



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

**USO DE LAMBARIS (*Astyanax* sp.) COMO BIOINDICADORES
DE
CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA NO RIO VACACAÍ – RS,
BRASIL: RESPOSTAS BIOQUÍMICAS COMO FERRAMENTAS DE
BIOMONITORAMENTO**

TCC

DENNIS GUILHERME DA COSTA SILVA

São Gabriel

2013

Dennis Guilherme da Costa Silva

**USO DE LAMBARIS (*Astyanax* sp.) COMO BIOINDICADORES DE
CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA NO RIO VACACAÍ – RS, BRASIL: RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS COMO FERRAMENTAS DE BIOMONITORAMENTO**

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

Orientador: Jeferson Luis Franco

São Gabriel

2013

Dennis Guilherme da Costa Silva

**USO DE LAMBARIS (*Astyanax* sp.) COMO BIOINDICADORES DE
CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA NO RIO VACACAÍ – RS,
BRASIL: RESPOSTAS BIOQUÍMICAS COMO FERRAMENTAS DE
BIOMONITORAMENTO**

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

Apresentado e aprovado em: 18/10/2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
(Orientador)
UNIPAMPA

Prof. Dra. Thaís Posser
(UNIPAMPA)

Msc. Ana Paula Zemolin
UFSM

SILVA, Dennis Guilherme da Costa

Uso de Lambaris (*Astyanax* sp.) como Bioindicadores de Contaminação Aquática no Rio Vacacaí – RS, Brasil: Respostas Bioquímicas como Ferramentas de Biomonitoramento / Dennis Guilherme da Costa Silva. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2013.

[VII], [38] f.:12 il.; 30 cm.

Orientador: Jeferson Luis Franco

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

Referências: f. 34-38.

1. Bioquímica. 2. Biomarcadores. 3. Ecotoxicologia. 4. Biomonitoramento. 5. Ecossistema Aquático. 6. Ciências Biológicas – Monografia I. Franco, Jeferson Luis Franco. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título. Uso de Lambaris (*Astyanax* sp.) como Bioindicadores de Contaminação Aquática no Rio Vacacaí – RS, Brasil: Respostas Bioquímicas como Ferramentas de Biomonitoramento

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo o apoio e pela oportunidade de estudar em especial as minhas irmãs que sempre me apoiaram a voltar aos estudos e não mediram esforços nestes anos de curso.

Agradeço a Prof. Dr. Jeferson Franco por todo o conhecimento e apoio para o desenvolvimento desse projeto, espero no futuro ter um pouco da sua humildade e sabedoria, afinal o senhor é um grande pesquisador e pessoa, obrigado por tudo Professor, pois sem o seu apoio e chamadas certamente eu não chegaria ao fim desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Thaís Posser pelos conselhos e ensinamentos dentro do desenvolvimento deste trabalho, com total disposição para ajudar nos experimentos e dúvidas teóricas.

Aos meus colegas de laboratório, Mauro que tanto fez parte deste trabalho, sendo meu braço direito e ao meu lado molhando as canelas nas águas frias do rio, preparação e desenvolvimento do experimento. Também meu agradecimento à Ana Paula Zemolin pela sua paciência em ensinar e sempre disposta a ajudar nos experimentos e aos demais colegas de laboratório, Nathane, Jéssica e Litele, meu muito obrigado por tudo e pelo coleguismo dentro do grupo de pesquisa.

Aos meus colegas de classe Fabiano, Cristian, Danielle, Veridiana e Juliana por muito me ajudarem a não desistir e pelo companheirismo em muitas horas, obrigado queridos colegas.

À banca examinadora desta monografia e contribuição.

Agradeço por fim a UNIPAMPA pela possibilidade de realização deste curso, e ainda a PBDA pela bolsa de iniciação científica e pelos recursos financeiros concedidos.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo crescente contaminação oriunda de atividades agrícolas, industriais e urbanas, comprometendo a qualidade da água e a preservação da biota aquática. A mensuração desta contaminação através de biomarcadores bioquímicos em peixes pode fornecer dados confiáveis para a estimativa de efeitos subletais em ambientes contaminados. Peixes do gênero *Astyanax sp* foram coletados de três pontos distintos do rio Vacacai São Gabriel – RS, imediatamente após a coleta os tecido muscular foi processado para determinação de atividades enzimáticas(acetilcolinesterase, catalase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase, glutathione redutase) e níveis de tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH) por espectrofotometria. O tecido cerebral foi processado para determinação de níveis de expressão Nrf2, NQO-1, MT1 e GPX4. Os resultados demonstraram indícios de contaminação ambiental com a indução de defesas antioxidantes CAT, SOD GST e GPX e inibição de níveis de tióis não proteicos NPSH, atividade enzimática GR e AchE e a indução na expressão Nrf2 ,NQO-1, MT1e GPX4. Concluímos que os parâmetros de estresse oxidativo podem ser importantes ferramentas preventivas e complementares em biomonitoramento da qualidade ambiental e preservação de ecossistemas aquáticos, junto a outros biomarcadores clássicos, auxiliando nos estudos de danos a organismos aquáticos.

Palavras - chave: biomarcadores, *Astyanax*, qualidade ambiental, biomonitoramento, contaminação aquática.

ABSTRACT

The aquatic ecosystems are suffering increasing contamination coming from agricultural, industrial and urban activities, compromising water quality and preservation of aquatic biota. The measurement of this contamination through biochemical biomarkers in fishes can provide reliable data to estimate sublethal effects in contaminated environments. Fish of the *Astyanax sp* genus were collected from three different points of the Vacacaí River of São Gabriel-RS, immediately after collection the muscle tissue was processed for determination of enzyme activities (acetylcholinesterase, catalase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, glutathione reductase) and levels of protein thiols (PSH) and non-protein (NPSH) by spectrophotometry. The brain tissue was processed for determination of expression levels of Nrf2, NQO-1, MT1 and GPx4. The results showed signs of environmental contamination with the induction of antioxidant defenses CAT, SOD, GST and GPX and inhibition levels of no protein thiols NPSH, GR and AchE enzyme activity and induction in Nrf2, NQO-1, GPx4 and MT1 expression. It was concluded that the parameters of oxidative stress may be important preventive and complementary tools on biomonitoring of environmental quality and preservation of aquatic ecosystems, with other classics biomarkers, helping on studies of damages to aquatic organisms.

Key-words: biomarkers, *Astyanax*, *environmental quality*, *biomonitoring*, *aquatic contamination*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
<i>Abstract</i>	VII
SUMÁRIO.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Contaminação de Ecossistemas Aquáticos.....	9
1.2. Ecotoxicologia.....	10
1.3. Biomarcadores de Contaminação Aquática.....	11
1.4. Estudo de Campo.....	15
1.5. Peixes como Bioindicadores.....	15
1.6. Gênero <i>Astyanax</i>	16
1.7. Área de Estudo.....	16
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Preparação das Amostras.....	22
3.2. QUÍMICOS UTILIZADOS.....	22
3.3. Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase.....	23
3.4. Determinação de Tióis Proteicos (PSH) e não Proteicos (NPSH).....	23
3.5. Determinação de Atividades Enzimáticas Antioxidantes	23
3.6. Western Blot.....	24
3.7. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação de Ecossistemas Aquáticos

A poluição ambiental aquática é um crescente problema sendo que a introdução de compostos químicos oriundos de atividades agrícolas, industriais e urbanas em ambientes aquáticos, além de causar danos ambientais imediatos aos organismos, pode levar a alterações sistêmicas com a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de aquíferos pela infiltração de contaminantes no solo. Assim a comunidade aquática, bem como as comunidades que fazem uso dos recursos hídricos podem ser expostas e sofrer efeitos de contaminação crônica (THOMPSON; LANGTON; HART, 1995).

A bacia do Vacacaí-Vacacaí Mirim que está localizada na porção centro-ocidental do Estado, possuindo uma área de 11.077,34 km² (SEMA RS) vem enfrentando sérios problemas de contaminação de seus recursos hídricos. Sendo destaque, efluentes domésticos e pesticidas pelo escoamento superficial em áreas cultivadas. O manejo inadequado de efluentes urbanos e a crescente utilização de agroquímicos nas monoculturas, principalmente de soja e arroz (VERDUM et al., 2006), são as principais causas dos problemas ambientais nas bacias hidrográficas do bioma Pampa.

A utilização de agroquímicos nos mais diversos ramos de atividades constitui hoje uma realidade presente não somente nos países desenvolvidos, mas pode ser identificada praticamente em todos os países do mundo (ALVES FILHO, 2004), sendo que agroquímicos aplicados em excesso ou incorretamente, devido a grande distribuição e natureza tóxica, podem impactar o ecossistema aquático e exercer efeitos adversos em organismos associados (BOWMER, 1987). Segundo (RATTNER et al., 2009), a poluição de rios, lagos, zonas costeiras e baías tem causado degradação ambiental contínua por despejo de volumes crescentes de resíduos e dejetos industriais e orgânicos.

