruticultura, produção de grãos (principalmente arroz) e rebanho bovino. A utilização de herbicidas, inseticidas, fungicidas, adubos químicos e óleo mineral é comum. O setor industrial é muito bem representado pelo ramo metalúrgico, mecânico e têxtil, além do ramo plástico, químico, madeireiro, mineração e alimentício, compreendendo 50 % da população economicamente ativa (FATMA, 2003).

### *Florianópolis*

Florianópolis localiza-se no litoral centro-leste de Santa Catarina, com aproximadamente 97 % de seu território localizado na Ilha de Santa Catarina possuindo 370.000 habitantes (Prefeitura Municipal de Florianópolis, 2007). Destes, 97,04 % residem em áreas urbanas com uma economia baseada no comércio e serviços (86,44 %) com destaque para o turismo durante o verão (Prefeitura Municipal de Florianópolis, 2007). Por situar-se numa ilha com intensa urbanização, Florianópolis sofre grandes problemas ambientais, principalmente relacionados com saneamento básico, o que gera grandes riscos ambientais às suas praias e ecossistemas marinhos. Segundo o *site* da Prefeitura Municipal de Florianópolis, em 2001 apenas 32 % dos domicílios estavam ligados ao sistema de coleta de esgoto da CASAN e apenas 40 % do esgoto sofria tratamento adequado, o que acaba levando à poluição das praias e outros ecossistemas. Conforme o relatório de balneabilidade do litoral catarinense disponível no *site* da FATMA, até 35,5 % dos pontos analisados nas praias da ilha foram considerados impróprios para banho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Investigar se parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo são bons marcadores de contaminação aquática e avaliar a possibilidade de aplicação destes protocolos como parte de programas oficiais de biomonitoramento ambiental de órgãos governamentais

Investigar a qualidade ambiental de dois ecossistemas catarinenses através de parâmetros de estresse oxidativo e de outros parâmetros biológicos.

### 2.2. Objetivos específicos

1) Investigar a utilização de parâmetros de estresse oxidativo em duas espécies diferentes (um invertebrado e um vertebrado), sendo uma de água doce e outra de água salgada. Para isso, o trabalho será dividido em duas etapas, descritas a seguir:

- a) A primeira etapa foi realizada entre 2005-2007. Tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram expostas por 7 dias a efluentes do Rio Cubatão e do Rio do Braço em Joinville.
- b) A segunda etapa, ostras do pacífico (*Crassostrea gigas*) foram expostas por 30 dias em diferentes pontos da Baía de Florianópolis.

2) Dosar parâmetros bioquímicos compostos de biomarcadores clássicos e potenciais, tais como: glutathione (total e oxidada) níveis de tióis protéicos e não-protéicos, atividade de enzimas relacionadas: ao metabolismo da glutathione (glutathione redutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, glicose-6-fosfato desidrogenase); à defesa contra peróxidos (catalase e glutathione peroxidase); sensíveis a organofosforados (acetil e butirilcolinesterase) e ao metabolismo de biotransformação de fase II (glutathione-S-transferase), além da expressão de enzimas de biotransformação de fase I (imunodeteção do CYP1A, CYP2B, CYP3A), quantificação de peróxidos totais e marcadores de dano a membranas celulares.

### 3. JUSTIFICATIVA

Os problemas na qualidade ambiental na cidade de Joinville estão vinculados a inúmeros fatores sócio-econômicos. A poluição dos recursos hídricos tem origem em efluentes industriais e resíduos sólidos, uso de agrotóxicos nas lavouras de arroz, drenagem insuficiente de água pluvial e ineficiência na coleta e tratamento de esgoto. Estes são alguns de seus principais problemas. Eles afetam diretamente ou indiretamente o complexo estuário da Baía da Babitonga, uma área com importantes ecossistemas de manguezais, resquícios de Mata Atlântica, e uma importante fauna marinha. Nesta região já foi demonstrado sinais de poluição (CARMONA *et al.*, 1985) e a importância de sua conservação (SILVA & SHEIBE, 1995). O Rio Cubatão é um dos principais rios que abastecem este estuário e recebem ao longo do seu trajeto, além de uma elevada carga de poluentes do seu afluente Rio do Braço, efluentes industriais, agropecuários e urbanos. Em seus estudos, a FATMA (2003) reporta através da análise da demanda bioquímica de oxigênio (exprime o valor da poluição produzida por matéria orgânica oxidável biologicamente), que o Rio Cubatão está dentro dos limites legais, enquanto que a demanda química de oxigênio (exprime o valor da oxidação de compostos orgânicos, biodegradáveis ou não), e os níveis de coliformes fecais mostram que o rio é poluído a partir da confluência com o Rio do Braço. Aparentemente, a poluição do Rio Cubatão ocorre de forma diferente ao longo de seu curso: inicialmente pode ser impactado por esgoto doméstico, dejetos agroquímicos e de animais, e posteriormente, por efluentes industriais através do Rio do Braço. Desta forma, estudos de caracterização sobre a quantidade e efeitos da poluição neste complexo hídrico são de extrema importância, sendo que rios como Rio Cubatão, Rio do Braço e Rio Cachoeira também devem ser analisados. Em um estudo anterior realizado por Alves (2003), a utilização de biomarcadores de contaminação aquática sugeriu que estes recursos hídricos estão sofrendo impacto, e por isso, novos estudos mais detalhados devem ser aplicados nesta área para alcançar conclusões mais definitivas.

Já com relação à Florianópolis, a maior parte da poluição gerada é originada dos esgotos domésticos, devido à ineficiência na coleta e tratamento do esgoto, agravado pelo aumento populacional durante o verão devido aos turistas. Segundo dados disponíveis no *site* da Casan (2007), apenas 49% da população urbana do município de Florianópolis está sendo atendida pelo sistema de esgotamento sanitário da Casan ou de outros sistemas coletivos. A principal estação de tratamento dos esgotos (ETE) do Sistema de Esgotamento Sanitário Insular está localizada no aterro da Baía Sul, próximo à Ponte Pedro Ivo Campos, área de estudo deste trabalho, e atendeu aproximadamente 108 mil habitantes em dezembro de 2007,

com a capacidade de remover em até 90% os coliformes presentes no esgoto antes do efluente tratado ser disposto nas águas da baía.

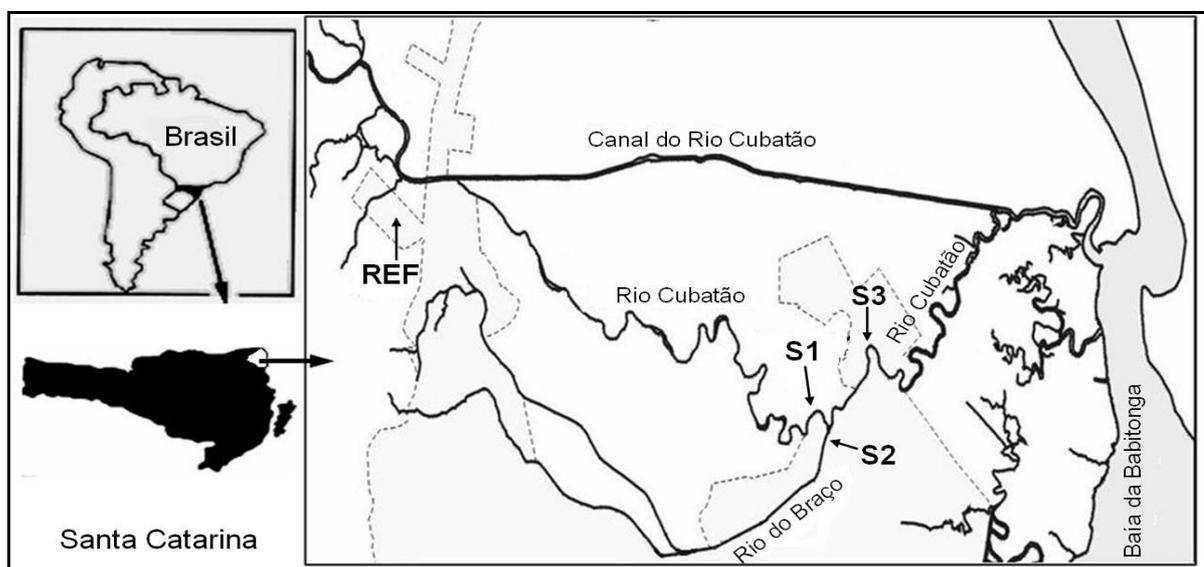
Em Florianópolis, os manguezais são importantes ecossistemas estuarinos que podem estar sofrendo forte impacto urbano. Alguns trabalhos já demonstraram estes sinais da atividade humana no manguezal do Itacorubi (MATER *et al.*, 2004) devido à elevada concentração de fósforo inorgânico e coprostanol (esteróide encontrado nas fezes humanas) no sedimento, e também através de estudos com biomarcadores de contaminação aquática (TORRES *et al.*, 2002). Inicialmente, a área de estudo em Florianópolis seria na região próxima ao Mangue do Rio Tavares, próximo à Reserva Extrativista do Pirajubaé. Devido à intensa urbanização do sul da ilha, este importante manguezal encontra-se numa região de possível impacto antrópico, uma vez que recebe as águas do Rio Tavares, o qual recebe elevadas cargas de esgoto doméstico ao longo do seu curso, além de saídas de esgoto na região da próxima à Costeira do Pirajubaé. Porém, devido aos regimes de maré, não encontramos profundidade suficiente para a colocação das gaiolas de cultivo com ostras. Assim, decidimos analisar outra região fortemente impactada de Florianópolis, a Baía Norte. A intensa urbanização da região pode ser uma ameaça ao ecossistema marinho de entorno. Alguns estudos já demonstraram altos níveis de coliformes fecais e totais na região próxima à Ponte Hercílio Luz e na saída do Rio Biguaçu (CERUTTI & BARBOSA 1996; CASAN, 2008), tornando-se fundamental analisar mais atentamente o nível de contaminação aquática deste ecossistema, a fim de facilitar a sua conservação.

Porém, apesar do grande avanço científico nas últimas décadas na área da ecotoxicologia, ainda não há protocolos eficazes e totalmente confiáveis para estes trabalhos de biomonitoramento, uma vez que grande parte dos trabalhos nesta área utiliza marcadores clássicos de contaminação. Apesar de sensíveis a contaminantes, esses marcadores sozinhos não são capazes de elucidar todos os principais processos de toxicidades dos poluentes, por isso o desenvolvimento de novos protocolos e de novos biomarcadores de contaminação se torna fundamental. Estes servirão como possíveis ferramentas auxiliares no processo de conservação do meio ambiente e um avanço em rumo ao desenvolvimento sustentável.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais, exposição e coleta.

Para a primeira etapa, junto à região de Joinville, tilápias (*O. niloticus*) machos adultos (200±20mg) foram fornecidas pela Fundação Municipal 25 de Julho, uma estação de piscicultura. Foram escolhidos dois pontos no Rio Cubatão e um ponto no Rio do Braço (Fig. 7), e os animais foram mantidos em grupos de dez em gaiolas de 1x1x1 metro (comprimento, largura, altura). Um quarto ponto foi utilizado como referência, onde os animais foram mantidos também em gaiola de 1 m<sup>3</sup> em um açude de piscicultura da Fundação Municipal 25 de Julho.

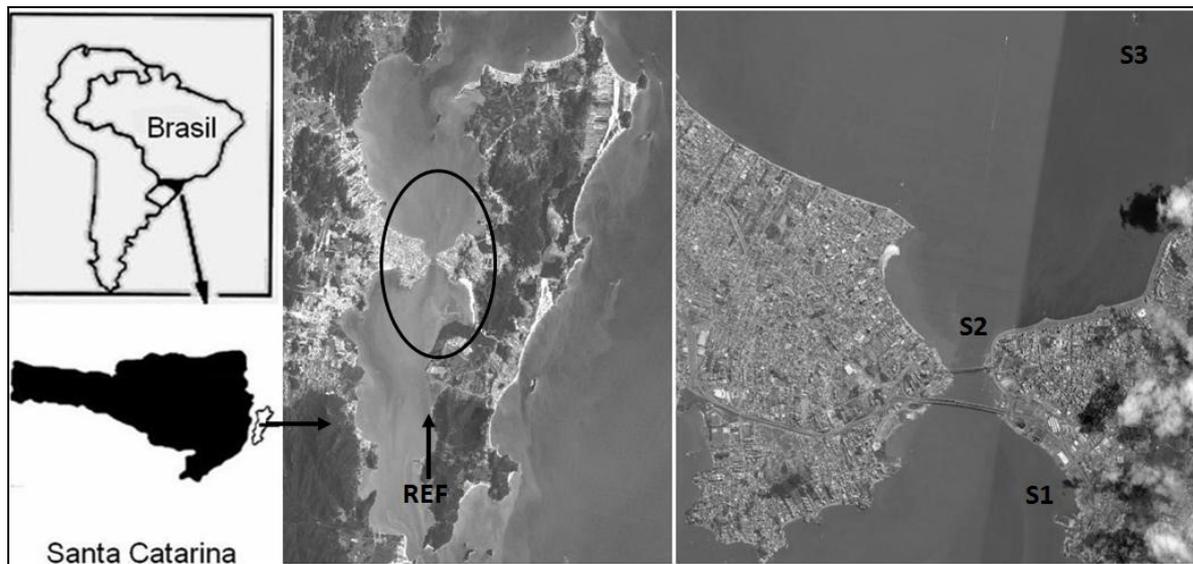


**Figura 7:** Área de estudo de Joinville. REF Fundação 25 de Julho; S1, S2 e S3 pontos de exposição no Rio Cubatão e do Braço.

Após 7 dias de exposição, os animais foram coletados/extraídos e então transportados para a Fundação Municipal 25 de Julho. O sangue, fígado, cérebro, e a bile foram coletados. A preparação das amostras para análise de glutatona e conteúdo de hemoglobina foi realizada imediatamente após a coleta, enquanto que para os demais parâmetros, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. Foram realizados quatro experimentos de campo: o primeiro durante os dias 12 a 19/04/05, o segundo de 13 a 20/04/06, o terceiro de 25/11 a 02/12/06 e o quarto de 06 a 13/03/07.

Para a segunda etapa, ostras *C. gigas* adultas e de ambos os sexos foram fornecidas por uma estação de cultivo no Ribeirão da Ilha (REF) foram mantidas em lanternas de cultivo durante 30 dias em três pontos da Baía Norte de Florianópolis: S1, Iate Clube Veleiros da Ilha; S2, Ponte Hercílio Luz; S3, Ilha do Guará (Fig. 8). A preparação das amostras para análise de glutatona foi realizada imediatamente após a coleta, enquanto que o tecido

(brânquia) para as demais análises foi congelado e estocado à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O experimento de campo foi realizado no verão, entre janeiro e fevereiro de 2008.



**Figura 8: Área de estudo de Florianópolis.** No painel central, em destaque o ponto referência no Ribeirão da Ilha (REF) e a área de exposição (elipse). À direita, ampliação da área de exposição mostrando os pontos de estudo: Iate Clube Veleiros da Ilha (S1), Ponte Hercílio Luz (S2) e Ilha do Guará (S3).

#### 4.2. Preparação das amostras

Para ambas as etapas, a preparação das amostras foi a mesma. O tecido (fígado para tilápia, brânquia para ostra) foi homogeneizado em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4, centrifugado a 20.000 g por 30 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi então utilizado para a determinação das atividades enzimáticas, produtos finais da lipoperoxidação e níveis de peróxidos totais, enquanto o *pellet* foi utilizado para a determinação da lipoperoxidação, atividade gamma-glutamil transpeptidase. No caso do sangue das tilápias, ele foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos e o plasma foi utilizado para análise.