O lançamento de esgotos não tratados aumentou dramaticamente nas últimas décadas, com impactos eutróficos e distintos contaminantes encontrados em efluentes domésticos. Efluentes urbanos podem possuir uma grande variedade de

poluentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), bifenis policlorados (PCB), pesticidas organoclorados, organofosforados, metais pesados e outros produtos químicos orgânicos (MARINEZ-ALVAREZ, MORALES & SANZ, 2005). Desta forma, torna o estudo de risco ecotoxicológico complexo, pois muitos destes contaminantes podem sofrer interações sinérgicas ou antagônicas no ambiente.

1.2. Ecotoxicologia

O termo ecotoxicologia foi proposto pela primeira vez em 1969, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977) segundo este autor, a ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismo vivem num contexto integrado (PLAA 1982, CAIRNS & NIEDERLEHNER 1995).

A ecotoxicologia é uma ferramenta de avaliação de danos ambientais e prevenção de impactos futuros, também é utilizada na avaliação de produtos químicos comercializados ou na avaliação de efluentes despejados em um corpo hídrico receptor. Com isso, a ecotoxicologia surgiu como uma ciência nova envolvendo boa compreensão de noções básicas de ecologia, biologia de organismos, limnologia, química ambiental, bioquímica, fisiologia, aspectos comportamentais dentre outros, tornando esta ciência multidisciplinar reconhecida mundialmente no âmbito de avaliação no auxílio e prevenção de estudos de impacto ambiental.

Esta ciência ambiental tem como desafio identificar princípios comuns que possam permitir a extrapolação, a segura predição dos efeitos de contaminantes no ambiente, sendo que na grande maioria de poluentes seus danos são visíveis somente há longo prazo. Os testes de ecotoxicidade permitem avaliar a contaminação ambiental de diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, fármacos e produtos químicos em

geral, assim como, avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (MARCHNER 1999, LOMBARDI 2004).

Dentre as abordagens metodológicas na avaliação ecotoxicológica nos últimos anos vem se desenvolvendo em crescente escala o estudo de avaliação de risco ecotoxicológico, o estudo de respostas a nível organismo com o emprego de biomarcadores de contaminação aquática. Sendo estes excelentes ferramentas de respostas adaptativas e preventivas em biomonitoramento de áreas impactadas, identificando efeitos subletais na biota aquática dando indícios de possíveis contaminações detectadas através de respostas biológicas significativas e ainda reversíveis para a preservação da biota aquática.

1.3. Biomarcadores de Contaminação Aquática

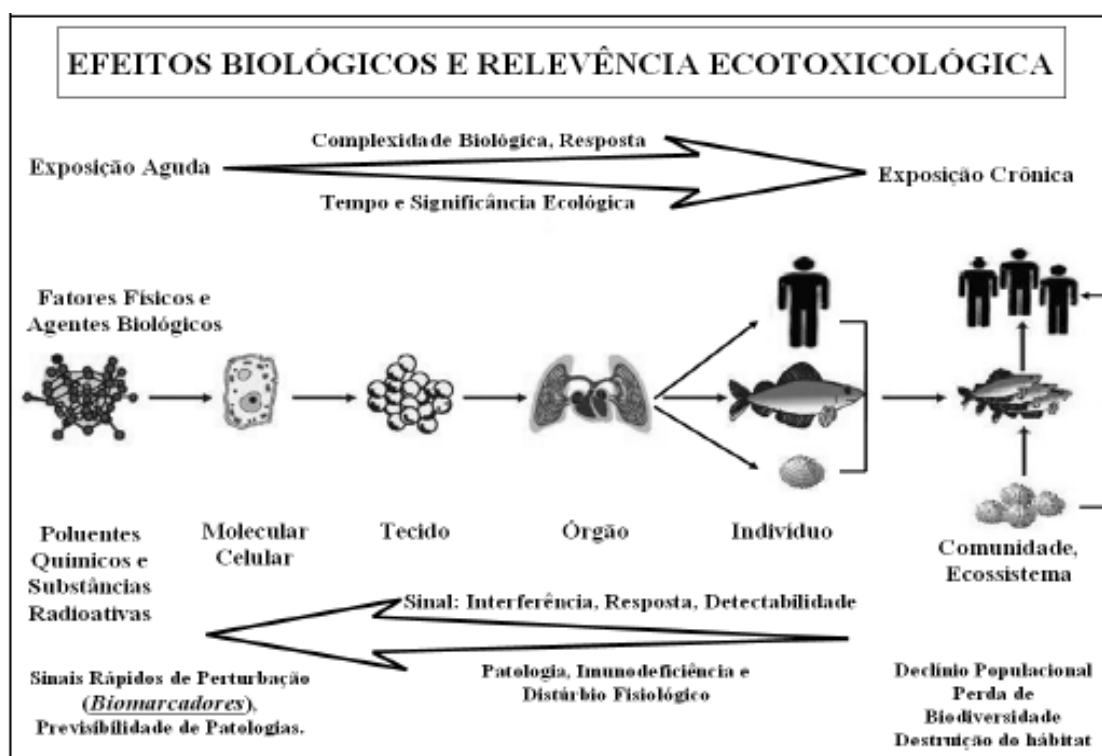
Devido à necessidade de respostas rápidas, medidas preventivas e compreensão de efeitos de contaminantes, a biota aquática, tem identificado biomarcadores, os quais traduzem uma resposta biológica, desde níveis molecular, celular, fisiológico até comportamental a exposição a xenobióticos liberados no meio ambiente.

A resposta biológica a agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares, passando por comunidades, populações, organismos, sistemas fisiológicos e células (WALAKER et al., 1997). Além disso, respostas biológicas como perda da biodiversidade, destruição do habitat, declínio populacional, acabam sendo consequências irreversíveis de contaminação (MOORE et al., 2004) como observado na **(FIG. 1)**.

Assim respostas iniciais de defesa a níveis moleculares e/ou celulares frente a contaminantes podem garantir uma compreensão mais rápida sobre o ecossistema, a fim de prever e evitar danos a níveis macroecológicos. Nesse contexto biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou

comportamentais (DEPLEDGE, 1993). Outros autores também ampliaram a definição e conseqüentemente o uso de biomarcadores como (LEONZIO & FOSSI, 1993), propuseram conceituar de biomarcadores ecotoxicológicos, como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou população, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou ainda a radiações.

FIGURA 1- Representação esquemática da sequencia 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 prejudicada 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.



Fonte: (Adaptado de MOORE et al. 2004).

Os contaminantes em contato com os sistemas hídricos afetam a vida aquática, especialmente os peixes, uma vez que estes atuam como organismos chave na cadeia alimentar. Um rio só é classificado como ambiente favorável a preservação

de biota aquática se possibilitar a sobrevivência e proliferação de peixes e que a qualidade da água do local permita a reprodução, alimentação e crescimento de larvas e juvenis (BRANCO, 1983). Porém a poluição dos rios normalmente ocorre em concentrações crônicas e subletais de poluentes, se identificando mais comumente alterações estruturais e funcionais nos peixes do que a mortalidade em massa dos organismos. Portanto, o uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais tem apresentado bons resultados na avaliação do efeito dos poluentes em peixes (WINKALER; MARTINEZ, 1999).

Os parâmetros de estresse oxidativo constituem outro grupo importante de biomarcadores, atendendo a diversos compostos tóxicos existentes no ambiente ou seus metabolitos podem exercer efeitos tóxicos neste domínio (WINSTON E DI GIULIO, 1991). Os sistemas de defesa que tendem a inibir a formação de oxirradicais incluem as enzimas antioxidantes, tal como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx) e a glutaiona-redutase (GR), cuja medição enzimática é utilizada frequentemente em estudos de ecotoxicologia. 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).

Entre as principais defesas não enzimáticas da célula esta o tripeptídeo glutathione (GSH). A GSH é composta por gamma-glutamil-citeinil-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, a superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que age sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ dismutando a H_2O_2 . Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a CAT e a GPx. A Catalase (CAT) tem como função dismutar H_2O_2 em H_2O e O_2 , e está localizada em maior abundância em peroxissomos. A glutathione redutase (GPx) está relacionada á função antioxidante da GSH com atividade peroxidásica contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (HALLIWILL & GUTTERIDGE, 2007).

Para evitar a depleção da GSH e aumento da glutathiona oxidada (GSSG), a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular.

Outros biomarcadores são atividades de expressão de fatores de transcrição Nrf2. No núcleo das células, o fator de transcrição Nrf2 se liga a elementos de resposta a antioxidantes (ARE) na região promotora dos genes que transcrevem varias enzimas antioxidantes endógenas como GST, GPX, GR, SOD, CAT e sistema tiorredoxina (TANITO et al., 2007; SCHULKE et al., 2012), como também estão relacionados com a regulação de enzimas responsáveis pela síntese de GSH, geradores de NAPH e de detoxificação eletrofílica (ITOH et al., 1999., CHAN et al., 2000).

A glutathiona S-transferase (GST) é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos ao tripeptídeo glutathiona GSH, reduzindo sua toxicidade. 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). Alterações nestas defesas podem estar relacionadas a diferentes classes de poluentes, diferenças de sensibilidade de espécies e a fatores ambientais e biológicos (WINSTON & DIGIULIO, 1991).

A acetilcolinesterase é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, presente nas fendas sinápticas durante a transmissão colinérgica. Esta enzima é inibida por dois grupos de pesticidas os organofosforados e os carbamatos, os quais se combinam covalentemente a resíduos de aminoácidos específicos para inativar a enzima (JUNG et al., 2007). De igual modo, a análise de determinados parâmetros neurotóxicos tem assumido uma particularidade clássica como biomarcadores de exposição a agroquímicos, sendo estes referidos como inibidores efetivos da enzima colinesterase (STURM et al., 2000).

As metalotioneínas (MTs) são proteínas primordialmente citosólicas de baixo peso molecular, caracterizadas por possuírem altos níveis de cisteína e ausência de aminoácidos aromáticos e histidina. A presença de tióis (SH) permite a estas proteínas se ligarem ao excesso de metais essenciais e a metais poluentes, protegendo assim organismos aquáticos a exposição de compostos inorgânicos.

A produção de metalotioneínas é induzida pelo aumento de entrada de metais na célula, o que torna estas proteínas biomarcadores específicos de exposição à contaminação de por metais (NICHOLSON & LAM 2005, VIARENGO et al., 2007).

1.4. Estudo de Campo

As principais vantagens de tais estudos referem-se à incorporação de exposições realistas, que vão determinar diretamente os efeitos observados, e a utilização de ambientes naturais, que evitam a necessidade de extrapolação dos resultados para o ecossistema (GRANEY et al., 1995). Os testes em campo são indicados para avaliação de compostos novos no ambiente natural, por exemplo, agrotóxicos (RAND, 1980).

No ambiente natural, devido à redução na persistência e biodisponibilidade, os efeitos da maioria das substâncias químicas possuem menor dano do que em laboratório, porém em algumas vezes se tornam mais tóxicas do que em condições laboratoriais (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

1.5. Peixes como Bioindicadores

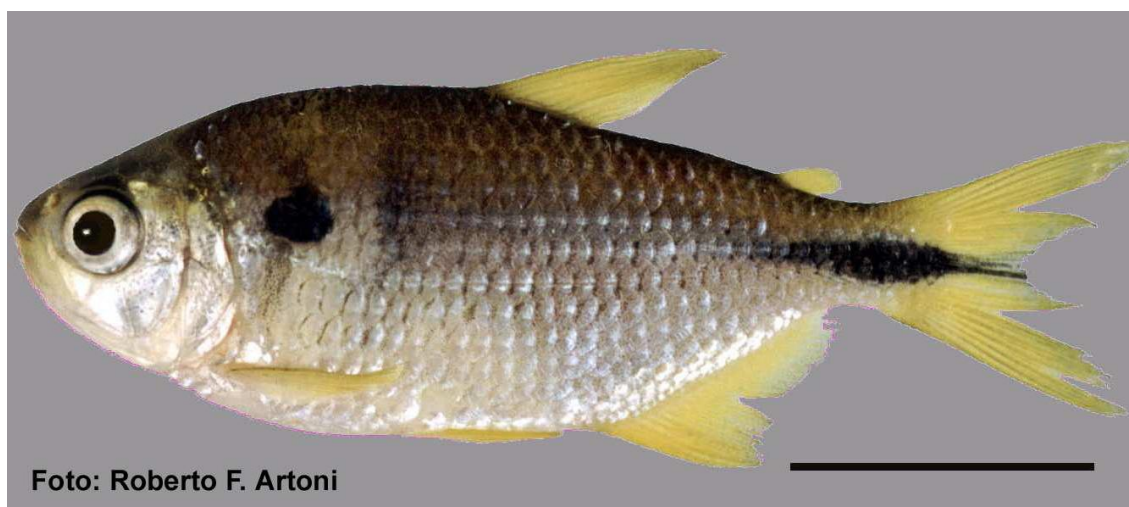
O termo bioindicador pode ser reconhecido como sendo de espécies sentinelas que são utilizadas como primeiros indicadores de danos ao ambiente (ADAMS, 2002). A utilização de peixes para o monitoramento ecotoxicológico se justifica pelo seu íntimo contato com o habitat, muitas espécies com seu ciclo de vida bem documentado, posição chave na cadeia trófica e importância no consumo humano (VIARENGO et al., 2007).

Estudos de campo com a utilização de espécies nativas dos rios de fácil obtenção e grande distribuição são ferramentas interessantes no diagnóstico de áreas impactadas, dentre este aspectos o gênero nativo como *Astyanax* vem sendo utilizado como bioindicadores em vários estudos de avaliação de impacto ambiental.

1.6. Gênero *Astyanax*

A ordem Characiformes é o grupo dominante dentre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a maior e mais complexa desta ordem (FOWLER, 1999). Nesta família estão peixes de hábitos alimentares muito diversificados (Herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). O gênero *Astyanax*, pertence à família Characidae, corresponde a maior unidade dos Tetragonopterinae, sob o ponto de vista sistemático e constitui um dos gêneros dominantes da América do Sul (EIGENNANN, 1921) (**FIG. 2**). Estes lambaris possuem importância para o consumo humano tendo um grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975), além disso, tem papel chave na ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos servindo de alimento para aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores.

FIGURA 2- Gênero *Astyanax*.



Fonte: RAMSDORF, 2007.

1.7. Área de Estudo

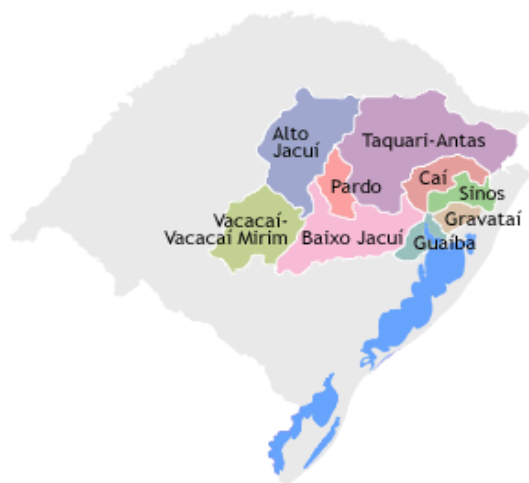
O bioma possui uma grande biodiversidade, uma vasta gama de espécies endêmicas (BEHLING et al., 2009) e uma grande riqueza em mananciais hídricos

de água doce vitais para o sustento de atividades agrícolas, industriais, abastecimento público e preservação da biodiversidade aquática (INSTITUTO IBAMA) entre elas a Região Hidrográfica do Guaíba situada na região nordeste do RS, abrangendo uma área de 84.763,54 Km² (**FIG. 3**). Formada pelo território parcial ou total de 251 municípios, com uma população de 5.869.265 habitantes. A bacia hidrográfica do Vacacaí-Vacacaí Mirim, pertencente à Região Hidrográfica do Guaíba está localizada na porção centro-ocidental do RS, possuindo uma área de 11.077,34 km² (**FIG. 4**). Os principais usos da água se destinam a irrigação, pecuária e abastecimento público. (SEMA 2001).

A bacia do Vacacaí-Vacacaí Mirim vem enfrentando sérios problemas de contaminação de seus recursos hídricos dando destaque para efluentes domésticos e pesticidas pelo escoamento superficial em áreas cultivadas. O manejo inadequado de efluentes urbanos e a crescente utilização de agroquímicos nas monoculturas, principalmente de soja e arroz (VERDUM et al., 2006).