Para a determinação dos níveis de glutathiona total, tióis protéicos e não-protéicos, aproximadamente 100 mg de tecido (fígado para tilápia, brânquia para ostra) foi homogeneizado em 0,9 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M, centrifugado a 15.000 g por 2 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ), e o extrato ácido foi utilizado para as determinações. No caso da glutathiona oxidada, aproximadamente 200 mg de tecido foi homogeneizado em 0,8 ml N-etilmaleimida (NEM) 6,25 mM, centrifugado a 15.000 g por 2 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ), neutralizado para pH 6-7 com KOH-MOPS e adicionado 5 ml de diclorometano para a remoção de NEM, a qual pode interferir no ensaio enzimático. A quantificação de GSSG foi realizada a partir da fase aquosa.

Para a quantificação dos CYP1A, CYP2B e CYP3A, o fígado foi homogeneizado em 1:4 vol/vol de tampão Tris 50 mM, 0,15 M KCl, pH 7,4. Para obtenção dos microssomas

hepáticos, o homogenato foi centrifugado a 9.000 g por 10 minutos (4°C), e o sobrenadante foi centrifugado novamente por 40.000 g por 70 minutos (4°C) para obtenção do *pellet* microsomal.

### 4.3 Parâmetros Bioquímicos

Para ambas as etapas, a metodologia empregada para as análises bioquímicas foi a mesma, como descrito a seguir. Os ensaios enzimáticos foram realizados em volume final de 500  $\mu$ l, com exceção da atividade catalase, cujo volume final foi de 1 ml. Utilizou-se ainda de 5-100  $\mu$ l de amostra, dependendo do parâmetro a ser analisado.

#### *Glutathione reductase (GR)*

Ao utilizar o substrato GSSG a enzima consome NADPH, que é acompanhado em 340nm ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CARLBERG & MANNERVIK, 1985). Desta velocidade é descontada a reação basal de consumo de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (GSSG). O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM GSSG.

#### *Glutathione peroxidase (GPx)*

É acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima, ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de t-butil (t-BOOH) ou de cumeno, gera glutathione oxidada (GSSG), que por sua vez, é reduzida pela glutathione reductase, adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Este consumo de NADPH é acompanhado espectrofotometricamente em 340nm, similar à determinação de GR (WENDEL, 1981). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/ml de GR purificada de levedura. É necessário 5-10 minutos de incubação com os reagentes (exceto substrato iniciador) para a ativação da enzima. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM de CUOOH.

### *Glutathione-S-transferase (GST)*

A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm ( $\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG & JAKOBY, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CDNB. A absorvância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

### *Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)*

Na presença de glicose-6-fosfato, o NADPH é formado a partir de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) e, dessa forma, o aumento da absorvância é medido em 340nm ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (GLOCK & MC, 1953). É descontada da reação a atividade basal obtida pela formação de NADPH pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato. O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão TRIS/HCL 50 mM. pH 7,4 contendo 0,127 mM  $\text{NADP}^+$  e 3 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ). Como substrato iniciador utiliza-se 1,5 mM de glicose-6-fosfato (G6P). A absorvância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência de G6P.

### *$\gamma$ glutamyl transpeptidase (GGT)*

Para os estudos em Joinville em 2005, a atividade GGT foi realizada após incubação da amostra por 60 minutos a 25 °C, em um meio contendo tampão Tris-HCl 60 mM, pH8,0, 1 mM de gamma-glutamyl-p-nitroanilida e 20 mM glicilglicina. A taxa de liberação de p-nitroanilida foi medida espectrofotometricamente a 410 nm ( $\epsilon = 8.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (MEISTER, TATE & GRIFFITH, 1981).

Para os estudos em Joinville em 2007 e em Florianópolis, devido à falta do substrato p-nitroanilida, a análise de sua atividade foi realizada através de um kit comercial da marca Biotécnica®, conforme recomendações do fabricante, onde os valores são apresentados como U/L no Sistema Internacional.

### *Catalase (Cat)*

A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa “afinidade”, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo da  $\text{H}_2\text{O}_2$  no primeiro minuto da reação, 240nm ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (AEBI, 1984). É descontado ainda o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 40 segundos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador utiliza-se 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

### *Acetilcolinesterase (AChE)*

A atividade acetilcolinesterase foi medida pelo método de Ellman (1961). A hidrólise de acetiltiocolina leva à formação de acetato e tiocolina, sendo que o grupo tiol desta reage com DTNB liberando o ânion colorido ácido tionitrobenzóico (TNB). A formação de TNB é medida espectrofotometricamente em 412 nm ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (ELLMAN *et al.*, 1961), sendo descontada a formação de TNB, a partir da reação com outros grupos tióis na ausência do substrato. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, pH 8,0, contendo 0,5 mM DTNB. Como substrato iniciador utiliza-se acetiltiocolina 0,36 mM. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência do substrato.

### *Butirilcolinesterase (BuChE)*

A atividade da butirilcolinesterase foi medida pelo método de Ellman (1961). A hidrólise da butirilcolina leva à formação de ácido butírico e tiocolina, sendo que o grupo tiol desta reage com DTNB liberando o ânion colorido TNB. A formação de TNB é medida espectrofotometricamente em 412 nm ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (ELLMAN *et al.*, 1961). É descontado ainda o aparecimento de TNB por reações com outros grupos tióis na ausência do substrato. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, pH 8,0, contendo 0,5 mM DTNB. Como substrato iniciador utiliza-se butiriltiocolina 0,36 mM. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência do substrato.

### *Determinação dos níveis de glutatona total (GSH-t) e oxidada (GSSG)*

Para determinar a glutatona total (GSH-t) foi empregado o método enzimático de Tietze, modificado por Akerboom e Sies (1981). Para a determinação de glutatona oxidada (GSSG) é necessário evitar a oxidação de GSH durante o processamento das amostras, o que pode levar a uma produção artefactual de GSSG. Para esta finalidade foi empregado NEM para bloquear a GSH, evitando, assim, sua oxidação e interferências nos valores de GSSG.

O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo 0,2 mM de NADPH e 0,1 mM de DTNB. Como iniciador da reação utiliza-se GR 0,25 U/ml. A absorbância basal é descontada a partir da leitura do consumo basal de NADPH do ensaio na ausência de amostra. As quantificações dos níveis de GSH-t e GSSG foram baseadas a partir de uma curva padrão com GSSG realizada no momento da leitura.

### *Tióis totais (SH), protéicos (PSH) e não protéicos (NPSH)*

Para os tióis totais do plasma, o meio de reação continha TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1 % e DTNB 0,2 mM, ao qual foi adicionado o plasma. A absorbância de uma amostra referência, sem a adição de DTNB, foi descontada do valor de obtido, a fim de subtrair a absorbância causada por substâncias interferentes, tais como o grupo heme no plasma. Para NPSH do fígado e brânquia o mesmo procedimento foi utilizado, entretanto, como amostras utilizaram-se os extratos ácidos destes tecidos, e o SDS foi omitido do meio de reação.

No caso de PSH, antes da leitura espectrofotométrica, o extrato ácido foi centrifugado (15.000 g, 5 min, 4 °C) para obtenção do *pellet*, o qual é lavado 2-3 vezes (PCA 0,5 M) e diluído em 1 ml de TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1%. Uma alíquota da amostra foi adicionada ao meio de reação contendo 500 µl de TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1% e DTNB 0,2 mM. A absorbância de uma amostra referência, sem a adição de DTNB, foi descontado do valor obtido, a fim de subtrair a interferência da turbidez causada pelo material particulado.

Tanto para NPSH, PSH e SH do plasma, o desenvolvimento de cor ser dá pela reação dos grupos tióis com DTNB, e conseqüentemente liberação de TNB, a qual pode ser medida fotometricamente em 412 nm ( $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (ELLMAN, 1959). Um segundo branco na presença de DTNB foi realizado para descontar sua absorbância basal.

### *Determinação de produtos finais da lipoperoxidação (TBARS)*

A lipoperoxidação foi estimada pelo método de TBARS (DRAPER & HADLEY, 1990) com algumas modificações. Uma alíquota (100 µl) da amostra foi adicionada a 1 ml de solução contendo 400 µl de tampão ácido acético 1,3M/HCl, 0,27 M, pH 3,4, 400 µl TBA 0,8% e 200 µl de SDS 8,1%. A mistura foi incubada a 95 °C por 60 minutos. A reação de MDA com o TBA produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532nm.

### *Determinação dos níveis de peróxidos totais (PCA-FOX)*

A quantificação dos níveis de peróxidos totais do sobrenadante do homogenato de brânquias de *C. gigas* foi realizada a partir do método de PCA-FOX (GAY & GEBICKI, 2002). A presença de peróxidos leva à redução do íon  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , o qual reage com o sal *xylenol orange*, gerando uma cor característica (laranja/marrom), a qual pode ser medida fotometricamente em 560 nm. O ensaio é realizado em ácido perclórico (PCA) 110 mM, contendo *xylenol orange* 0,25 mM e sulfato ferroso amoniacal 0,25 mM. A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão de peróxido de cumeno.

### *Quantificação de proteínas*

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método Bradford (1976) usando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade enzimática foi normatizada pela quantidade de proteína total.

### *Glicemia, Hemoglobina (Hb) e Lactato sanguíneo*

Para a derterminação da glicemia, foi utilizado um kit comercial da marca Biotécnica® (CAT BT – 10.008.00), e as medidas realizadas conforme recomendações do fabricante.

Para a determinação de lactato sangüíneo, foi utilizado um kit comercial da marca Kovalent® (MS/ANVISA 80115310042), e as medidas realizadas conforme recomendações do fabricante.

Para a determinação de Hb, utilizou-se a absorvância em 540 nm da forma cianometHb ( $\epsilon = 44.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Adicionou-se 20  $\mu\text{l}$  de sangue em 5 ml de solução Drabkin, acrescida de 1ml/L do detergente Triton X-100, como hemolisante (TENTORI & SALVATI, 1981).

#### *Imunoblotting das isoformas CYP1A, CYP2B e CYP3A.*

Para as análises de imunoconteúdo foram utilizados os seguintes anticorpos: a) anticorpo monoclonal 1-12-3 de camundongo contra P450E de sargo-da-América-do-Norte para CYP1A1 (10  $\mu\text{g/ml}$  solução bloqueadora) (PARK *et al.*, 1986); b) o anticorpo policlonal de coelho contra P450B de sargo-da-América-do-Norte para CYP2B (10 $\mu\text{g/ml}$  solução bloqueadora) (KLOTZ *et al.*, 1986); c) o anticorpo policlonal de coelho contra P450 de truta para CYP3A (25 $\mu\text{g/ml}$  solução bloqueadora) (CELANDER, RONIS & FÖRLIN, 1989).

Para CYP1A foram feitas análises de imunoblots com as preparações microsossomais preparadas de acordo com Kloepper-Sams e colaboradores (1987). As proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE 12 % (gel de corrida) e 5 % (gel de entrada), eletroforéticamente transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com leite em pó desnatado 5% (p/v), dissolvido em Tris 25 mM, NaCl 0,63 M pH 7,5. Para a imunodeteção de CYP2B e CYP3A utilizou-se a técnica de “dot-blot”.

Após a transferência para as membranas de PVDF, e posterior lavagem, os anticorpos secundários utilizados foram tanto de cabra contra IgG de coelho conjugada a peroxidase como de cabra contra IgG de camundongo conjugada a peroxidase. Após 20 minutos de incubação, as bandas das proteínas foram reveladas pelo método de quimioluminescência utilizando-se o kit ECL-Amersham-Pharmacia. A membrana foi exposta a um filme autoradiográfico Kodak X-OMAT, XAR-5 film, e imediatamente revelados de acordo com métodos convencionais. A intensidade das bandas foi quantificada após digitalização da imagem utilizando-se o software Scion Image. Os resultados estão expressos em densidade integrada por micrograma de proteína microsossomal.

#### **4.4 Análise estatística**

Através do programa estatístico STATISTICA 6.0, as análises dos dados de Joinville em 2005 e de Florianópolis em 2008 foram efetuadas através do teste ANOVA de uma via e post-hoc de Duncan quando necessário. Já para as análises dos resultados de Joinville 2007, foi utilizado o teste T de Student. As diferenças entre as médias são consideradas

significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados são apresentados como média + desvio padrão (N= 5-10). Para as análises de correlação, foi utilizado a análise de Pearson. A atividade das enzimas foi expresso como mU, sendo que uma Unidade foi considerada como a quantidade da proteína que é capaz de consumir 1  $\mu\text{mol}$  de substrato/ml/min de reação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Joinville (tilápias, 7 dias de exposição)

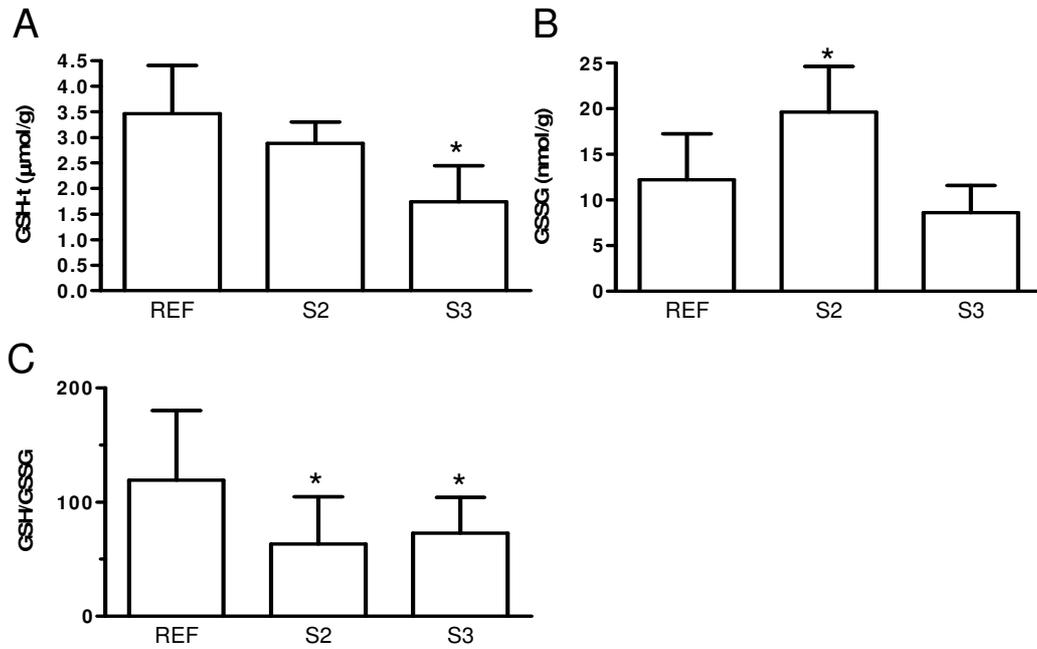
Foram realizados 4 estudos em Joinville entre os anos de 2005 e 2007, sendo que somente o primeiro e o último foram bem sucedidos. No segundo e terceiro experimentos houve elevados índices de precipitação pluviométrica e mudanças abruptas de temperatura, podendo ser fatores importantes para os altos índices de mortalidade que foram observados em alguns pontos de estudo. Também houve casos de desaparecimento de gaiolas e tentativas de furto de peixes. Nestes casos, os experimentos foram inviabilizados. Devido a estas ocorrências, somente serão apresentados os resultados do primeiro e último experimentos.