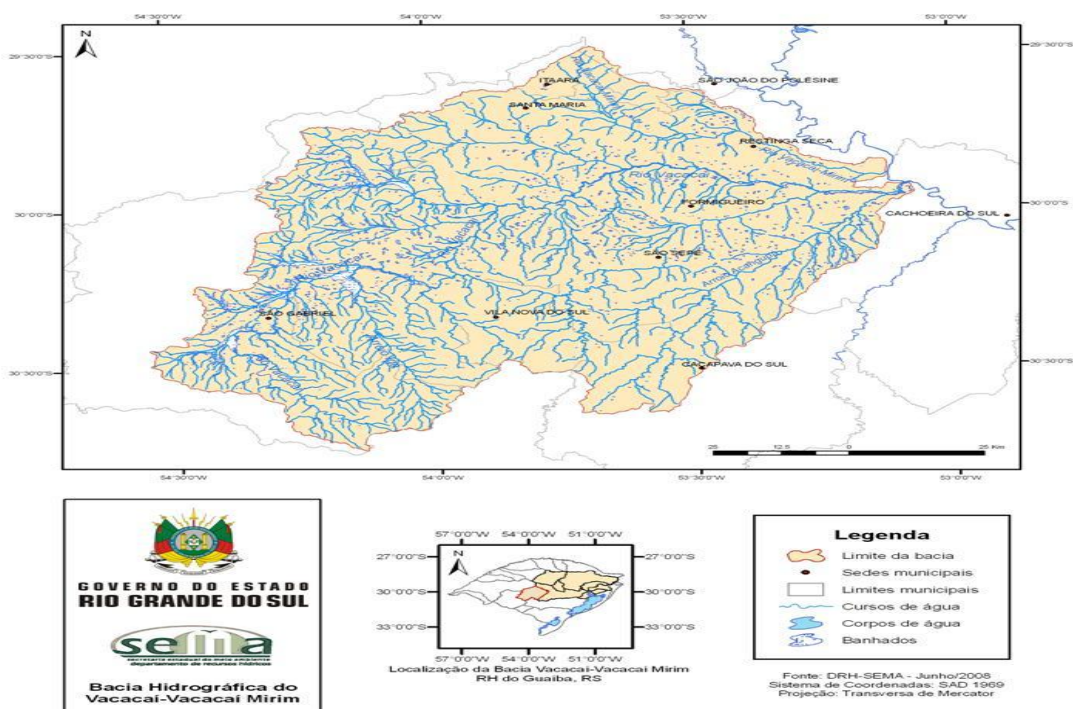
O rio Vacacaí nasce em São Gabriel, passando por Santa Maria até desembocar no delta do rio Jacuí. O solo é ocupado por latifúndios, com pecuária extensiva e agricultura. (FEPAM RS). O município de São Gabriel – RS tem como principais atividades economia a pecuária extensiva e o cultivo de monoculturas de arroz irrigado e soja, tendo como principal manancial para estas atividades e abastecimento público o rio Vacacaí. Dados sobre a qualidade da água deste recurso hídrico são escassos, tornando relevante os estudo de biomonitoramento e índices de preservação da biota aquática.

FIGURA 3 - Região Hidrográfica do Guaíba.



Fonte : SEMA RS

FIGURA 4 - Mapa da Bacia Hidrográfica do Rio Vacacaí- Vacacaí Mirim.

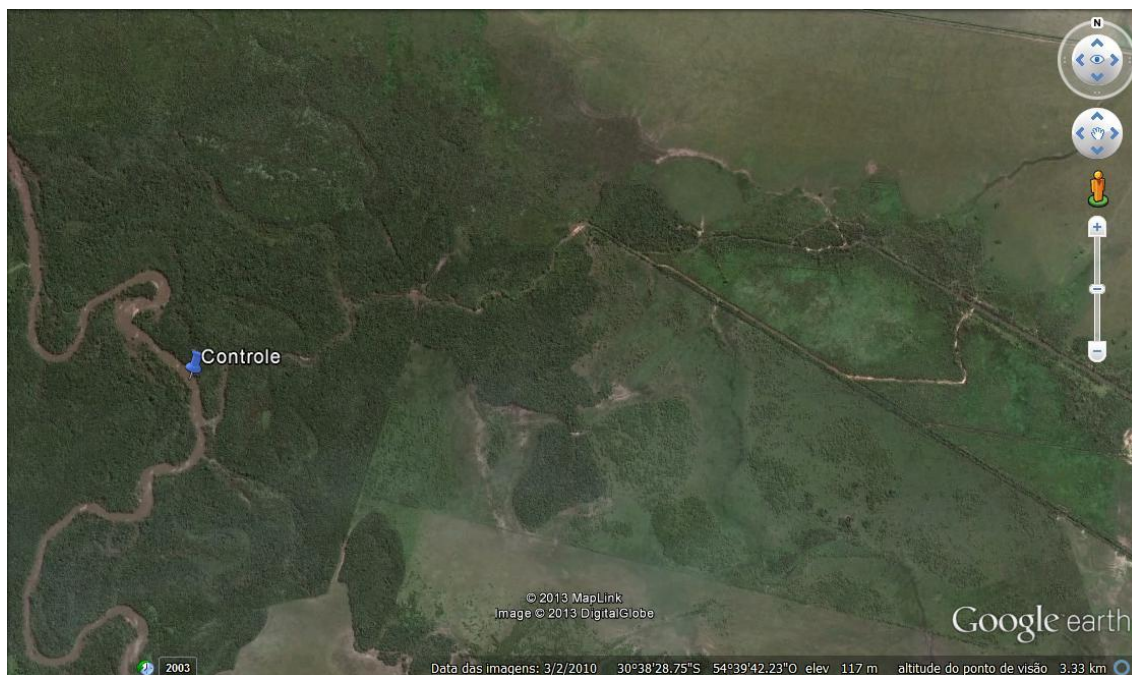


Fonte: SEMA – RS.

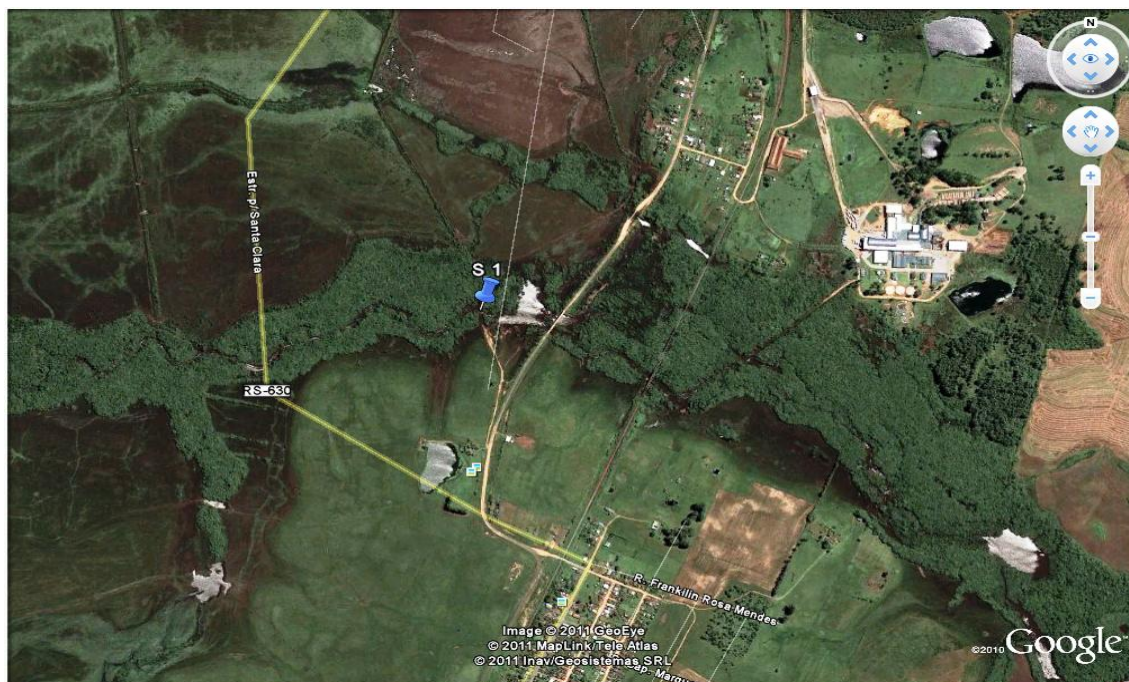
O experimento de campo foi feito em Janeiro e fevereiro de 2012. Os animais foram coletados em três pontos distintos: controle ($30^{\circ}38'32.93''\text{S}/ 54^{\circ}40'29.63''\text{O}$) (FIG. 4) S1 ($30^{\circ}22'35.45''\text{S}/54^{\circ}21'24.82''\text{O}$) (FIG. 5) e S2 ($30^{\circ}20'27.28''\text{S}/54^{\circ}18'19.96''\text{O}$), (FIG. 4), foi escolhido como local de referência. Para a realização do monitoramento destas localidades foram utilizados peixes do gênero *Astyanax*, a coleta dos animais foi realizada utilizando-se principalmente armadilhas artesanais.

O ponto S1 é caracterizado por moderada conservação da mata riparia, proximidade com o cultivo de monoculturas de soja, e razoável proximidade com a região urbana. O ponto S2 situado na região urbana do município caracterizado por fontes poluidoras como efluentes domésticos, descarga de resíduos sólidos nas margens do rio. O ponto controle (referência) apresenta significativa conservação da mata ciliar e baixa atividade antrópica nas proximidades do local de coleta.