#### *Joinville 2005*

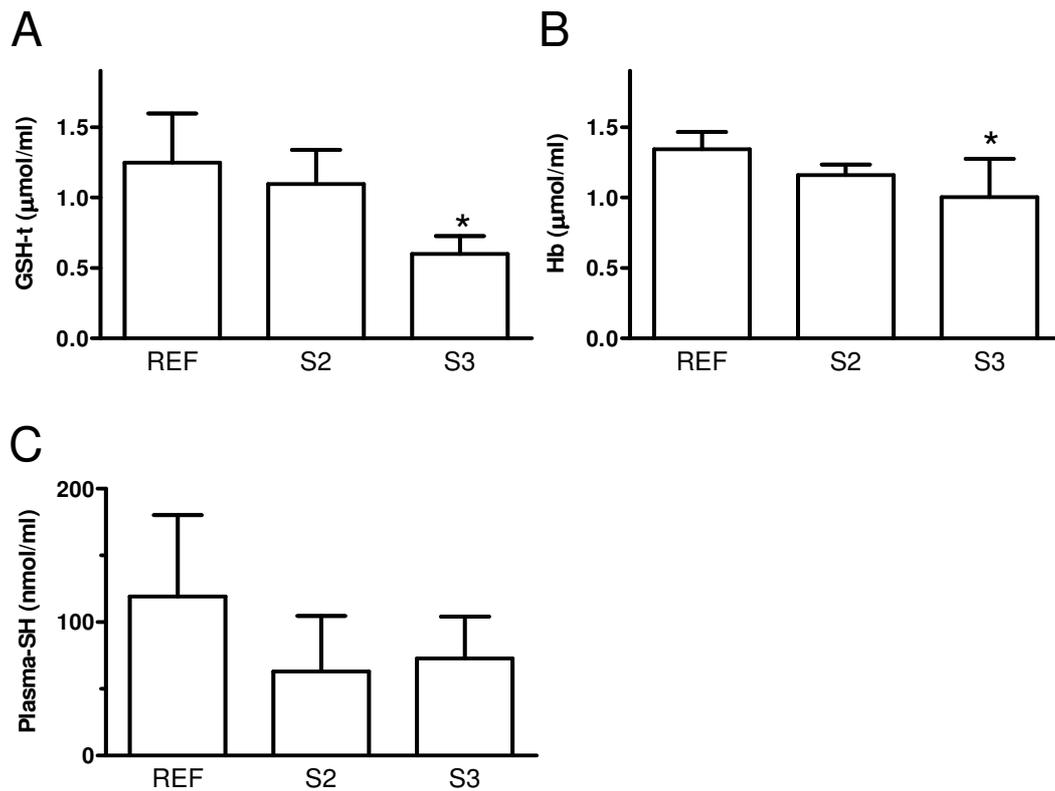
Na primeira etapa realizada em Joinville, entre 12/04/05 e 19/04/05, foram analisados dois pontos do Complexo Hídrico da Bacia da Babitonga sobre forte influência de atividades industriais: S2 e S3 (Fig. 7). O ponto S2 localiza-se no Rio do Braço, enquanto o ponto S3 encontra-se no Rio Cubatão. A temperatura dos pontos de estudo variou entre 24-26 °C e o pH entre 7 e 8.

Com relação aos parâmetros tiol/dissulfeto hepáticos, observou-se uma diminuição nos níveis de GSH-t no ponto S3 (Fig. 9A), um aumento de GSSG no ponto S2 (Fig. 9B) e uma diminuição na relação GSH/GSSG em ambos os pontos (Fig. 9C), quando comparados ao grupo referência.

Quando analisados os parâmetros sanguíneos, observou-se novamente uma diminuição nos níveis de GSH-t no ponto S3 (Fig. 10A), além da diminuição nos níveis de Hb (Fig. 10C). Os tióis totais do plasma permaneceram inalterados em ambos os grupos (Fig. 10B).

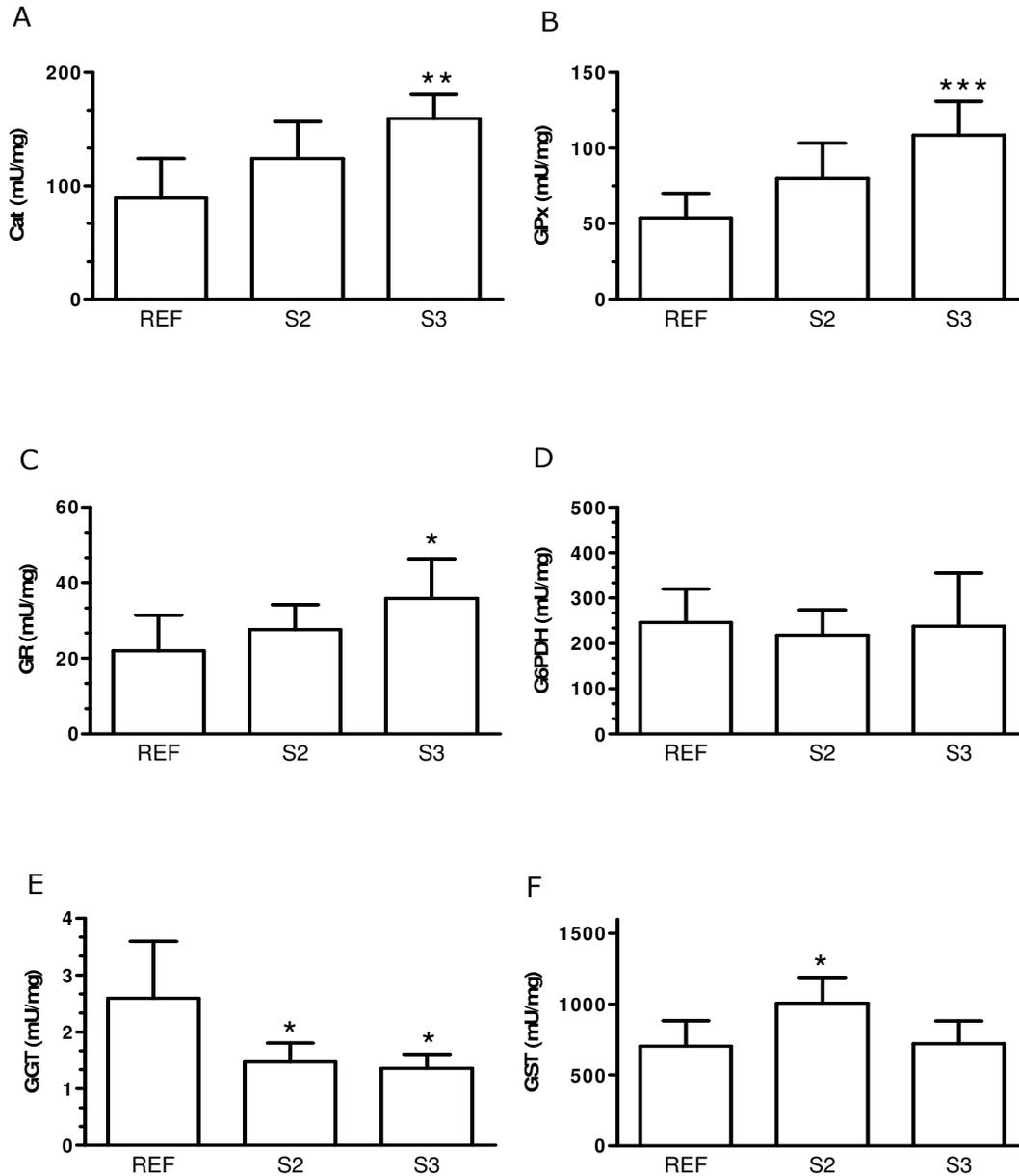


**Figura 9: Estado tiol/dissulfeto no fígado de tilápias em 2005.** Em (A) níveis de glutathiona total (GSH-t), em (B) níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e em (C) relação entre glutathiona reduzida e oxidada. \* P < 0,05 quando comparado ao grupo referência.



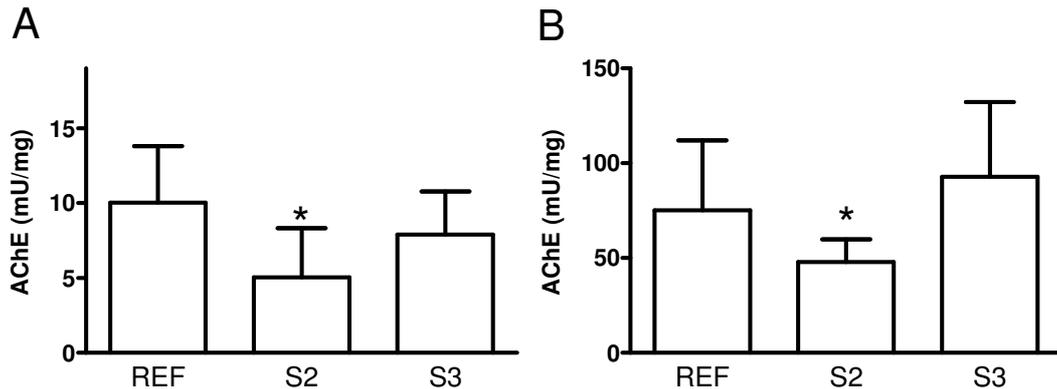
**Figura 10: Níveis de tióis e hemoglobina no sangue de tilápias em 2005.** Em (A) níveis de glutathiona total (GSH-t), em (B) níveis de tióis totais do plasma e em (C) níveis de hemoglobina. \* P < 0,05 quando comparado ao grupo referência.

Os dados enzimáticos do fígado mostraram alterações tanto para o ponto S2 como S3. Observou-se um aumento na atividade Cat no ponto S3 (Fig. 11A), assim como as atividades GPx (Fig. 11B) e GR (Fig. 11C). Ao mesmo tempo, este ponto apresentou uma menor atividade GGT (Fig. 11E). Para o ponto S2, também observou-se uma menor atividade GGT (Fig. 11E), enquanto que a atividade GST esteve aumentada (Fig. 11F).



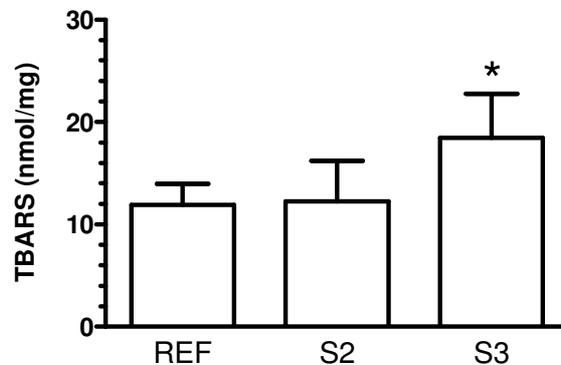
**Figura 11: Atividade de enzimas antioxidantes no fígado de tilápias em 2005.** Em (A) catalase (Cat), em (B) glutatona peroxidase (GPx), em (C) glutatona redutase (GR), em (D) glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), em (E) gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) e em (F) glutatona S-transferase (GST). Todas as atividades enzimáticas foram analisadas na fração solúvel do fígado, com exceção da GGT que foi mensurada na fração particulada. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo referência.

Além das enzimas antioxidantes e de detoxificação, a atividade colinesterásica também foi analisada no fígado, como marcador de exposição à organofosforados e carbamatos. Tanto para a fração solúvel como particulada do fígado, observou-se uma inibição da atividade AChE no ponto S2, enquanto que o ponto S3 não houve nenhuma alteração (Fig. 12A e Fig. 12B).



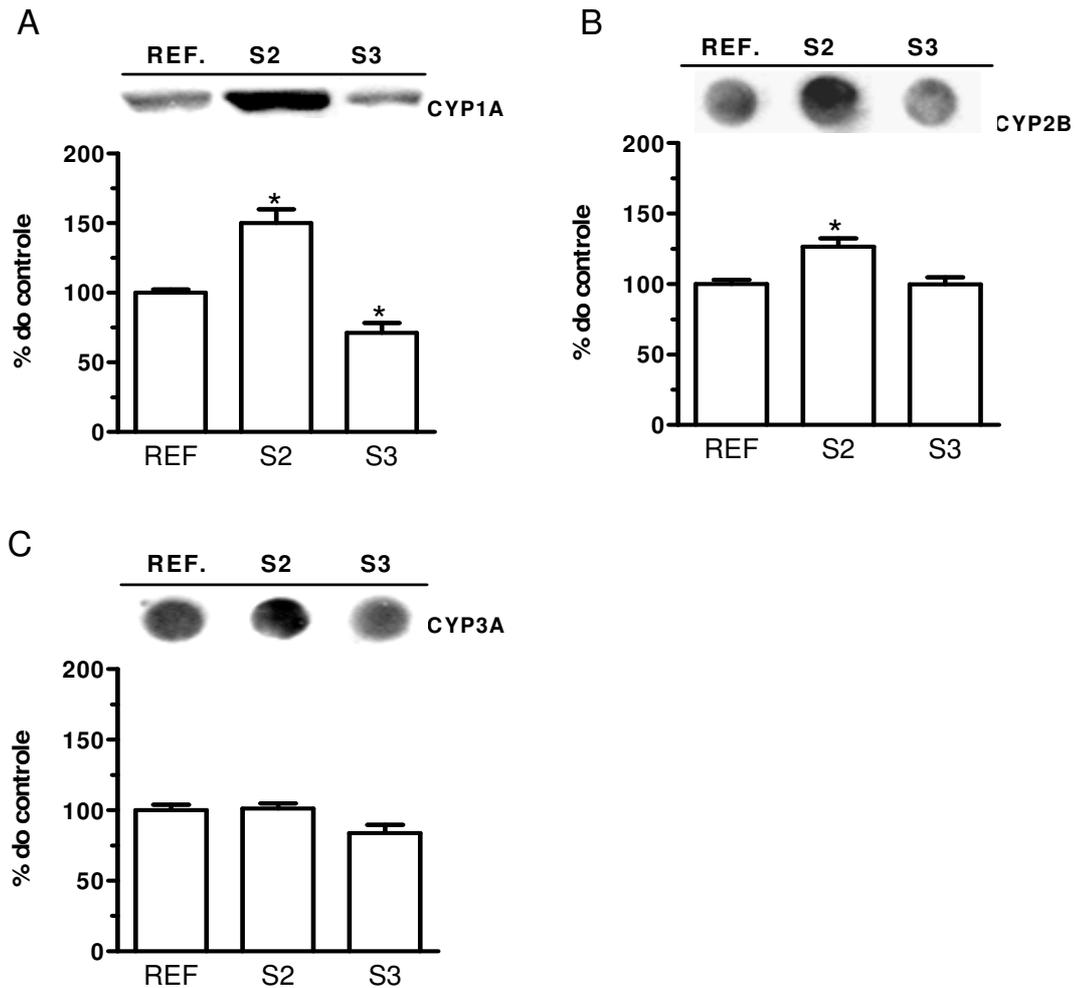
**Figura 12: Atividade colinesterásica no fígado de tilápias em 2005.** Atividade acetilcolinesterase (AChE) na fração solúvel (A) e na fração particulada (B). \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo referência.

Ainda, foi estimado o dano celular no fígado dos animais através do ensaio de TBARS. Os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de produtos finais de lipoperoxidação no fígado dos animais do ponto S3, enquanto que o ponto S2 não demonstrou alterações significativas (Fig. 13)



**Figura 13: Níveis de TBARS no fígado de tilápias em 2005.** Produtos finais da lipoperoxidação na fração solúvel do fígado dos animais. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo referência.

A expressão de diferentes isoformas de citocromos P450 (CYP) também foi analisada no fígado dos animais. Os resultados da imunodeteção demonstraram um aumento na expressão da isoforma CYP1A (Fig. 14A) e CYP2B (Fig. 14B) no ponto S2, enquanto que se observou uma redução na expressão do CYP1A (Fig. 14A) no ponto S3. A isoforma CYP3A não apresentou diferenças significativas na sua expressão entre os pontos S2 e S3 (Fig. 14C).



**Figura 14: Imunodeteção das isoformas de Citocromos P450 nos microsomas hepáticos das tilápias em 2005.** Em (A) citocromo P450 1A, em (B) citocromo P450 2B e em (C) citocromo P450 3A. As figuras acima do gráfico representam a imunodeteção das respectivas isoformas de citocromos entre os diferentes pontos de estudo. Os gráficos representam os valores semi-quantitativos como porcentagem do grupo referência. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo referência.

A matriz de correlação de Pearson entre alguns dos parâmetros realizados pode ser observada na Tabela 1. A partir destes dados, pode-se observar a forte correlação das enzimas antioxidantes entre si. Os níveis de TBARS também apresentaram boa correlação com a atividade de todas as enzimas antioxidantes testadas. Além disso, também ocorreu uma forte correlação entre as isoformas CYP1A e CYP2B. A acetilcolinesterase, que teve sua atividade diminuída no ponto S2, não demonstrou correlação com os demais parâmetros, assim como a relação GSH/GSSG.

**Tabela 1: Matriz de correlação<sup>a</sup> entre parâmetros analisados no fígado de tilápias em 2005.** As siglas utilizadas são as mesmas descritas na metodologia.

	Cat	GPx	GST	GR	G6PDH	TBARS	GSH / GSSG	CYP1A	CYP2B	CYP3A	AChE
Cat	1	<u>0,68*</u>	0,45	<u>0,66*</u>	0,35	<u>0,56*</u>	-0,39	-0,27	-0,06	-0,5	-0,17
GPx	<u>0,68*</u>	1	<u>0,63*</u>	<u>0,85***</u>	<u>0,70**</u>	<u>0,73**</u>	-0,45	-0,31	-0,11	-0,2	0,06
GST	0,45	<u>0,63*</u>	1	<u>0,67*</u>	<u>0,81***</u>	<u>0,57*</u>	-0,02	-0,23	0,04	0,06	0,3
GR	<u>0,66*</u>	<u>0,85***</u>	<u>0,67*</u>	1	<u>0,73**</u>	<u>0,77**</u>	-0,44	-0,33	-0,17	-0,16	0,08
G6PDH	0,35	<u>0,70**</u>	<u>0,81***</u>	<u>0,73**</u>	1	<u>0,63*</u>	-0,1	-0,3	0,09	0,07	0,02
TBARS	<u>0,56*</u>	<u>0,73**</u>	<u>0,57*</u>	<u>0,77**</u>	<u>0,63*</u>	1	-0,07	-0,51	-0,29	-0,52	0,26
GSH / GSSG	-0,39	-0,45	-0,02	-0,44	-0,1	-0,07	1	-0,38	-0,2	0,04	0,29
CYP1A	-0,27	-0,31	-0,23	-0,33	-0,3	-0,51	-0,38	1	<u>0,83***</u>	0,48	-0,28
CYP2B	-0,06	-0,11	0,04	-0,17	0,09	-0,29	-0,2	<u>0,83***</u>	1	0,48	-0,45
CYP3A	-0,5	-0,2	0,06	-0,16	0,07	-0,52	0,04	0,48	0,48	1	-0,21
AChE	-0,17	0,06	0,3	0,08	0,02	0,26	0,29	-0,28	-0,45	-0,21	1

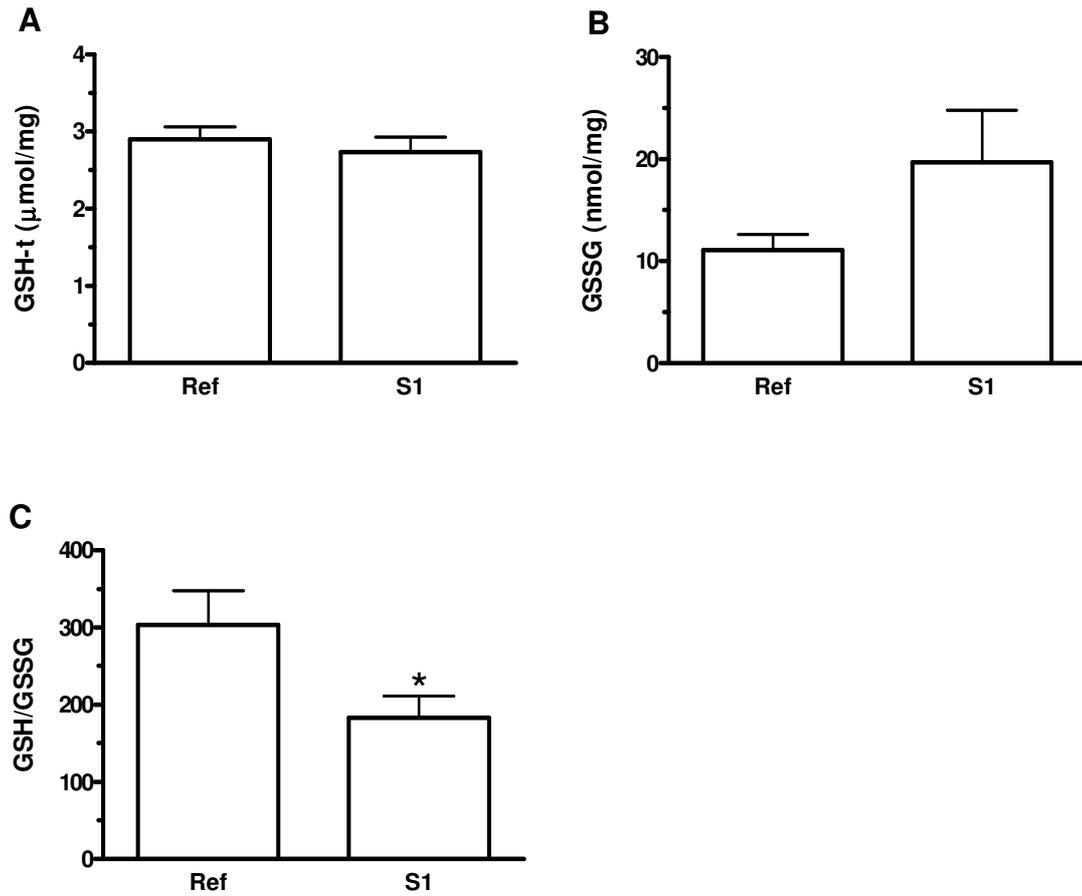
<sup>a</sup> Os valores apresentados correspondem ao coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para uma relação de linearidade. As correlações significativas entre os parâmetros estão sublinhadas, e indicadas com asteriscos para os seguintes valores de  $P \leq$ : \* 0,05; \*\* 0,01 ou \*\*\* 0,001.

### Joinville 2007

O último estudo em Joinville, realizado entre 06/03/07 e 13/03/07, analisou o ponto S1 de Joinville (Fig. 7), uma região de atividade agrícola principalmente com o cultivo do arroz.

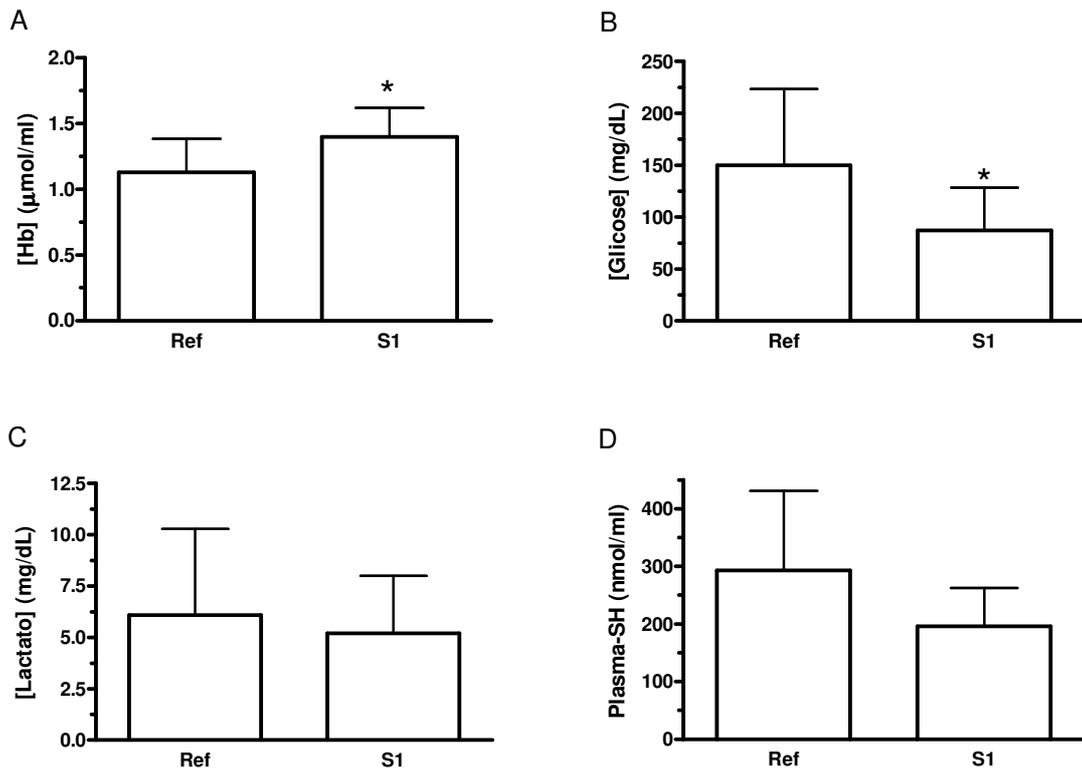
As análises de imunodeteção das isoformas de CYP1A, CYP2B e CYP3A não puderam ser realizadas por problemas com o congelamento das amostras.

Os resultados demonstram que, com relação aos níveis de glutathiona e tióis no fígado, houve uma significativa redução na relação GSH/GSSG dos animais do grupo S1 (Fig. 15C) em relação ao grupo referência, enquanto que os níveis de glutathiona total (Fig. 15A), glutathiona oxidada (Fig. 15B) não mostraram alterações significativas.



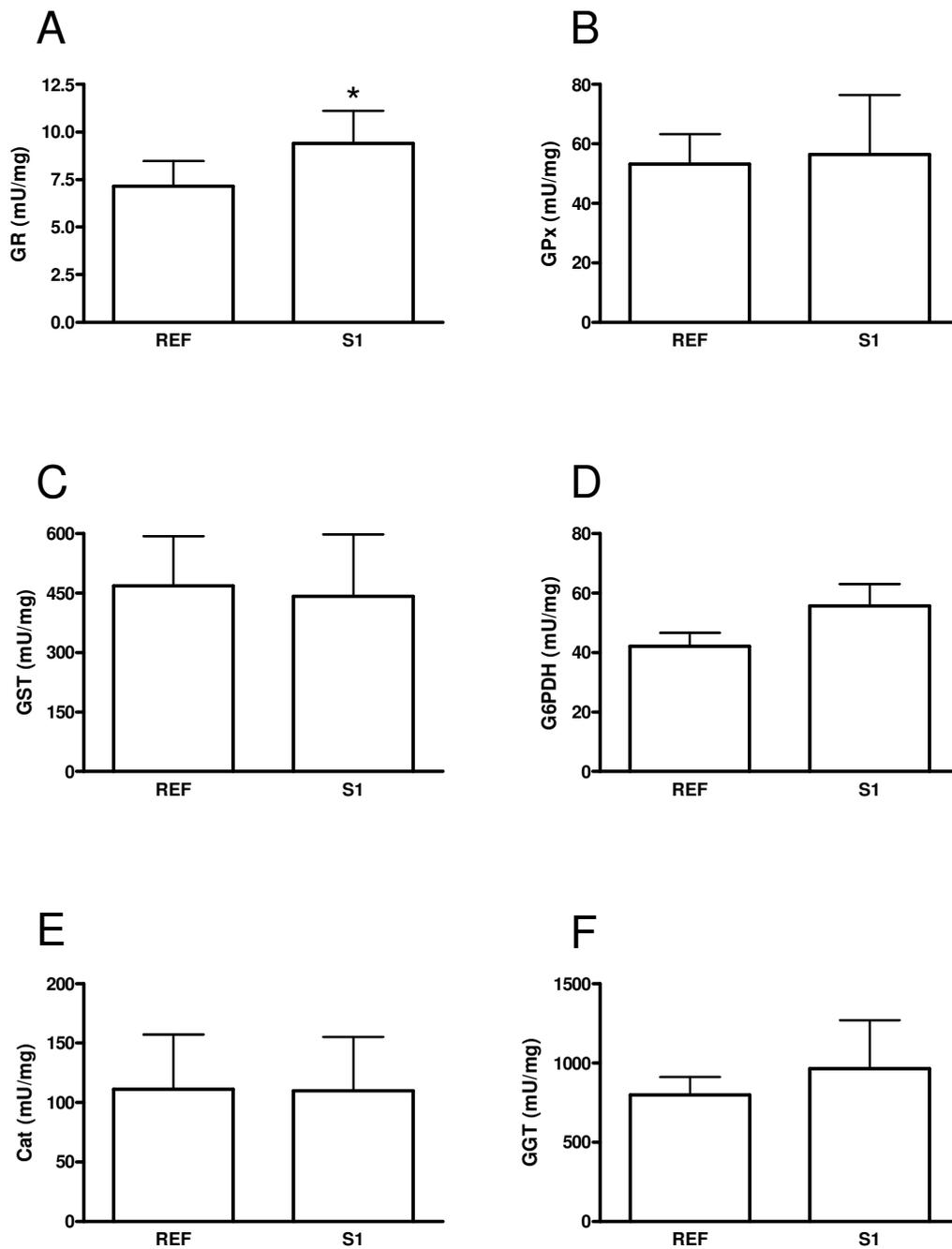
**Figura 15: Estado tiol/dissulfeto no fígado de tilápias em 2007.** Em (A) níveis de glutathione total (GSH-t), em (B) níveis de glutathione oxidada (GSSG) e em (C) relação entre glutathione total e oxidada. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo referência.

Já os resultados dos parâmetros sanguíneos mostraram um aumento nos níveis de hemoglobina (Fig. 16A) e diminuição da glicemia (Fig. 16B) nos animais do grupo S1, quando comparados com os do grupo referência. Outros parâmetros como níveis de lactato (Fig. 16C) e de tióis totais (Fig. 16D) permaneceram inalterados.