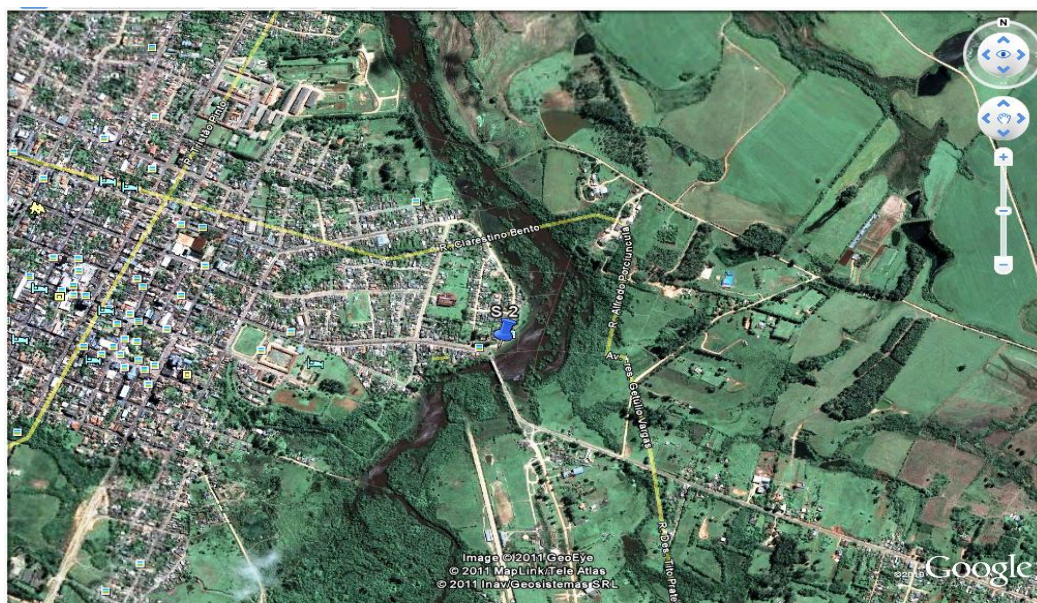
FIGURA 5 - Ponto Referência (controle) de coleta no rio Vacacaí.



Fonte : *Google Earth*

FIGURA 6 - Ponto S1 de coleta no rio Vacacaí.

Fonte : *Google Earth*.

FIGURA 7 - Ponto S2 de coleta no rio Vacacaí.

Fonte : *Google Earth*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e neurotoxicidade como biomarcadores de contaminação aquática na avaliação da qualidade ambiental do rio Vacacaí.

2.2 Objetivos Específicos

➤ Investigar biomarcadores de contaminação aquática no gênero *Astyanax*.

➤ Dosar biomarcadores clássicos como níveis de tióis proteicos e não proteicos, atividade de enzimas relacionadas: ao metabolismo da glutatona (glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase), à defesa contra peróxidos (catalase e glutathione peroxidase), sensíveis a organofosforados (acetilcolinesterase) e ao metabolismo de xenobióticos (glutathione S-transferase), além da expressão de proteínas marcadores de estresse oxidativo Nrf2, GPX4, NQO-1, e proteínas marcadores de presença de metais (MTs).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação das Amostras

Os animais foram capturados utilizando uma armadilha feita manualmente com malha plástica (1.0 x 1.0 cm). Após a coleta, os animais foram transportados para o laboratório em bombonas plásticas e transferidos para aquários com oxigenação constante, contendo a própria água do ponto de coleta. Após período de adaptação, os animais foram anestesiados em gelo e eutanaziados por ruptura cervical para a extração do cérebro e de parte do tecido muscular dos peixes. Em seguida, o tecido muscular foi homogeneizado em tampão HEPES 20mM, pH 7,0. O homogeneizado foi centrifugado a 1000g durante 5 minutos a 4°C, sendo uma parte do sobrenadante retirado para a determinação da atividade da enzima AChE, o restante do sobrenadante foi centrifugado a 20000 g por 30 minutos para determinação de enzimas antioxidante GPX, CAT, SOD e GST. A preparação do tecido cerebral para análise de expressão de Nrf2, GPx4, MT1 e NQO-1 esta descrita no item 3.6.

3.2. QUÍMICOS UTILIZADOS

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

3.3. Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase

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

3.4. Determinação de Tióis Proteicos (PSH) e não Proteicos (NPSH).

O tecido muscular foi retirado na linha dorsal dos peixes, pesados e posteriormente processados para a 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. Tanto para NPSH, PSH músculo, o desenvolvimento de cor se dá pela reação dos grupos tióis com DTNB, e conseqüentemente liberação de DTNB, a qual pode ser medida fotometricamente em 412 nm (ELLMAN, 1959). Níveis de NPSH foram expressos $\mu\text{mol NPSH/g}$ por tecido.

3.5. Determinação de Atividades Enzimáticas Antioxidantes

A atividade enzimática Thermo Scientific Evolution 60S UV-Vis) ibl. Atividade de GR e GPX foi descrita conforme (FRANCO et al., 2007). Atividade de GPX4 foi determinada utilizando o ensaio de acoplamento descrito por (WENDEL, 1981) no qual é monitorado indiretamente o consumo de NADPH em 340nm *tert*-butylhydroperoxide como gerador de GSSG. Atividade de GST foi processada segundo (HABIG & JAKOBY, 1981). A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm. Atividade de catalase (CAT) foi mensurada de acordo com (AEBI, 1984). Atividade de superóxido dismutase (SOD) foi elucidada de acordo (KOSTYIUK & POTAVICH, 1989).

3.6. Western Blot

Western blotting foi realizado de acordo com (FRANCO et al., 2010) com pequenas modificações. As estruturas do cérebro (córtex e cerebelo) foram homogeneizados a 4 ° C em 300 mL de tampão (pH 7,0) contendo 50 mM Tris, 1 mM de EDTA, 0,1 mM de fluoreto de fenil metil sulfonil, Na₃VO₄ 20 mM, fluoreto de sódio 100 mM e cocktail de inibidores de protease (Sigma, MO). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 x g durante 10 min. a 4 ° C e os sobrenadantes são recolhidos. Após a determinação da proteína total (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão, β-mercaptoetanol foi adicionado às amostras a uma concentração final de 8%. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80 ° C para posterior análise. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para a determinação do Nrf2, GPx4, NQO1 e MT1.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística realizou-se através de análise de variância one-way ANOVA seguida de teste post-hoc de Duncan quando necessário. Sendo considerados estatisticamente significantes valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

A atividade colinesterásica AChE (**FIG. 8A**) foi analisada no músculo dos peixes como biomarcador de exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos na região de estudo, sendo observada uma inibição no ponto S2 e nenhuma alteração significativa no ponto S1 em relação ao controle.

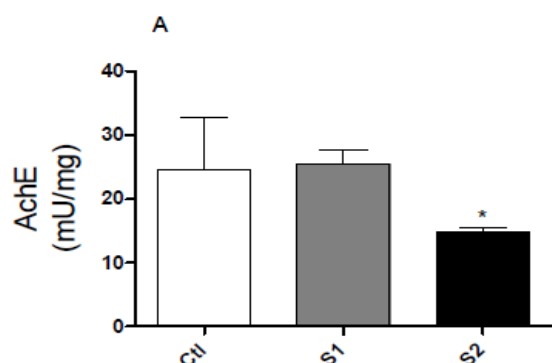


FIGURA 8 - Atividades enzimáticas AChE acetilcolinesterase (A) no tecido muscular *Astyanax* coletados de três pontos diferentes (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel - RS. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU / mg de proteína total. * $P < 0,05$ (ANOVA, teste post-hoc de Duncan), n 4-6 animais por grupo. Os animais controle foram coletados em um ponto de referência.

Atividade de GST (**FIG. 9B**) aumentou significativamente frente ao controle no ponto S2.

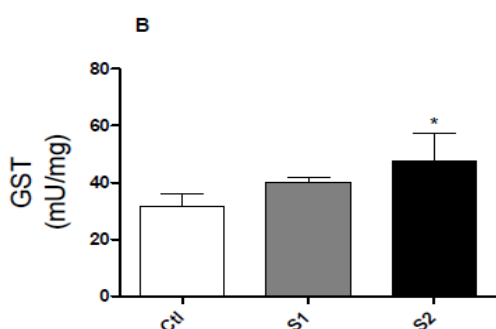


FIGURA 9 - Atividade enzimática da glutatona S-transferase GST (B) no tecido muscular *Astyanax* coletadas de três pontos de coleta diferente (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel - RS.

Os níveis de NPSH (**FIG. 10A**) foram diminuídos significativamente no ponto S2 em relação ao grupo controle, enquanto que os níveis de PSH (**FIG.10 B**) não mostraram nenhuma alteração significativa.

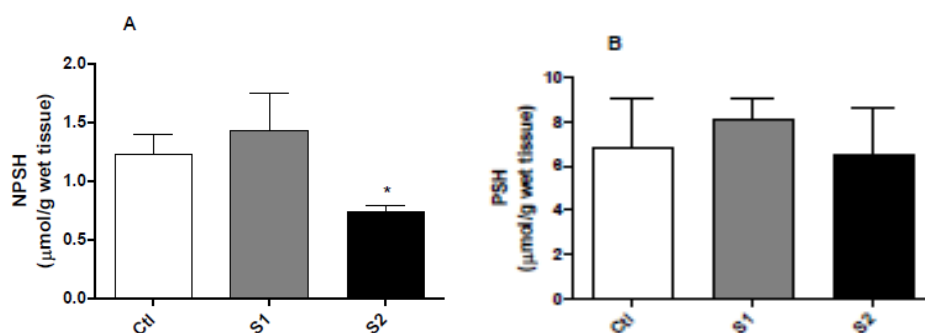


FIGURA 10 - Níveis de NPSH (A) e PSH (B) no músculo *Astyanax* coletados de três pontos diferentes (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel - RS. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU / mg de proteína total. * P <0, 05 (ANOVA, teste post-hoc de Duncan), n 4-6 animais por grupo. Os animais controle foram coletados em um ponto de referência.

Observou-se uma diminuição na atividade das enzimas CAT (Fig. 11A) no ponto S2 e aumento da atividade de SOD (Fig. 11B) no ponto S1 frente ao controle. Em relação à atividade GPx (Fig. 11C) observou-se um aumento significativo nos pontos S1 e S2 quando comparado ao ponto referência e uma diminuição da atividade GR (Fig. 11D) no ponto S2 em relação ao ponto referência.

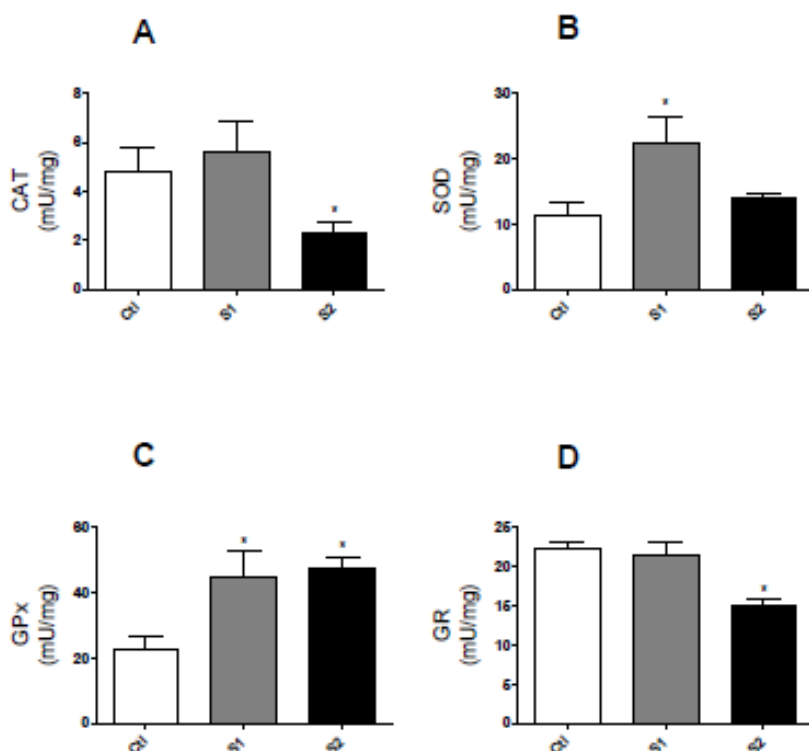


FIGURA 11 - Atividades enzimáticas no tecido muscular *Astyanax* coletados de três pontos de coleta (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel RS. (A) Atividade catalase (CAT) (B) atividade superóxido dismutase SOD. (C) glutathiona peroxidase. Atividade (GPx). (D) Atividade redutase glutathiona (GR). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU / mg de proteína total. * $p < 0,05$ (ANOVA, teste post-hoc de Duncan), n 4-6 animais por grupo. Os animais controle foram coletados em um ponto de referência.

A expressão de marcadores de estresse oxidativo no cérebro dos peixes foi avaliada através da expressão de Nrf2, fusão Nrf2, NQO-1 e GPX4. Foram também avaliados os níveis de metalotioneína (MT1), como biomarcador para a presença de metais nos locais de coleta. Observou-se um aumento significativo na expressão de NRF2 (**FIG. 12A**) e ($p < 0,01$) fosfo Nrf2 (**FIG. 12B**), NQO-1 (**FIG. 12C**) e GPX4(**FIG.**

12A) nos pontos S1 e S2. Um efeito similar foi observado para a expressão de MT1 (**FIG. 12B**) no ponto S1 e S2 em relação ao ponto referência.

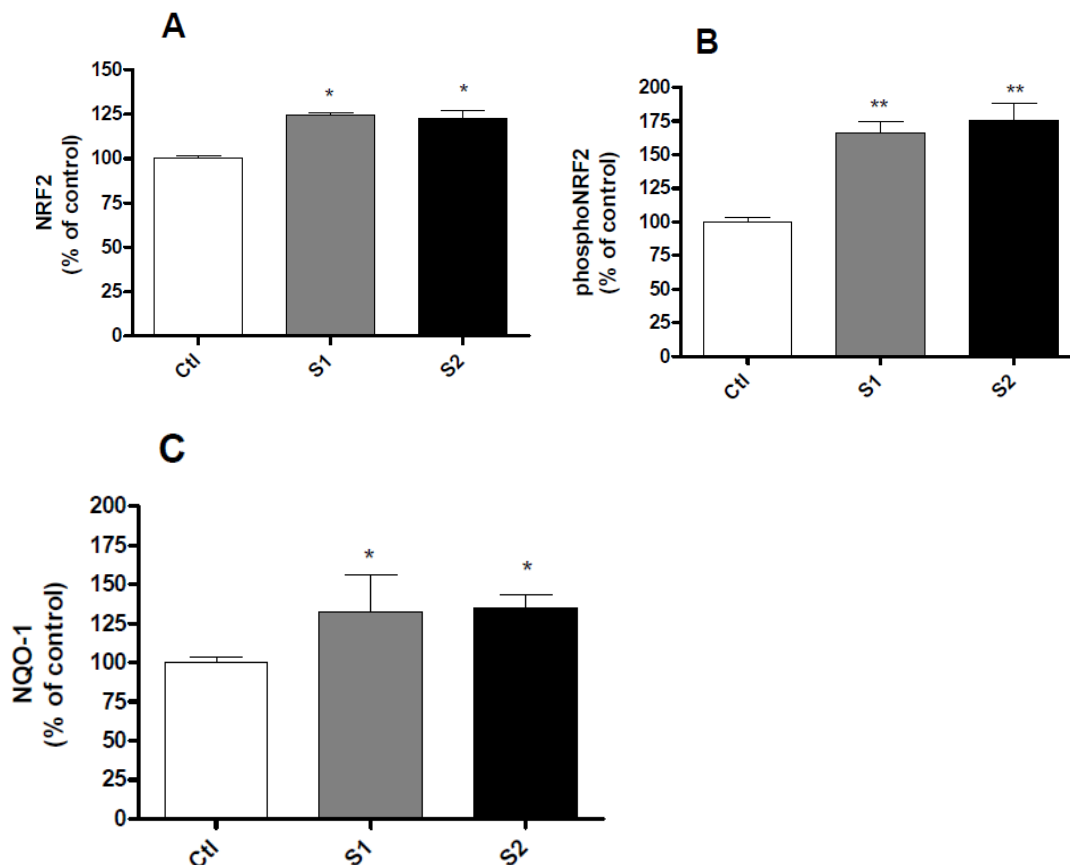


FIGURA 12 - Imunodeteção mostrando os níveis de expressão de NRF2 (A), phosphoNRF2 e NQO-1 no tecido cerebral Astyanax coletados de três pontos de coleta (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel - RS. Dados são apresentados como média desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU / mg de proteína total. * $p < 0,05$ (ANOVA, teste post-hoc de Duncan), n 4-6 animais por grupo. Os animais controle foram coletados em um ponto de referência.