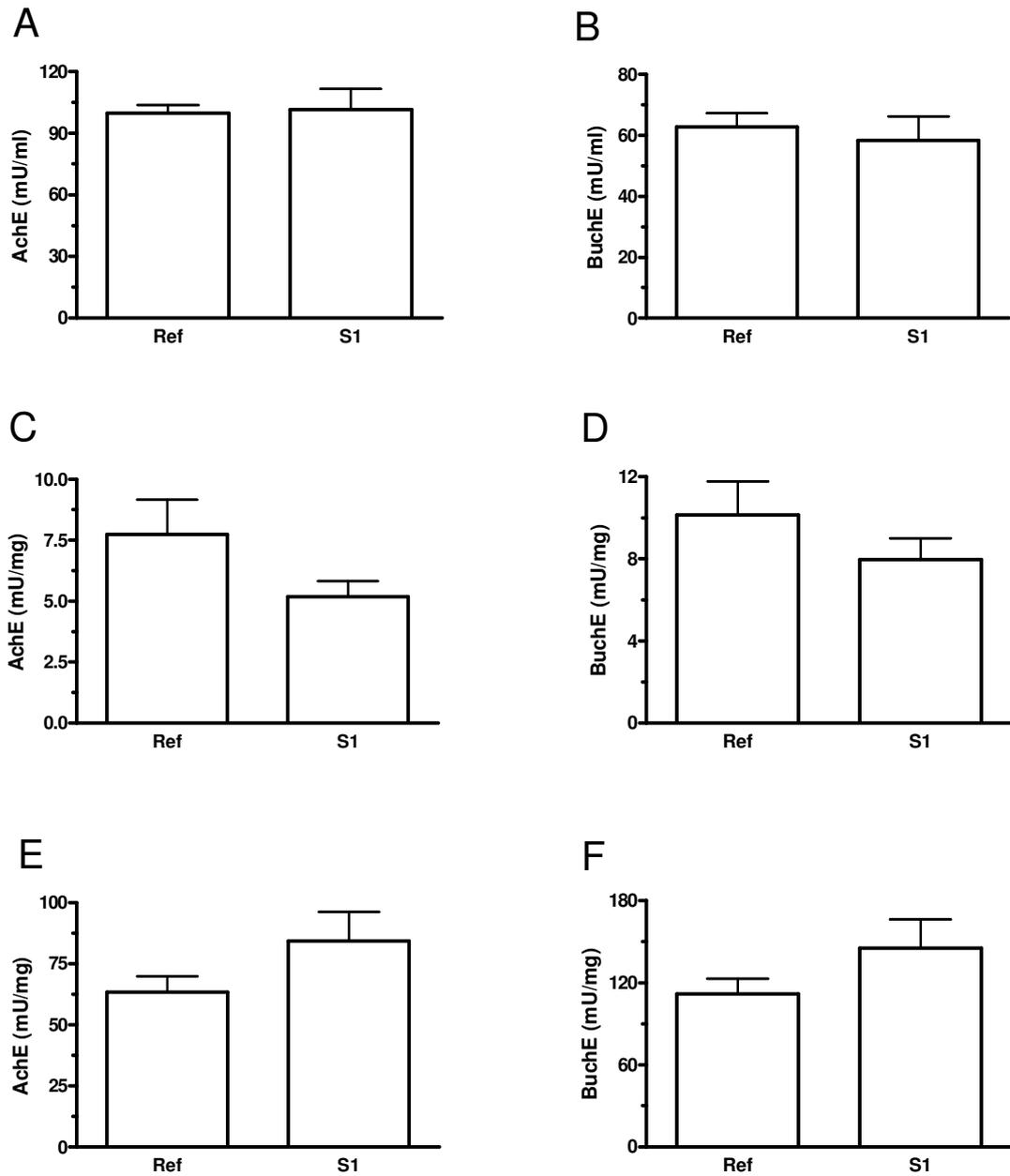
**Figura 16: Parâmetros sanguíneos de tilápias em 2007.** Concentração de hemoglobina (A), nível de glicemia (B), de lactato (C) e de tióis totais no plasma (Plasma-SH) (D). \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo referência.

Com relação às enzimas antioxidantes no fígado, observou-se um aumento na atividade da GR nos animais do grupo S1, em relação ao grupo referência (Fig. 17A), enquanto que as enzimas responsáveis pela detoxificação das ERO, como a GPx (Fig. 17B) e Cat (Fig. 17E) e de xenobiontes pelo processo de biotransformação de fase II, como a GST (Fig. 17C), mantiveram-se inalteradas. Outras enzimas importantes para a manutenção do sistema antioxidante celular, como a G6PDH (Fig. 17D) e GGT (Fig. 17F), permaneceram inalteradas no grupo S1.



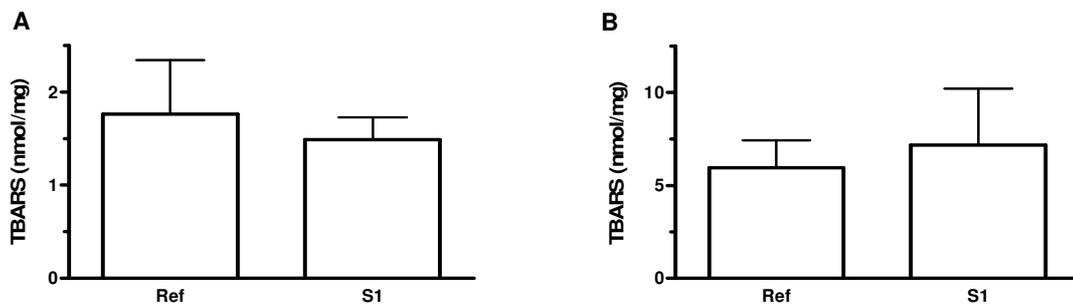
**Figura 17: Enzimas antioxidantes no fígado de tilápias em 2007.** Atividade glutathiona redutase (A), atividade glutathiona peroxidase (B), atividade glutathiona-S-Transferase (C), atividade glicose 6-fosfato desidrogenase (D) e atividade catalase (E) no sobrenadante e atividade da gama-glutamil transpeptidase (F) na fração particulada. Uma unidade corresponde a uma reação de 1  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . \*\*  $P < 0,01$  em relação ao ponto de referência.

Os biomarcadores de contaminação por organofosforados AChE e BuChE também não mostraram nenhuma alteração, tanto no sangue (Fig. 18A e Fig. 18B) como nas frações solúveis (Fig. 18C e Fig. 18D) e particuladas (Fig. 18E e Fig. 18F) do fígado.



**Figura 18: Atividade colinesterásica hepática e sanguínea de tilápias em 2007.** Atividade acetilcolinesterase no sangue (A), na fração solúvel do fígado (C) e na fração particulada do fígado (E). Atividade da butirilcolinesterase no sangue (B), na fração solúvel do fígado (D) e na fração particulada do fígado (F).

Os marcadores de danos celulares de lipoperoxidação (TBARS) no fígado não mostraram alterações, tanto na fração solúvel (Fig. 19A) como na particulada (Fig. 19B).

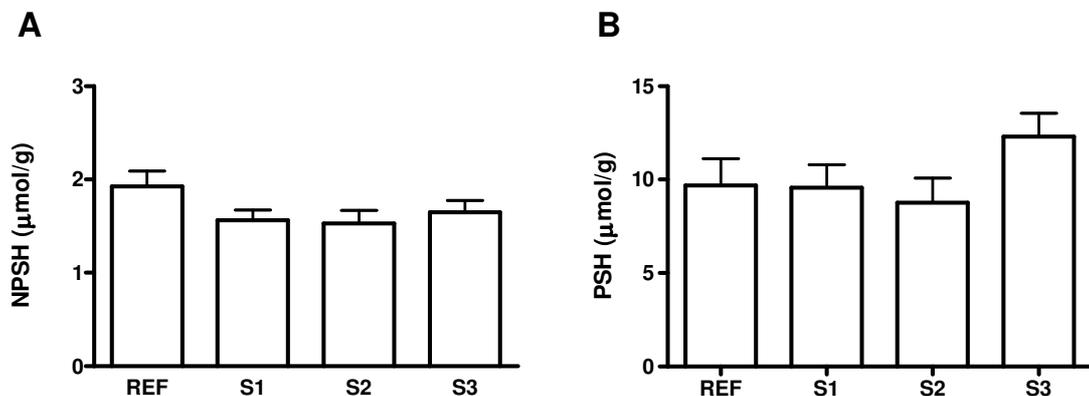


**Figura 19:** Níveis de TBARS no fígado de tilápias em 2007. Lipoperoxidação na fração solúvel (A) e na fração particulada (B).

## 5.2 Florianópolis (ostras, 30 dias de exposição)

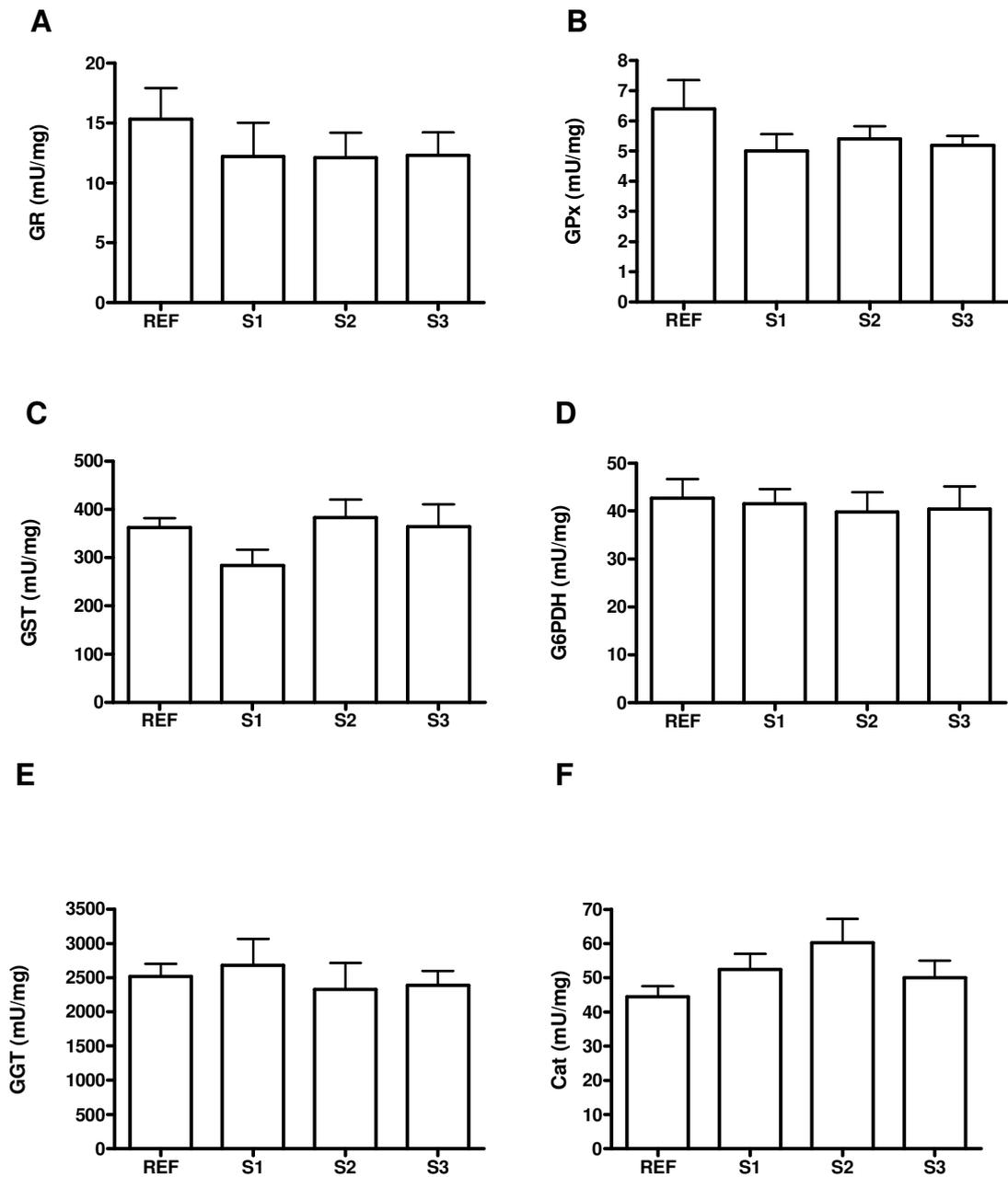
Para a área de estudo da Baía Norte de Florianópolis, foram analisados parâmetros antioxidantes na brânquia de ostras expostas em diferentes pontos da baía (Fig. 8).

Os dados analisados não demonstraram alterações significativas com relação aos níveis de NPSH (Fig. 20A) e PSH (Fig. 20B) quando comparados ao grupo referência (Ribeirão da Ilha). Devido a problemas com a curva padrão do método de detecção de GSH-t ocorridos durante o experimento, esse parâmetro não pode ser analisado para este experimento, uma vez que deve ser feito com amostra fresca.



**Figura 20:** Níveis de tióis na brânquia de ostras. Em (A) tióis não-protéicos (NPSH) e em (B) tióis protéicos (PSH).

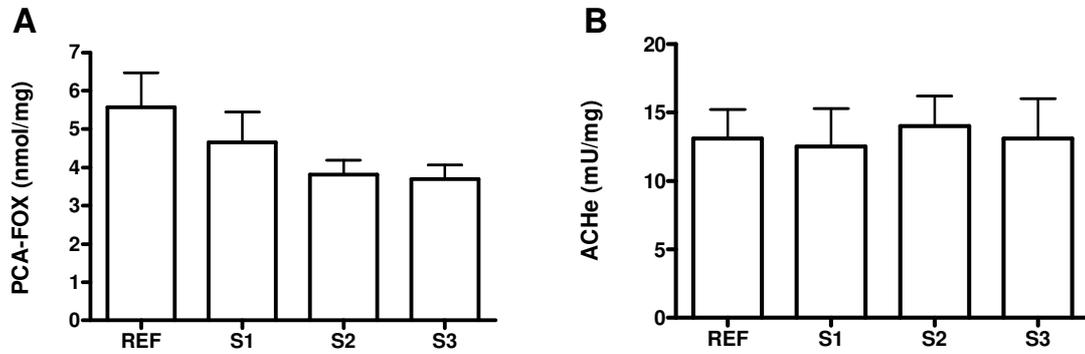
Com relação às enzimas antioxidantes, não observamos alterações relacionadas ao metabolismo da glutathione (GR, GGT) (Fig. 20A e Fig. 20E, respectivamente). As enzimas de detoxificação de peróxidos GPx (Fig. 20B) e Cat (Fig. 20F) também não sofreram alterações, assim como as enzimas GST (Fig. C) e G6PDH (Fig. D), importantes para a biotransformação de xenobiontes e manutenção de NADPH celular, respectivamente.



**Figura 21: Enzimas antioxidantes na brânquia de ostras.** Em (A) glutationa redutase; em (B) glutationa peroxidase (GPx); em (C) glutationa S-transferase (GST); em (D) glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH); em (E) gamma-glutamyl transpeptidase (GGT); e em (F) catalase (Cat). Todas as atividades enzimáticas foram analisadas na fração solúvel da brânquia, com exceção da GGT, que foi na fração particulada.

A fim de quantificar o dano celular, analisamos os níveis totais de peróxidos determinados pelo método PCA-FOX. Os peróxidos são formados normalmente pelo metabolismo celular, sendo produzidos em maior escala quando os organismos são expostos a insultos oxidativos, e representam uma medida geral de dano celular. De acordo com os dados obtidos pelo método de PCA-FOX, não observou-se diferenças significativas na sua quantificação entre os diferentes pontos de estudo (Fig. 22A).

A atividade AChE, outro biomarcador que usamos em estudos de Joinville, também foi analisada nas ostras. Como pode-se observar na Figura 22B, não ocorreram alterações significativas entre os pontos analisados. Não foi determinada a BuChE, uma vez que sua atividade não pode ser detectada pelo método empregado, o que está de acordo com a literatura (BOCQUENÉ, ROIG & FOURNIER, 1997).



**Figura 22: Níveis de peróxidos totais e atividade colinesterásica em ostras.** Em (A), quantificação de peróxidos pelo método de PCA-FOX e em (B) atividade acetilcolinesterase (AChE) em brânquias.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Joinville

Os dados dos trabalhos de Joinville de 2005 e 2007 demonstraram padrões diferentes nas respostas bioquímicas entre os pontos de exposição.

Na área industrial, estudada em 2005, observaram-se inúmeras alterações nos marcadores antioxidantes e também nas enzimas de biotransformação. Conforme pode-se observar, no ponto S3 houve tanto uma diminuição nos níveis de GSH-t hepática e sanguínea (Fig. 9A e Fig. 10A.), como na relação GSH/GSSG hepática (Fig. 9C). Esta alteração pode evidenciar a presença de estresse oxidativo, conclusão esta também realizada em outros trabalhos com este parâmetro (BANDO *et al.*, 2005; PEREZ *et al.*, 2005). Essa afirmação também pode ser sustentada pelo aumento dos produtos finais de lipoperoxidação (Fig. 13), indicando que os animais deste ponto estão sob o impacto processos oxidativos. Sob estes tipos de situações, as células são capazes de ativar respostas adaptativas através de inúmeros sistemas de defesas, entre elas as defesas antioxidantes (STONE & COLLINS, 2002; COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001), o que também pode ser observado neste ponto de estudo (Fig. 11). A elevada atividade peroxidásica da GPx (Fig. 11B) e da Cat (Fig. 11A) poderia ser uma resposta aos elevados níveis de TBARS e baixos níveis de GSH. Desta mesma forma, o aumento da atividade GR (Fig. 11C) poderia ser uma tentativa de restabelecer os níveis de GSH/GSSG. Porém, a falta de correlação significativa entre a atividade GR e a taxa GSH/GSSG (Tabela 1) não está de acordo com esta idéia. Aparentemente, a alta atividade GR está sendo capaz de evitar o acúmulo de GSSG intracelular, originada principalmente através da atividade GPx, o que está de acordo com a boa correlação que as duas enzimas demonstraram estatisticamente (Tabela 1). Já a diminuição da relação GSH/GSSG observada no ponto S3 é uma conseqüência dos baixos níveis de GSH hepática e sanguínea, que pode estar sendo consumida por processos de conjugação e transporte de metais ou glutatilação de proteínas, por exemplo. Porém, a GSH pode demonstrar padrões diferentes de resposta frente à contaminação dependendo do tempo de exposição. Em um trabalho com tilápias expostas a efluentes da indústria suína, Lima e colaboradores (2006) observaram menores níveis de GSH hepática após exposição subcrônica (7 dias) e elevados níveis de GSH, GSH-t e GSSG após exposição crônica (90 dias). Aparentemente, a exposição à contaminação leva a um rápido consumo de tióis em inúmeros processos, como peroxidação, conjugação, glutatilação e neutralização, e posteriormente, como uma resposta adaptativa, há um aumento na produção destes compostos. Novos estudos ainda são necessários nesta área da ecotoxicologia, a fim de

compreender a modulação das respostas celulares ao longo das fases aguda, subcrônica e crônica de exposição à contaminantes ambientais.

A diminuição nos níveis de Hb no ponto S3 (Fig. 10 B) pode ser um indicativo de menor quantidade de eritrócitos circulantes. Como a glutathiona sanguínea é encontrada majoritariamente em eritrócitos, isto poderia explicar a diminuição nos níveis de GSH-t sanguínea no ponto S3 (Fig. 10A). Entretanto, se os valores de GSH-t forem normatizados pelo conteúdo de Hb, a redução nos níveis de GSH-t no ponto S3 ainda permanece significativa, indicando que a diminuição dos níveis de GSH-t não é devido ao menor índice de Hb ou hemácia sanguínea.

O ponto S2 também mostrou sinais de estresse oxidativo, como observado pelo elevado nível de GSSG (Fig. 9B) e diminuição na relação GSH/GSSG (Fig. 9C), o que sustenta o uso destes tipos de biomarcadores em trabalhos de monitoramento ambiental. Diferentemente do ponto S3, as respostas enzimáticas do ponto S2 foram marcadas pela indução nas enzimas de biotransformação de fase I e II (Fig. 11F e 12G) testadas. A GST é uma importante família de enzimas que, em conjunto com os CYPs, participam do processo de biotransformação de xenobiontes como PAH e PCB, por exemplo. Esse aumento na atividade GST poderia estar vinculado com a presença destes tipos de compostos na região, uma vez que a atividade industrial é uma das maiores fontes destes tipos de poluentes orgânicos hidrofóbicos. Ao mesmo tempo, estes xenobiontes podem ativar o receptor AHR (do inglês *Aryl hydrocarbon receptor*), e ativar a transcrição de GSTs e CYPs, além de outras enzimas (HAHN, 2002), o que está de acordo com os resultados do ponto S2 devido ao aumento da expressão das isoformas CYP1A (Fig. 14A) e CYP2B (Fig. 14B) e da atividade GST, mostrando uma regulação no sistema de biotransformação desses animais. Além disso, os CYPs produzem ERO durante o processo de metabolização de compostos (LEE & ANDERSON, 2005), contribuindo para um aumento do estresse oxidativo e possível consumo das defesas antioxidantes não enzimáticas, como observado pelo aumento dos níveis de GSSG e baixa relação GSH/GSSG neste ponto.

A indução das isoformas da família CYP1A em peixes é conhecida por ser um clássico marcador de contaminação por PAH, e também sua atividade e expressão podem ser moduladas na presença de compostos farmacêuticos como fibratos, drogas antiinflamatórias e antidepressivas (SCOTT & HODSON, 2008). A expressão da isoforma CYP2B em mamíferos é induzida por compostos como fenobarbital ou semelhantes. Porém, o aumento no conteúdo protéico de homólogos de CYP2B não ocorre em peixes frente a estes e outros clássicos indutores em mamíferos (IWATA *et al.*, 2002), possivelmente devido a uma diferença na regulação do receptor CAR (do inglês *constitutive active receptor* ou *constitutive*

*androstane receptor*), o qual não sofre translocação para o núcleo após o tratamento com o TCPOBOP, um indutor 650 vezes mais potente em roedores que o fenobarbital (IWATA *et al.*, 2002). Já a família CYP3A, que compreende as isoformas majoritárias do fígado e intestino delgado de peixes e mamíferos, é considerada como a principal via de metabolização de drogas e fármacos como esteróides, podendo ser induzida por inúmeros xenobiontes de diferentes composições estruturais (LI *et al.*, 2008). Em um trabalho de campo com tilápias do Nilo (BAINY, WOODIN & STEGEMAN, 1999), observou-se a indução dessas três isoformas em peixes da represa Billings (SP). Segundo os autores, tais resultados poderiam estar relacionados com a presença de diversos contaminantes, entre eles PCBs, DDT e lindano, ou ainda, como resultado de uma dieta baseada em algas e detritos, as quais podem conter compostos como terpenóides, compostos aromáticos indutores de CYP2B e CYP3A em mamíferos.

Desta forma, o aumento do conteúdo protéico de CYP1A e CYP2B no fígado dos peixes do ponto S2, em Joinville, poderiam ser uma resposta à presença de contaminantes de origem industrial como PAH e PCB. Como essa região não possui rede de coleta e tratamento de esgoto, fármacos utilizados pela população em geral também poderiam estar entrando em contato com esses rios, causando a indução do sistema de biotransformação dos animais.

Ainda com relação aos CYPs, observou-se também uma diminuição da expressão da isoforma CYP1A no ponto S3 (Fig. 14A). Em um estudo de laboratório (BRÜSCHWEILER, WÜRGLER & FENT, 1996) foi demonstrado que a ação de metais como cádmio, níquel, cobre, cobalto, zinco e chumbo, são capazes de inibir a atividade enzimática do CYP1A em células hepáticas e causar a diminuição de seu conteúdo protéico, ao mesmo tempo em que é capaz de ocasionar significativa toxicidade celular. Assim, a diminuição do conteúdo de CYP1A encontrado no ponto S3 poderia estar vinculada à presença de metais, que também são conhecidos por causar uma modulação no sistema antioxidante e causar dano a biomoléculas (WINSTON & DIGIULIO, 1991; REGOLI *et al.*, 2002; MARTINEZ-ALVAREZ, MORALES & SANZ, 2005), parâmetros estes observados em nossos estudos (Fig. 11 e Fig. 13). Ao mesmo tempo, os baixos níveis de glutatona total (Fig. 9A e Fig. 10A), e ausência de um aumento nos níveis de glutatona oxidada (Fig. 9B), poderiam estar relacionados com a capacidade da GSH de quelar metais. Esta suposição está de acordo com a falta de correlação entre GSH/GSSG e as enzimas antioxidantes (Tabela 1), sugerindo que a alteração neste parâmetro não demonstra um estresse oxidativo, mas o possível consumo de GSH em processos de neutralização de metais.

Em geral, peixes expostos cronicamente a metais como mercúrio, cobre e cádmio, tem como resposta adaptativa elevados níveis de GSH hepática, enquanto que a exposição aguda a

cádmio causa a depleção de GSH, evidenciando seu papel como importante quelante (MARACINE & SEGNER, 1999). Em um estudo realizado sobre os efeitos da exposição do peixe *Leporinus obtusidens* a níveis subletais de zinco e cobre, foram observados elevados níveis de TBARS e atividade catalase no fígado dos animais após exposição de 45 dias (GIODA *et al.*, 2007). O mesmo estudo também mostrou baixos níveis de hemoglobina, resultados estes também observados nos animais do ponto S2 de nosso estudo.

Além disso, esta suposição de elevada contaminação ambiental por metais no Rio Cubatão também pode ser constatada por um estudo realizado no Canal do Linguado (UNIVILLE, 2004), canal este onde deságuam as águas do rio Cubatão. Segundo análises feitas no Rio Cubatão, nas proximidades da Baía da Babitonga, e na própria Baía, foi observada a presença de elevados níveis de metais como arsênio, chumbo, cobre e zinco no tecido de peixes, gastrópodes, bivalves e mamíferos. Em alguns casos os valores chegaram a mais de 200 mg de cobre/Kg no caso de peixes e 1000 mg de zinco/Kg no caso de bivalves. Além disso, aquele estudo também analisou a presença destes e outros metais na coluna da água e no sedimento, e também encontrou níveis de cádmio, chumbo, cobre, cromo, e níquel acima do permitido pelo CONAMA. Estes dados corroboram os resultados encontrados nos biomarcadores de estresse oxidativo no ponto S3.

Em ambos os pontos S2 e S3, observou-se uma diminuição significativa na atividade GGT (Fig. 11), importante enzima na manutenção da homeostase de GSH. Essa diminuição poderia diminuir a disponibilidade de cisteína para a formação de GSH e proteínas no fígado. O fornecimento de cisteína para outros tecidos pode ser comprometido pela diminuição da síntese e liberação de GSH pelo fígado, uma vez que este é o principal órgão responsável por este processo (HANIGANM, 1998). A diminuição nos níveis de GSH tecidual pode reduzir as defesas antioxidantes do animal frente a contaminantes, o que pode levar ao estresse oxidativo.

A atividade acetilcolinesterásica (AChE), outro biomarcador utilizado no presente estudo, mostrou menores valores no ponto S2, tanto na fração solúvel (Fig.14A) como na fração particulada (Fig. 14B). A inibição desta enzima vem sendo utilizada como marcador da presença de pesticidas organofosforados, e a inibição de mais de 70% de sua atividade no cérebro pode causar a morte de inúmeras espécies de peixes (FULTON & KEY, 2001). A presença de tais pesticidas em Joinville pode ser uma realidade, uma vez que a cidade é um importante produtor de arroz, tipo de cultivo que usa grande quantidade de pesticidas e que entram facilmente em contato com a água. Em estudo na mesma área foi observado elevação da atividade AChE na fração particulada do fígado de tilápias exposta a contaminantes no Rio

do Braço, donde os autores discutem a possibilidade de que esta alteração possa ser devido a exposição contínua a baixas concentrações de inibidores de AChE (ALVES, 2003).

Alguns trabalhos de monitoramento ambiental com peixes mostraram a ocorrência de indução de CYP concomitantemente com a inibição de AChE (e.g. GAVILÁN *et al.*, 2001; HANSSON *et al.*, 2006), podendo existir uma relação neste padrão encontrado. O aumento na atividade e/ou conteúdo protéico de CYP proporciona a esses animais uma maior capacidade de biotransformação. Este processo é responsável pela metabolização de pesticidas organofosforados e formação dos seus derivados oxon, sendo estes os principais responsáveis pela toxicidade dos pesticidas através da inibição da AChE. Em um estudo sobre o efeito do pesticida organofosforado diazonon, em diferentes estágios de desenvolvimento do peixe *medaka*, (*Oryzias latipes*), observou-se que a inibição do metabolismo dos CYPs diminuía o efeito tóxico do pesticida sobre a atividade AChE, e, através de experimentos *in vitro*, demonstraram que a presença de microsomas hepáticos do *medaka* aumentavam a inibição da enzima AChE causada pelo diazonon (HAMM, WILSON & HINTON, 2001). Assim, a menor atividade AChE encontrada no ponto S2 em Joinville também pode estar relacionada a um efeito sinérgico do aumento de CYP1A e 2B encontrado neste ponto, mesmo que as concentrações de organofosforados na água não sejam elevadas.

Na região de forte influência agrícola, estudada em 2007 (S1), os resultados também mostraram um estado pró-oxidativo através da diminuição da relação GSH/GSSG (Fig. 15C). Inúmeros trabalhos vêm mostrando a importância no estudo deste parâmetro oxidativo como marcador de contaminação a xenobiontes (PEÑA-LLOPIS, FERRANDO & PEÑA, 2002; ZHANG *et al.*, 2004; SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, BEDNARSKA & KAFEL, 2006). A manutenção deste índice é fundamental para a célula, e sua alteração pode ativar inúmeras adaptações fisiológicas (SCHAFER & BUETTNER, 2001). A GR, por ter como função a redução da GSSG à GSH e mantendo assim elevados níveis de GSH, tem um papel central no restabelecimento no estado redox celular (REISCHL *et al.*, 2007). Desta forma, a fim de evitar estresse oxidativo, o aumento da atividade GR (Fig. 17A) poderia estar relacionada à tendência do aumento dos níveis de GSSG e na diminuição na relação GSH/GSSG. Sua utilização como possível biomarcador já vem sendo levantada há muito tempo (VODICNIK, ELCOMBE & LECH, 1981) e outros trabalhos já demonstraram um aumento na sua atividade em peixes expostos a contaminantes (RODRÍGUEZ-ARISA *et al.*, 1993; MACHALA *et al.*, 1997).

A ausência de alteração na atividade de enzimas clássicas de detoxificação de fase 2 como a GST (Fig. 17C) poderia indicar um baixo nível de poluição nas águas. No experimento de 2007, outras enzimas antioxidantes (Fig. 17) como GPx, Cat, GGT e G6PDH,

assim como os níveis de TBARS (Fig. 19) permaneceram inalterados, o que também poderia ser um sinal de baixa carga de poluentes neste ponto das águas do Rio Cubatão.

Apesar da área de estudo estar localizada em uma região de importância agrícola, não era época de cultivo de seu principal produto, o arroz. Os dados da AChE e BuChE tanto do sangue como do fígado estão de acordo com este dado, pois não houve diminuição em suas atividades, uma vez que são marcadores de contaminação por pesticidas (onde se enquadram importantes pesticidas como o malathion, carbofuran e herbicidas como o paraquat) (AHMED *et al.*, 2007, CAMPANELLA *et al.*, 2007). Novos estudos deveriam ser efetuados nesta região em outros períodos do ano, a fim de avaliar a toxicidade da rizicultura e de seus pesticidas para águas do Rio Cubatão e suas comunidades aquáticas.

Parâmetros sanguíneos como níveis de hemoglobina, lactato e glicose podem estar relacionados com adaptações fisiológicas ao estresse ou anóxia, demonstrando a saúde e situação fisiológica do animal (BEYER *et al.*, 1996; FRISCH & ANDERSON, 2005). Porém, estudos demonstram que aumento nos níveis de hemoglobina (CHOWDHURY, PANE & WOOD, 2004; LANDMAN *et al.*, 2006; SHAH 2006) e diminuição da glicemia (GAGNON, 2006) podem estar relacionados com intoxicação por xenobiontes. Entretanto, em face da limitada resposta nos vários parâmetros analisados neste presente trabalho, aparentemente, estas são respostas adaptativas ao tipo de exposição de 7 dias em gaiolas em um ambiente lótico, devido à um possível estresse de confinamento.

Em outro estudo realizado na região por Alves (2003), também se observaram alterações em parâmetros antioxidantes e de biotransformação em tilápias expostas ao Rio do Braço. Um aumento nas enzimas de biotransformação GST e CYP1A deixa clara a presença de compostos orgânicos oriundos da atividade industrial. O aumento na expressão de CYP1A pode causar a formação de ERO, e com isso a alta atividade Cat observada poderia ser uma resposta a este processo. Ao mesmo tempo, outros compostos como o pesticida 4-cloro-2-metilfenoxiacético, parafinas cloradas, dietilftalato e tricloroetileno são fortes indutores de proliferação de peroxissomos, onde está localizada principalmente a enzima catalase, podendo ser outra opção de contaminação ambiental na região (ALVES, 2003). Este mesmo estudo também observou a presença de lesões hepáticas e de outros tecidos como músculo cardíaco e esquelético, rins e pâncreas. Esta conclusão foi baseada na observação de alta atividade de transaminases no plasma sanguíneo.