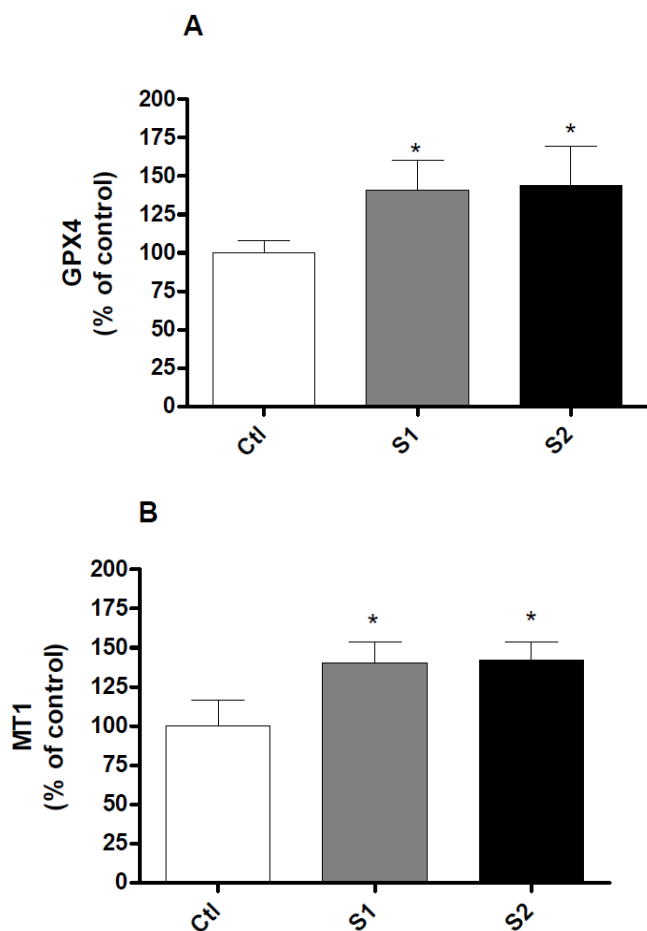


FIGURA 13 - Imunodeteção mostrando os níveis de expressão de GPx4 (A) e MT1 (B), em tecido cerebral *Astyanax* coletados de três pontos de coleta (CTL, S1 e S2) no rio Vacacaí, São Gabriel – RS. Dados são apresentados como média desvio padrão da atividade enzimática, expressa em mU / mg de proteína total. * $p < 0,05$ (ANOVA, teste post-hoc de Duncan), $n = 4-6$ animais por grupo. Os animais controle foram coletados em um ponto de referência.

5. DISCUSSÃO

Os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo perda de sua qualidade ambiental, através de sucessivas exposições a contaminantes sendo que este impacto altera significativamente a biota aquática alterando a biodiversidade. Esta exposição a agentes tóxicos, sendo eles de origem industrial, agrícola ou urbana acabam causando respostas ecológicas deletérias.

Os dados apresentados neste estudo, utilizando a espécie de peixe *Astyanax*, amplamente distribuídos na região foco do estudo, mostraram alterações bioquímicas em tecidos musculares e cerebrais nos dois pontos de coleta em relação ao grupo referência.

A atividade da enzima acetilcolinesterase AChE (FIG. 8A), mostrou diminuição de atividade no ponto S2, sendo que sua inibição vem sendo utilizada como biomarcador clássico da presença de concentrações subletais de organofosforados, sendo estes compostos amplamente utilizados na agricultura atingindo os ecossistemas aquáticos através de despejos agrícolas e urbanos (VIARENGO et al., 2007). Em peixes vários estudos demonstram alterações na atividade de colinesterases na presença de organofosforados ou herbicidas (SANCHO et al., 2000; DUTTA & ARENDS, 2003). Esta inibição esta relacionada com possíveis descargas no rio Vacacaí de organofosforados utilizados na agricultura familiar próxima a coleta de peixes no ponto S2. Outra hipótese de inibição de atividade colinesterásica poderia ser indicada pela possível presença de pesticidas na água do rio Vacacai, sendo que o curso do rio percorre áreas difusas de descarga de agrotóxicos oriundos da extensiva atividade de monoculturas como soja e arroz na região.

A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), por ser uma enzima sensível a compostos exógenos tem sido largamente utilizada como biomarcador (STEGEMAN et al., 1990; BUCHELI & FENT, 1995). No ponto S2 as respostas bioquímicas (FIG. 9B) foram marcadas pelo aumento da atividade enzimática. Este aumento pode estar relacionado com a presença de diferentes xenobióticos no ambiente, ocasionando uma resposta do organismo na tentativa de eliminar compostos potencialmente tóxicos, este aumento de atividade também foi verificado

em glândulas digestivas do mexilhão *Perna* se elevou em sítios de poluição industrial em Santa Catarina, Brasil (BAINY et al., 2000).

A capacidade antioxidante se dá pelo grupamento reativo de sua cisteína, o grupamento tiol (SH) o qual também pode ser encontrado em proteínas, tióis proteicos (PSH) e em outros tióis não proteicos de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína (REICHL et al., 2007). O estado tiólico dos peixes demonstrou uma diminuição nos níveis de tióis não proteicos (NPSH) (Fig. 10A) no ponto S2, demonstrando um indicativo de estresse oxidativo neste ambiente. A depleção de NPSH pode estar relacionada à possível presença de agroquímicos na região e constante exposição dos peixes a estes tipos de contaminantes, como no estudo de (MENENZES C et al., 2012) em que houve a diminuição dos níveis de NPSH em carpas (*Cyprinus carpio*) frente à exposição do herbicida quinclorac.

O Ponto S1 e S2 mostraram alterações nos marcadores de estresse oxidativo como a indução da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), (Fig. 11B, 11C) e inibição da atividade de catalase (CAT), glutatona redutase (GR), (Fig. 11A, 11D), indicando que os peixes coletados nestes pontos estão sob exposição ao estresse oxidativo. Muitas reações de degradação de aminoácidos e gorduras, ocasionadas pelo estresse oxidativo produzem radicais livres e peróxido de hidrogênio, espécies altamente reativas capazes de lesar a maquinaria celular. Como resposta, as células desenvolveram vesículas peroxissomos, onde ocorrem reações devido a grande quantidade de catalase (LENINGHER et al., 1995).

No ponto S2 uma inibição significativa da atividade de CAT (Fig. 11A) pode ser um indicativo de impacto local e tentativa de adaptabilidade dos lambaris, no ponto coletado. Em um estudo de monitoramento de áreas poluídas no estado de Santa Catarina foram obtidos resultados demonstrando inibição da atividade de catalase em *Oreochromis niloticus* (BAINY et al., 1996).

O aumento da atividade enzimática nos animais coletados no ponto S1, SOD e GPx no ponto S1 e S2, tem como hipóteses a exposição destes peixes a estresse oxidativo devido à presença de xenobióticos e decaimento de níveis de oxigênio. Frente a estes parâmetros ocorrem o aumento da atividade das enzimas antioxidantes na tentativa de neutralização de radicais livres, gerados pela

exposição dos peixes a contaminantes no ambiente de estresse oxidativo pelo estado de hipóxia destes ambientes, esta atividade enzimática foi verificada em estudos no fígado de carpa comum *Cyprinus carpio* (LUSHCHAK et al., 2005), como hipótese de hipóxia no estudo em campo. Em outro trabalho, sobre a água doce o molusco *Corbicula fluminea* exposto a um ambiente de baixos níveis de oxigênio dissolvido teve como resultado o aumento das atividades de catalase e glutathione peroxidase (VIDAL et al., 2002).

A inibição de GR pode causar um distúrbio redox celular e comprometer o sistema antioxidante celular, uma vez que GR é responsável pela ciclagem da glutathione utilizada no ciclo da GPx. Além disso, a GSH é o substrato de glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST), que servem também na neutralização de ROS e os seus produtos de reação (TAUSZ et al., 2004). A inibição de atividade de GR (FIG. 11D) no ponto S2 pode ser resultado de uma redução na disponibilidade de GSH nos peixes coletados neste ponto, impedindo a manutenção do estado redox celular. Contudo o mecanismo de inibição das enzimas antioxidantes é desconhecido, podendo ser devido à inibição da transcrição de genes específicos, por xenobióticos resultando numa diminuição dos níveis de mRNA de tais enzimas, e refletindo suas atividades mais baixas (SILVA et al., 2011).

Em condições de estresse oxidativo, o sistema de defesa antioxidante das células é ativado através do fator de transcrição Nrf2 que favorece a sobrevivência de organismos em ambientes impactados, corroborando com dados demonstrados nos pontos S1 e S2 com possíveis fontes de contaminação difusas agrícolas e urbanas indicadas pela indução de expressão de Nrf2 (FIG. 4A) e fosfo Nrf2 (FIG. 4B). Com isso, através da ativação e aumento da expressão de Nrf2 nos pontos S1 e S2, pode estar relacionada também ao aumento de expressão de NQO-1 (FIG. 4C) e GPX4 (Fig. 5A), que tem como principal substrato hidroperóxidos de fosfolipídios, o que pode indicar papel crucial na oposição a peroxidação lipídica (BRIGELIUS-FLORE, 2006). O aumento de expressão destes marcadores de estresse oxidativo nos pontos S1 e S2 frente ao controle, fortalecem a hipótese de que estes peixes se encontravam sobre estresse oxidativo pela exposição prolongada a xenobióticos.

A produção de metalotioneínas (MTs) é induzida pelo aumento da entrada de metais na célula, o que torna estas metaloproteínas biomarcadores de contaminação de metais clássicos de exposição a metais (VIARENGO et al., 2007). Sua aplicabilidade como biomarcador de exposição a metais se deve a capacidade destas metaloproteínas em desintoxicar e regulação de certos metais, essa atividade foi estudada em diversos estudos efetuados em organismos aquáticos (STEGEMAN et al., 1992; La FONTAINE et al., 2000) tornando as MTs ferramentas úteis na bioindicação de poluição aquática por estes agentes tóxicos. Na (FIG. 5 B) os resultados demonstram uma indução na expressão de MT1 nos pontos S1 e S2, gerando a hipótese que estes pontos estão sobre contaminação por metais provenientes de adubos minerais e orgânicos, bem como corretivos e defensivos agrícolas, usados na região como NPK. Estes fertilizantes utilizados para suprir micronutrientes podem conter metais pesados, como impurezas na sua estrutura (AMARAL SOBRINHO et al., 1992), sendo esta contaminação por metais decorrente do uso de agroquímicos já relatada no estudo da microbacia Caetés, em Paty do Alferes (RJ), no qual foi encontrada concentrações de Cd, Pb e Mn, na água do córrego e açude que cortam a microbacia (RAMALHO et al., 2000).

6. CONCLUSÕES

Utilizando o gênero *Astyanax* neste estudo de avaliação da qualidade ambiental do rio Vacacaí, foram verificadas alterações bioquímicas nos biomarcadores de contaminação aquática, mostrando alterações clássicas como a inibição de acetilcolinesterase frente a agroquímicos organofosforados, assim como níveis de expressão de metiotioneínas, como possível contaminação por metais encontrados em fertilizantes utilizados na adubação de monoculturas na região de estudo. A análise de biomarcadores de biotransformação mostrou alterações nos pontos de coleta, demonstrando clara contaminação por xenobíoticos. Parâmetros de estresse oxidativo tiveram alterações como indução na atividade enzimática de SOD e GPX e inibições da atividade GR e CAT, sendo estas respostas biológicas em organismos aquáticos identificadas e correlacionadas em estudos de impacto ambiental. Alterações nos níveis de expressão de Nrf2, GPX4 e NQO-1 também reforçam a hipótese de que estes peixes se encontram em ambientes sob estresse oxidativo, por provável, ação de xenobióticos. E baixos níveis de oxigênio dissolvido encontrados nos pontos coletados demonstram uma situação de hipóxia, que poderia agravar o estado de estresse oxidativo dos lambaris. Estes resultados demonstram um agravamento na contaminação do principal manancial da região o rio Vacacaí, com alterações em respostas biológicas iniciais. Sendo que a contínua exposição dos peixes a esta poluição aquática pode levar a um desequilíbrio ecológico relevante. Portanto é relevante a investigação de biomarcadores de contaminação aquática na prevenção de danos ambientais e diagnóstico preventivo em programas monitoramento ambiental.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas Fishers Society**, v. 3, p. 104-112, 2002.

ADAMS, S.M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990, p. 333-353.

AEBI, H., 1984. Catalase in vitro. **Method Enzymol.** 105, 121–126.

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.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; COSTA, L.M. & VELLOSO, A.C.X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **R. Bras. Ci. Solo**, 16:271-276, 1992.

ARAGAO, M.A. & ARAUJO, R.P.A. 2006. Metodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. Pp 117-147. In: P.A. Zagatto & E. Bertoletti (eds.), **Ecotoxicologia Aquatica**.

BAINY ACD, SAITO E, CARVALHO PSM & JUNQUEIRA VBC (1996) Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** 34:151-162.

BAINY ACD, SAITO E, CARVALHO PSM & JUNQUEIRA VBC (1996) Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** 34:151-162.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254.

BRIGELIUS-FLOHE, R., 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol. Chem.** 387, 1329–1335.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do

CHADRAN R.; SIVAKUMAR AA.; MOHANDASS S & ARUCHAMI M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology** Part C 140:422-426.

Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S & Aruchami M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology** Part C 140:422-426.

EIGENMANN, C.H. (1921). The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, v.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo, v. 6, p. 1-204, 1948. **Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.19, p.7-11, 1991.

FRANCO, J.L; POSSER, T; DUNKLEY, P.R; DICKSON, P.W; MATTOS, J.J; MARTINS, R; BAINY, A.C; MARQUES, M.R; DAFRE, A.L; FARINA, M; 2009. Methyl mercury neurotoxicity is associated within inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. 393 **Free Radical Biol. Med.** 47, 449–457.

GARUTTI, V. & BRITSKI, H.A. (2000). Descrição de uma nova espécie de Astianax

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

GOKSOYR, A. & FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, 22: 287-312.

GRANEY, R.L. et al. Field studies. In: RAND, G.M. (Ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. **Washington: Taylor and Francis**, 2. ed., 1995, c.9, p. 257-306..

GRANEY, R.L.; GIESY, J.P. & CLARK, J.R. 1995. Field studies. *In*: G.M. Rand (ed.), **Fundamentals of aquatic toxicology** (Second Edition). 1125p.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-411 transferases. **Method Enzymol.** 77, 398–405.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

HANSEN BH.; ROMMA S.; GARMO A.; OLSVIK PA & ANDERSEN RA (2006) Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 143:263-274.

ITOH, K; WAKABAYASHI, N; KATOH, Y; ISHII, T; IGARASHI, K; ENGEL, JD; YAMAMOTO, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & Development**, v.13, p. 76-86, 1999.

KOSTYUK, V.A., POTAPOVICH, A.I., 1989. Superoxide-driven oxidation of quercetin and 432 a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochem.** 433.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

MMA: Ministério do Meio Ambiente: Dados Biomas do Brasil.

Disponível em :

<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>

Acessado em : 20/09/2013.

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.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 13291–13295, 2009.

ORLANDO, E.F. et al. A comparison of the reproductive physiology of the largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater rivers in Florida. **Environ. Health Perspect.**, Washington, D.C., v.107,no.3, p.199-204, 1999.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL, S.; BRASIL, N. M.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35 (7): 1289-1303, 2000.

RAND, G.M. 1980. Bioassays. *In*: F.E. Guthrie & J.J. Perry (eds.), **Introduction to Environment Toxicology**. Elsevier, North Holland, N.Y.

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

SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. et al. Use of biochemical biomarkers as a screening toll to focus the chemical monitoring of organic pollutants in the Biobio river basin (Chile). **Chemosphere**, [s.l.], v. 37, p. 669-710, 1998.

SANCHO, E. et al. Alterations on AChE activity of the fish *anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 46, 57-63. 2000.

SANCHO, E., CERÓN, J.J., FERRANDO, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sub lethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 46, 81-86.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, F.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v. 393, p. 133-139, 1997a.

SEMA: Secretaria Estadual do Meio Ambiente – RS: Dados das regiões e bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul.

Disponível em :

<http://www.sema.rs.gov.br/>

Acessado em : 28/09/2013.

SILVA, C.A., MAGALHÃES, V.F., OBA, E., RAMSDORF, W.A., CESTARI, M.M., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., SILVA de ASSIS, H.C., 2011. First report about saxitoxins in fresh water fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. **Toxicon** 57, 141–147.

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.

TAUSZ, M., SICERLJ, H., GRILL, D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology : is a stress-response concept valid? **J.Exp.Bot.**55, 1955–1962.

THOMPSON, H.M.; LANGTON, S.D.; HART, A.D.M. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife – a biochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111C, p. 1-12, 1995.

v.13, p. 76-86, 1999.

VIARENGO, A.; LOWE, D; BOLOGNESI, C; FABBRI, E & KOEHLER, A. 2007 The use of biomarkers of biomonitoring; a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology**, 146(3): 281- 300.

WINKALER, E. U. ; MARTINEZ, C. B. R. Efeitos da amônia na morfologia branquial de *Astyanax bimaculatus*. In: **V ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 1999**. Itajaí. Anais... Itajaí: Centro de Educação Superior em Ciências Tecnológicas, da terra e do mar. 1999. v.1, p. 90.

WINKALER, E.U. Análise de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos em curimbas (*Prochilodus lineatus*) submetidos a testes in situ em três ribeirões da cidade de Londrina, PR. 2002. (**Monografia de bacharelado em Ciências Biológicas**) – **Universidade Estadual de Londrina, Londrina**.

WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquat Toxicol**, v.19, n.2, p.137-161. 1991.

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

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464 p. BRANCO, S. M. Poluição: a morte de nossos rios. São Paulo: ASCETESB, 1983. 50p.

LEONZIO, C. & FOSSI, M.C. 1993. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. In Fossi, M. C. and Leonzio C.(eds.). Nondestructive biomarkers in vertebrates. **Lewis Publ., London**. Pp. 297 – 312.