Assim, observamos que os recursos hídricos desta região de Joinville estão sob distintas influências de ações antrópicas. Apesar de o estudo ter sido realizado em anos diferentes, uma visível diferença nos padrões de respostas dos biomarcadores analisados pode ser observada. O ponto S1, que se localiza no Rio Cubatão, antes de receber as águas do Rio

do Braço, apresentou poucas variações entre os parâmetros analisados, indicando que possivelmente contém baixas cargas de poluentes. O ponto S2, que diz respeito ao Rio do Braço, demonstrou a possível presença de compostos orgânicos como PAH e PCB, pela alteração no sistema de biotransformação, além de organofosforados devido à inibição da AChE no fígado. O interessante deste estudo é com relação ao ponto S3, que se localiza numa região do Rio Cubatão, após receber as águas do Rio do Braço, e ao contrário do ponto S1, mostrou inúmeras alterações bioquímicas, evidenciando a toxicidade de sua água. Assim, o Rio Cubatão pode estar sofrendo forte influência das águas do Rio do braço, contribuindo para o aumento da contaminação de suas águas.

Esta suposição está de acordo com dados obtidos por estudos da FATMA em parceria com a Sociedade Alemã de Cooperação Técnica (GZT) na região. A partir de estudos de monitoramento da qualidade da água da região em 2003, através de análises físico-químicas e de toxicidade aguda em *Daphnia magna*, observou-se que indústrias de galvanoplastia, têxtil, metal-mecânica, farmacêuticas e de fabricação de bebidas presentes na região de Joinville, contêm elevados níveis de toxicidade para *Daphnia magna* (FATMA, 2003). A FATMA também considerou que o Rio do Braço continha uma demanda bioquímica de oxigênio fora do limite legal. A demanda química de oxigênio mostrou valores extremamente elevados e suas águas representavam alto grau de toxicidade para *Daphnia magna*. Já o Rio Cubatão, antes de receber as águas do Rio do Braço, não mostrou toxicidade elevada para *Daphnia magna*, a demanda química de oxigênio também era alta, porém um valor muito inferior ao do Rio do Braço, e os valores de demanda bioquímica de oxigênio estavam dentro do limite legal. Mas assim como a conclusão retirada a partir dos resultados de nosso trabalho, a FATMA mostrou o maior grau de contaminação das águas do Rio Cubatão após receber as águas do Rio do Braço, evidenciado pela alta toxicidade a *Daphnia magna* e pela alta demanda química de oxigênio. Ambos os rios estavam com elevados níveis de coliformes fecais ao longo de todo o curso de água analisado.

## 6.2 Florianópolis

No estudo realizado em ostras do Pacífico *C. gigas*, expostas durante 30 dias em diferentes pontos da Baía Norte de Florianópolis, não foram observadas alterações significativas entre os diversos parâmetros analisados.

Inicialmente, devemos levantar a questão da presença de contaminantes na área de estudo. A presença de metais como zinco, cobre, chumbo, cádmio e cromo foi analisada na água e em tecidos de peixes (BENATO & SCUSSEL, 1999; CLAUDINO, 2003), e os valores obtidos na região permaneceram abaixo dos limites fixados pelo CONAMA. Porém, já foi

demonstrado o alto grau de contaminação por coliformes na baía e região próxima, principalmente junto à ponte Hercílio Luz e na saída do Rio Biguaçu (CERUTTI & BARBOSA, 1996). Ao mesmo tempo, as análises de coliformes fecais realizadas pela CASAN (2008), mostrou altos índices de *E. coli* nos pontos S1 e S2 nos meses de fevereiro e abril. Os pontos S3 e REF não foram analisados pela CASAN. Entretanto, um trabalho realizado por um laboratório da UFSC (VIEIRA, CARVALHO PINTO & MATIAS, 2008), demonstrou que o Ribeirão da Ilha contém elevadas concentrações de coliformes fecais, não estando enquadrado nos limites estabelecidos pelo CONAMA. Assim, existe a possibilidade de que a ausência de respostas entre os parâmetros estudados seja devido à falta de um ponto referência adequado.

Outros estudos de mesmo gênero que este trabalho já foram realizados na Baía Norte de Florianópolis. Por exemplo, Almeida e colaboradores (2003) fizeram um experimento com mexilhões *Perna perna*, em um protocolo de 12 meses de exposição, transplantando os animais para a Baía de Norte de Florianópolis. Os resultados demonstraram maiores níveis de lipoperoxidação (TBARS) no manto, enquanto que nas brânquias e na glândula digestiva foram observados elevados níveis de 8-OxodGuo, marcador de dano oxidativo no DNA. Neste mesmo estudo, foram observados elevados níveis de coliformes fecais no ponto de exposição da Baía Norte (11000 NMP/100ml) quando comparado à região de Sambaqui, ponto de referência (230 NMP/100 ml). Em outro estudo com o mexilhão *P. perna* (BAINY *et al.*, 2000), observou-se um aumento na atividade GST em animais expostos em dois pontos, próximo à Ponte Hercílio Luz e ao manguezal do Itacorubi, após 180 dias de exposição. No manguezal do Itacorubi também se observou uma diminuição na atividade G6PDH após 150 dias de exposição. Torres e colaboradores (2002) analisaram o efeito da contaminação aquática do manguezal do Itacorubi sobre a espécie nativa de bivalve *Mytella guyanensis*, através de estudo de parâmetros antioxidantes na glândula digestiva e níveis de metais-traço. Os resultados comparados com indivíduos do manguezal de Ratonés, um local de menor impacto antrópico, demonstraram maiores concentrações de metais como Cu, Pb e Cd, além do aumento da atividade enzimática (GR, GPx, Cat, GST, EROD) e do estresse oxidativo nos indivíduos do manguezal do Itacorubi. O estresse oxidativo pode ser inferido pela depleção nos níveis de GSH, aumento de GSSG, TBARS e 8-OxodGuo.

Desta forma, podemos observar que a contaminação da Baía de Florianópolis é extremamente variada, influenciada principalmente pela descarga de efluentes domésticos através de rios como Biguaçu, Sertão, Itacorubi e Tavares. Além disso, a maré e o regime de ventos geram um complexo fluxo de correntes na região, dificultando a caracterização da fonte dos poluentes e de sua biodisponibilidade.

Outra questão importante é a diferença entre os tipos de contaminação entre Florianópolis e Joinville. Em Joinville, a presença de um forte pólo industrial, e também do cultivo de arroz, aponta como fonte de contaminação dos recursos hídricos por metais, PAH, PCB, pesticidas e adubos. Em Florianópolis, a ausência de tais atividades aliada a um intenso processo de urbanização na carência de um plano de saneamento básico adequado, faz com que o esgoto doméstico seja a principal ameaça aos ecossistemas hídricos. Assim, poderíamos esperar padrões de respostas distintas para os parâmetros antioxidantes estudados entre essas duas regiões catarinenses. Estudos já demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo devido ao esgoto doméstico (ALMROTH *et al.*, 2008; STURVE, ALMROTH & FÖRLIN, 2008; ZANETTE *et al.*, 2008), com ocorrência de lipoperoxidação, oxidação de proteínas e alteração das atividades GR, Cat, G6PDH. Talvez um dos problemas de estudar áreas com forte influência do esgoto doméstico é a grande diferença de sua composição, tanto entre as diferentes horas do dia, como entre as diferentes cidades. Conforme pode-se observar em estudos de caracterização de contaminantes aquáticos (AL-RIFAI, GABELISH & SCHÄFER, 2007; TERZIC *et al.*, 2008), inúmeros tipos de xenobiontes podem ser encontrados em efluentes domésticos, como produtos farmacêuticos (analgésicos, antiinflamatórios, antibióticos, entre inúmeros outros produtos e seus subprodutos), hormônios, derivados de produtos alimentícios como cafeína, produtos de higiene pessoal e até mesmo drogas ilícitas ou de uso restrito, como cocaína, THC, anfetamina, morfina e derivados (ZUCCATO *et al.*, 2008). Além desta ampla variedade de classes, a concentração de cada xenobionte também é extremamente variável, e depende do perfil da população residente de cada cidade.

Em relação ao experimento com *C. gigas*, novas análises serão feitas na glândula digestiva das ostras expostas aos diferentes pontos da Baía Norte de Florianópolis, uma vez que a limitação de tempo impediu a sua inclusão neste trabalho. Tendo este tecido elevada importância em processos de metabolização de compostos exógenos, a compreensão de seu sistema de biotransformação e de defesa celular é de extrema importância para esse estudo. Além disso, através da colaboração com outros laboratórios, ainda serão realizadas análises como: oxidação do DNA (8-OxodGuo), parâmetros hemato-imunológicos, expressão diferenciada de mRNA e níveis de compostos orgânicos no tecido desses animais. Estes dados trarão maior clareza quanto à ausência de respostas, contrário ao esperado, e poderão auxiliar na compreensão da resposta desses animais frente à possível contaminação da região.

## 7. CONCLUSÕES

### *Marcadores de estresse oxidativo como ferramentas de monitoramento ambiental*

Alguns autores consideram as defesas antioxidantes e parâmetros de dano oxidativo como ferramentas de baixa sensibilidade à poluição, de dificuldade em compreender o mecanismo de resposta, de moderada relevância toxicológica ao organismo e presença de outros fatores externos que podem afetar esses parâmetros (VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003). Autores que trabalham com esses parâmetros também reconhecem a dificuldade em lidar com fatores como diferenças de sensibilidade entre as espécies, tempo e intensidade de exposição, além da variação de respostas entre os diferentes parâmetros analisados (WINSTON & DI GIULIO, 1991; REGOLI *et al.*, 2002). Os nossos dados obtidos com a ostra *C. gigas* estão de acordo com esta linha de raciocínio, entretanto, precisam ser confirmados com um experimento adicional que inclua um ponto de referência melhor situado.

Por outro lado, os experimentos realizados em Joinville mostram que os parâmetros de estresse oxidativo são bons biomarcadores. Conforme pode-se observar na Tabela 1, que diz respeito à correlação entre os resultados obtidos no estudo em Joinville em 2005, há uma boa correlação entre várias defesas antioxidantes enzimáticas, sugerindo que a maioria destas são reguladas conjuntamente. Da mesma forma, a indução de CYP1A e CYP2B parece ser controlada por um mesmo sistema de controle, enquanto que a atividade AChE não teve relação com os outros parâmetros estudados. Sendo assim, inferimos que as defesas antioxidantes, CYP1A/CYP2B, e AChE constituem bons biomarcadores, entretanto, indicam a presença de contaminantes de naturezas diversas, como metais, compostos orgânicos e pesticidas.

A especificidade e sensibilidade de um biomarcador são importantes características para o seu uso em trabalhos de monitoramento ambiental. Estas qualidades tornaram parâmetros bioquímicos, como a análise da atividade GST e AChE, assim como da quantificação de CYPs, em clássicas ferramentas na ecotoxicologia. Porém, alguns trabalhos vêm demonstrando que o efeito sinérgico de vários contaminantes pode alterar as respostas destes biomarcadores. Scott & Hodson (2008) analisaram o efeito do co-tratamento da truta *Oncorhynchus mykiss* com o inibidor de CYP1A  $\alpha$ -naftoflavona (ANF) e o PAH reteno. Os resultados demonstraram que este tipo de mistura pode alterar a resposta de CYP frente ao indutor reteno, de acordo com a concentração de ANF. Outro trabalho, já comentado anteriormente, demonstrou a relação da atividade AChE e o metabolismo de biotransformação de fase I frente a organofosforados (HAMM, WILSON & HINTON, 2001). Sabendo que o

ambiente aquático pode possuir uma vasta diversidade de contaminantes, a existência de compostos indutores e inibidores para um mesmo biomarcador é possível, o que pode trazer conclusões errôneas em trabalhos ecotoxicológicos.

Assim, os marcadores de estresse oxidativo podem auxiliar estudos de monitoramento ambiental, no intuito de demonstrar o estado redox celular. Apesar deste estado não ser modulado especificamente por uma classe de contaminantes, ele pode fornecer inúmeras informações, servindo de ferramenta complementar, mas necessária, em trabalhos de biomonitoramento ambiental.

#### *Análise dos ecossistemas catarinenses.*

A partir desse estudo, pode-se concluir que as águas dos rios Cubatão e do Braço demonstraram um potencial oxidativo a tilápias do Nilo expostas por 7 dias às suas águas. Aparentemente, a presença dos diferentes tipos de indústrias pode estar vinculada com a contaminação ambiental da região, principalmente com liberação de metais e compostos orgânicos. Existem também evidências de que o cultivo de arroz na região próxima do Rio Cubatão possa estar utilizando pesticidas organofosforados, que acabam entrando em contato com a água. Desta forma, faz-se necessário um forte projeto ambiental na região, visando restabelecer a qualidade da água deste importante complexo hídrico da Baía da Babitonga, em Joinville.

Já com relação à Baía Norte de Florianópolis, apesar dos indícios de contaminação que vários trabalhos vêm demonstrando, os parâmetros analisados por este trabalho não resultaram conclusões afirmativas para este aspecto. Porém, os dados de altos níveis de coliformes no Ribeirão indicam que o ponto referência utilizado por este estudo não é o mais apropriado. Novas análises bioquímicas serão realizadas nas amostras das ostras expostas às águas da baía, a fim de comparar com os resultados inconclusivos obtidos até então.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-126. 1984.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Anguilla anguilla L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**, v.65, n.6, Nov, p.952-962. 2006.
- AHMED, M.; ROCHA, J. B.; MAZZANTI, C. M.; MORSCH, A. L.; CARGNELUTTI, D.; CORREA, M.; LORO, V.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Malathion, carbofuran and paraquat inhibit Bungarus sindanus (krait) venom acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase in vitro. **Ecotoxycol**, v.16, n.4, p.363-369. 2007.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v.77, p.373-382. 1981.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C.; LOUREIRO, A. P.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.71, n.2, p.270-275. 2003.
- ALMROTH, B. C.; ALBERTSSON, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.70, n.3, p.370-378. 2008.
- AL-RIFAI, J. H.; GABELISH, C. L.; SCHÄFER, A. I. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. **Chemosphere**, v.69, n.5, p.803-815. 2007.
- ALVES, S. R. C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC.** Dissertação mestrado, PPG Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Florianópolis, SC. 2003.
- AZEVEDO, D. A.; GONÇALVES, M. L.; SILVA, D. B. Organic geochemistry of the Angra dos Reis marine sediments: Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ Forensis**, v.8, n.3, p.245-256. 2007.

- BANDO, I.; REUS, M. I.; ANDRES, D.; CASCALES, M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. **J Biochem Mol Toxicol**, v.19, n.3, p.154-161. 2005.
- BAINY, A. C. D.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. **Aquat Toxicol**, v.44, n.4, p.289-305. 1999.
- BAINY, A. C.; ALMEIDA, E. A.; MÜLLER, I. C.; VENTURA, E. C.; MEDEIROS, I. D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Mar Environ Res**, v.50, n.1-5, p.411-416. 2000.
- BENATO, V. S.; SCUSSEL, V. M. **Produtos químicos descartados no mar de Florianópolis e pesquisa de metais pesados em tecido muscular de tainhota e parati (Gênero Mugil)**. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Agrárias, UFSC. Florianópolis, SC. 1999.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6. p.1340-1344. 2006.
- BEYER, J; SANDVIK, M; HYLLAND, K, , FJELD, E.; EGAAS, E.;AAS, E.; SKÅRE, J. U.; GOKSØYR A. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. **Aquat Toxicol**, v.36, n.1-2, p.75-98. 1996.
- BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*) Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors **FEBS Letters** , v.407, n.3, p.261-266. 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, n.1, p.248-54. 1976.
- BRÜSCHWEILER, B. J.; WÜRGLER, F. E.; FENT, K. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.31, n.4, p.475-482. 1996.
- BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of Cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit Rev Env Sci Tec**, v.25, n.3, p.201-268. 1995.

- CAMPANELLA, L.; LELO, D.; MARTINI, E.; TOMASSETTI, M. Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase+choline oxidase opee and application to natural waters. **Anal Chim Acta**, vol.587, n.1, p.22-32. 2007.
- CARBALLAL, S.; , RADI, R.; KIRK, M. C.; BARNES, S.; FREEMAN, B. A.; ALVAREZ, B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyntirite. **Biochemistry**, v.42, p.9906-9914. 2003.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-490. 1985.
- CARMONA, G. M.; JURGENSEN, A.; MORAES, J. S.; CORREA, L. A. G. **Relatório sobre a concentração dos poluentes do ecossistema aquático na Bacia da Babitonga - Canal do Linguado**. FATMA, Florianópolis. 1985.
- CASAN, COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. **Resumo do Diagnóstico do Esgotamento Sanitário de Florianópolis, 2007**. (<http://www.casan.com.br/docs/Diagnostico%20Esgoto%202007.pdf>) acessado em 10/06/2008.
- CASAN, COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. **Relatório CT/D – 0769, encaminhada pelo Diretor Regional da Região Metropolitana da Grande Florianópolis ao Coordenado do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, UFSC**. Florianópolis, 23 de maio de 2008. 06 p.
- CELANDER, M.; RONIS, M; FÖRLIN, L. Initial characterization of a constitutive cytochrome P-450 isoenzyme in rainbow trout liver. **Mar Environ Res**, v.28, n.1, p.9-13. 1989.
- CERUTTI, R. L.; BARBOSA, T. C. P. **Contribuição ao conhecimento da poluição doméstica na Baía Norte, área da Grande Florianópolis, SC**. Dissertação de mestrado, PPG Geografia, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, UFSC. Florianópolis, SC. 1996.
- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Mar Pollut Bull**, v.44, n.1, p.7-15. 2002.
- CHOWDHURY, M. J.; PANE, E. F.; WOOD, C. M. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, vol.139, n.1-3, p.163-173. 2004.

- CLAUDINO, A. **Determinação de íons de metais traço (Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) por voltametria de redissolução em água do mar da baía norte da Grande Florianópolis.** Dissertação de Mestrado, PPG Química, UFSC. Florianópolis,SC. 2003.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol Aspects Med**, v.22, n. 4-5, p.217-246. 2001.
- COUCEIRO, S. R.; FORSBERG, B. R.; HAMADA, N.; FERREIRA, R. L. Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. **Braz J Biol**, v.66, n.1A, p.35-44. 2006.
- DA SILVA, T. F.; AZEVEDO, D. D.; NETO, F. R. D. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **J Brazil Chem Soc**, v.18, n.3, p.628-637. 2007.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radic Biol Med**, v.32, n.11, p.1102-1115. 2002.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v.186, p.421-431. 1990.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v.82, n.1, p.47-95. 2002.
- DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z. I.; KNOWLER, D. J.; LEVEQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A. H.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J., SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biol Rev**, v.81, n.2, p.163-182. 2006.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v.82, n.1, p.70-77. 1959.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; JR.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v.7, p.88-95. 1961.

FATMA, FUNDAÇÃO DE AMPARO AO MEIO AMBIENTE: SC. **Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo Hídrico da Baía da Babitonga**. Florianópolis: FATMA/GTZ, v.1. 2003. 168 p.

FATMA, FUNDAÇÃO DE AMPARO AO MEIO AMBIENTE: SC. **Balneabilidade do Litoral Catarinense: Relatório nº 2, Data 15/12/2006**. ([http://www.fatma.sc.gov.br/servico/arqpdf2006/Relatorio2006\\_2007\\_02.pdf](http://www.fatma.sc.gov.br/servico/arqpdf2006/Relatorio2006_2007_02.pdf)) acessado em 30/10/2007.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v.205, n.3, p.223-240. 2004.

FERNANDES, C.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; SALGADO, M. A. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.66, n.3, p.426-431. 2007.

FOSTER, S. S.; CHILTON, P. J. Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.358, n.1440, p.1957-1972. 2003.

FRISCH, A.; ANDERSON, T. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.140, n.3, p.317-327. 2005.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environ Toxicol Chem**, v.20, n.1, p.37-45. 2001.

FUNES, V.; ALHAMA, J.; NAVAS, J. I.; LOPEZ-BAREA, J.; PEINADO, J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. **Environ Poll**, v.139, n.2, p.214-223. 2006.

GAGNON, A.; JUMARIE, C.; HONTELA, A. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat Toxicol**, v.78, n.1, p.59-65. 2006.

GAVILÁN, J. F.; BARRA, R.; FOSSI, M. C.; CASINI, S.; SALINAS, G.; PARRA, O.; FOCARDI, S. Biochemical Biomarkers in Fish from Different River Systems Reflect Exposure to a Variety of Anthropogenic Stressors. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.66, n.1, p.476-483. 2001.

- GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Anal Biochem**, v.304, n.1, p.42-46. 2002.
- GIODA, C. R.; LISSNER, L. A.; PRETTO, A.; DA ROCHA, J. B.; SCHETINGER, M. R.; NETO, J. R.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, v.69, n.1, p.170-175. 2007.
- GLOCK, G. E.; MC, L. P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem J**, v.55, n.3, p.400-408. 1953.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v.77, p.218-31. 1981.
- HAHN, M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chem Biol Interact**, v.141, n.1-2, p.131-160. 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.
- HAMM, J. T.; WILSON, B. W.; HINTON, D. E. Increasing Uptake and Bioactivation with Development Positively Modulate Diazinon Toxicity in Early Life Stage Medaka (*Oryzias latipes*). **Toxicol Sci**, v.61, n.1, p.304–313. 2001.
- HANIGANM M. H. gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. **Chemico Biol Interact**, v. 111–112, n.334, p.333–342. 1998.
- HANSSON, T.; SCHIEDEK, D.; LEHTONEN, K. K.; VUORINEN, P. J.; LIEWENBORG, B.; NOAKSSON, E.; TJÄRNLUND, U.; HANSON, M.; BALK, L. Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). **Mar Pollut Bull**, v.53, n.8-9, p.451-468. 2006.
- HEDOUIN, L.; METIAN, M.; TEYSSIE, J. L.; FOWLER, S. W.; FICHEZ, R.; WARNAU, M. Allometric relationships in the bioconcentration of heavy metals by the edible tropical clam *Gafrarium tumidum*. **Sci Total Environ**, v.366, n.1, p.154-163. 2006.
- IWATA, H.; YOSHINARI, K.; NEGISHI, M.; STEGEMAN, J. J. Species-specific responses of constitutively active receptor (CAR)-CYP2B coupling: lack of CYP2B inducer-responsive

nuclear translocation of CAR in marine teleost, scup (*Stenotomus chrysops*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.131, n.4, p.501-510. 2002.

KLOEPPER-SAMS, P. J.; PARK, S. S.; GELBOIN, H. V.; STEGEMAN, J. J. Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. **Arch Biochem Biophys**, v.253, n.1, p.268-278. 1987.

KLOTZ, A. V.; STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SNOWBERGER, E. A.; THOMAS, P. E.; WALSH, C. Cytochrome P-450 isozymes from the marine teleost *Stenotomus chrysops*: their roles in steroid hydroxylation and the influence of cytochrome b5. **Arch Biochem Biophys**, v.249, n.2, p.326-338. 1986.

LANDMAN, M. J.; VAN DEN HEUVEL, M. R.; FINLEY, M.; BANNON, H. J.; LING, N. 2005. Combined effects of pulp and paper effluent, dehydroabietic acid, and hypoxia on swimming performance, metabolism, and hematology of rainbow trout. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.65, n.3, p.314-322. 2006.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Mar Pollut Bull**, v.50, n.7, p.705-723. 2005.

LI, D.; YANG, X. L.; ZHANG, S. J.; LIN, M.; YU, W. J.; HU, K. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.147, n.1, p.17-29. 2008.

LIMA, P. L.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, T. B.; WILHELM FILHO, D. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.50, n.1, p.23-30. 2006.

MACHALA, M.; PETRIVALSKI, M.; NEZVEDA, K.; ULRICH, R.; DUSEK, L.; PIAKA, V.; SVODOBOVÁ, Z.; Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants: A field study. **Environ Toxicol Chem**, v.16, n.7, p.1410-1419. 1997.

MARACINE, M.; SEGNER, H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.120, n.1, p.83-88. 1999.

- MARTINEZ-ALVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Rev Fish Biol Fisher**, v.15, n.1-2, p.75-88. 2005.
- MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL, F. A.; MADUREIRA, L. A. S. Assessment of lipid compounds and phosphorus in mangrove sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **J Brazil Chem Soc**, v.15, n.5, p.725-734. 2004.
- MEISTER, A.; TATE, S.S.; GRIFFITH, O.W. Gamma-glutamyl transpeptidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.237-253. 1981.
- MEYBECK, M. Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.358, n.1440, p.1935-1955. 2003.
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutat Res**, v.552, n.1-2, p.247-268. 2004.
- MOSIALOU, E. **Microsomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress**. Dissertação de Pós-Doutorado, Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology. Estocolomo, Suécia. 1993.
- PARK, S. S.; MILLER, H.; KLOTZ, A. V.; KLOPPER-SAMS, P. J.; STEGEMAN, J. J.; GELBOIN, H. V. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P-450E of the marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P-450. **Arch Biochem Biophys**, v.249, n.2, p.339-350. 1986.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. **Chemosphere** v.47, n.5, p.485-497. 2002.
- PEREZ, M. J.; MACIAS, R. I.; DURAN, C.; MONTE, M. J.; GONZALEZ-BUITRAGO, J. M.; MARIN, J. J. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. **J Hepatol**, v.43, n.2, p.324-332. 2005.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS. **Informações Sócio-Econômicas: Indicadores de Desenvolvimento e de Qualidade de Vida em Florianópolis.** ([http://www.pmf.sc.gov.br/index.php?link=informacoes\\_socio\\_economicas&sublink=qualidade\\_vida](http://www.pmf.sc.gov.br/index.php?link=informacoes_socio_economicas&sublink=qualidade_vida)), acessado em 30/10/07.

- RAMAKRISHNAN, S.; RAJESH, M.; SULOCHANA, K. N. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. **Indian J Ophthalmol**, v.55, n.2, p.95-102. 2007.
- REGOLI, F.; GORBI, S.; FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; WINSTON, G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Mar Environ Res**, v.54, n.3-5, p.419-423. 2002.
- REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.146, n.1-2, p.22-53. 2007.
- RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; PEINADO, J.; PUEYO, C.; LÓPEZ-BAREA, J.; Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. **Canadian J Fisher Aquat Sci** 50, n.12, p.2568-2573. 1993.
- SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v.30, n.11, p.1191-1212. 2001.
- SCOTT, J. A.; HODSON, P. V. Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and  $\alpha$ -naphthoflavone. **Aquat Toxicol**, 2008. in Press Doi: [doi:10.1016/j.aquatox.2008.04.007](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.007)
- SCOTTO, G.; CARVALHO, I. C. D. M.; GUIMARÃES, L. B. **Desenvolvimento Sustentável**. Petrópolis: Vozes, v.1. 2007. 107 p.
- SHAH, S. L. Hematological parameters in tench *Tinca tinca* after short term exposure to lead. **J Appl Toxicol**, v.26, n.3, p.223-228. 2006.
- SIES, H.; MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, v.84, n.2, p.377-383. 1978.
- SILVA, F. J. B.; SCHEIBE, L. F. **Unidades de conservação e desenvolvimento regional: um estudo sobre a região da Baía da Babitonga-SC**. Dissertação mestrado Centro de Filosofia e Ciências Humanas, UFSC. Florianópolis, SC. 1995.
- SLEKAR, K. H.; KOSMAN, D. J.; CULOTTA, V. C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **J Biol Chem**, v. 271, n. 46, p.28831-28836. 1996

- STEGEMAN, J. J.; RENTON, K. W.; WOODIN, B. R.; ZHANG, Y. S.; ADDISON, R. F. Experimental and Environmental Induction of Cytochrome-P450E in Fish from Bermuda Waters. **J Exp Mar Biol Ecol**, v.138, n.1-2, p.49-67. 1990.
- STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ Health Perspect**, v.90, p.101-109. 1991.
- STONE, J. R.; COLLINS, T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. **Endothelium**, v.9, n.4, p.231-238. 2002.
- STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; FÖRLIN, L. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.70, n.3, p.446-452. 2008.
- SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, R.; BEDNARSKA, A.; KAFEL, A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. **Chemosphere**, v.65, n.6, p.963-974. 2006.
- TATEISHI, N.; HIGASHI, T.; NARUSE, A.; NAKASHIMA, K.; SHIOZAKI, H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. **J Nutr**, v.107, n.1, p.51-60. 1977.
- TENTORI, L.; SALVATI, A. M. Hemoglobinometry in human blood. **Methods Enzymol**, v.76, p.707-715. 1981.
- TERZIĆ, S.; SENTA, I.; AHEL, M.; GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELO, D.; MÜLLER, J.; KNEPPER, T.; MARTÍ, I.; VENTURA, F.; JOVANČIĆ, P.; JABUČAR, D. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. **Sci Total Environ**, v.25, n.1-3, p.66-77. 2008.
- TORRES, M. A.; TESTA, C. P.; GASPARI, C.; MASUTTI, M. B.; PANITZ, C. M. N.; CURIPEDROSA, R.; DE ALMEIDA, E. A.; DI MASCIO, P.; WILHELM, D. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar Poll Bull**, v.44, n.9, p.923-932. 2002.
- UNIVILLE, UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE. **Projeto canal do Linguado: Estudos da Biota Marinha e Química Ambiental da Baía da Babitonga**. Pró-Reitoria de Extensão e Assuntos Comunitários, 368p. 2004.

- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.13, n.2, p.57-149. 2003.
- VIEIRA, G.; CARVALHO PINTO, C. R. S.; MATIAS, W. G. **Avaliação toxicológica e bacteriológica de locais utilizados para maricultura**. In: Livro de Resumos X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, p.163. Bento Gonçalves, Brasil. 2008.
- VODICNIK, M. J.; ELCOMBE, C. R.; LECH, J. J. The effect of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.59, n.2, p.364-374. 1981.
- WEISBROD, A. V.; BURKHARD, L. P.; ARNOT, J.; MEKENYAN, O.; HOWARD, P. H.; RUSSOM, C.; BOETHLING, R.; SAKURATANI, Y.; TRAAS, T.; BRIDGES, T.; LUTZ, C.; BONNELL, M.; WOODBURN, K.; PARKERTON, T. Workgroup report: review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances. **Environ Health Perspect**, v.115, n.2, p.255-261. 2007.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-333. 1981.
- WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquat Toxicol**, v.19, n.2, p.137-161. 1991.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization. v.222. 2001. 238 p.
- YANEZ-ARANCIBIA, A.; DAY, J. W. The Gulf of Mexico: towards an integration of coastal management with large marine ecosystem management. **Ocean Coast Manage**, v.47, n.11-12, p.537-563. 2004.
- YU, B. P. Cellular Defenses against Damage from Reactive Oxygen Species. **Physiol Rev**, v.74, n.1, p.139-162. 1994.
- ZANETTE, J.; NUNES, F. F.; MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; MATTOS, J. J.; LÜCHMANN, K. H.; MELO, C. M.; BAINY, A. C. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Mar Environ Res**, v.66, n.1, p.196-198. 2008.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v.55, n.2, p.167-174. 2004.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; GRASSI, P.; FANELLI, R. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. **Water Res**, v.42, n.4-5, p.961-968. 2008.