



CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

BRUNO FERREIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM *Hippocampus reidi*
(Ginsburg, 1933) EXPOSTO AO EFLUENTE SETORIAL NÃO
TRATADO DE UMA FÁBRICA DE CELULOSE ESPÍRITO SANTO,
BRASIL**

VILA VELHA

2009

BRUNO FERREIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM *Hippocampus reidi*
(Ginsburg, 1933) EXPOSTO AO EFLUENTE SETORIAL NÃO
TRATADO DE UMA FÁBRICA DE CELULOSE ESPÍRITO SANTO,
BRASIL

Dissertação apresentada a Programa
de Pós-Graduação em Ecologia de
Ecossistemas, visando à obtenção do
título de Mestre em Ecologia de
Ecossistemas.

Orientador: Prof^a. Dra Adriana Regina
Chippari-Gomes

VILA VELHA

2009

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S595e Silva, Bruno Ferreira .

Avaliação de biomarcadores em *Hippocampus reidi*
(Ginsburg, 1933) / Bruno Ferreira da Silva. – 2009.

65 f. : il.

Orientador: Adriana Regina Chippari-Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -
Centro Universitário Vila Velha, 2009.

Inclui bibliografias.

1. Cavalo marinho (Peixe). 2. Efluente. 3. Alterações –
Genéticas. 5. Industrial. I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II.
Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de
mestrado**

**Avaliação de Biomarcadores em *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933)
exposto ao Efluente Setorial não Tratado de uma Fábrica de Celulose
Espírito Santo, Brasil**

Elaborada por

BRUNO FERREIRA DA SILVA

Pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas,
para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Adriana Regina Chippari Gomes
(Presidente / Orientador)

Dra. Tatiana Heid Furley (APLYSIA)

Dra. Giovanna Assis Pereira Boëchat (UVV)

Vila Velha, 29 de setembro de 2009

Dedico a todos que fazem parte da minha família

"Você pode ter todo o dinheiro do mundo, mas há algo que jamais poderá comprar: um dinossauro."

Homer J. Simpson

AGRADECIMENTOS

À Dra. **Adriana Regina** Chippari-Gomes pela Orientação e apoio.

Ao Dr. **Levy** de Carvalho Gomes pelo incentivo.

À **Bibiana** Ribeiro Rubini por toda colaboração e apoio.

À Dra. **Wilma** Terra e à Dra. **Giovanna** Assis por sempre responderem minhas dúvidas, mesmo que por e-mail.

Á Dra. **Leila** Cezar Vargas pelo auxílio em toda o esse período do mestrado

À Dra. **Zilma** Maria Almeida Cruz pelo apoio até o fim deste trabalho

Ao Dr. **Paulo** Dias e ao Dr. **Alessandro** Ramos pela confiança.

À Dra. **Vera** Almeida-Val e ao Dr. **Adalberto Val**, por facilitarem a realização das análises enzimáticas em seu laboratório (LEEM/IMPA) em Manaus/AM.

À **Vivian** Meirelles por toda a ajuda no LEEM, faltou aquela pizza, mas tudo bem!

Ao pessoal do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, UVV e a todos que passaram por lá: **Marcão, Fernanda, Alexandra, Dani** (e ao bolo de chocolate), **Lorena, Marina, Victor Fofão, Andressa** (Joelma), **Patrícia** (M. C. O. J.), **Lorraine, Juliana, Luana, Rafael**, e à menina do brigadeiro **Camila** (69), as meninhas chatas do lab. **Lara** e **Maria Luiza** (Mary Loo Calabresa). E aos colegas de brincadeiras, palhaçadas e estresse no lab. **Luciano, Laila, e Michel** (Dedé Santana).

Às pessoas que contribuíram com informações importantes para questionamentos: **Fabio, Leandro, Neto** (Baiano) e ao **Marcus** colegas da veterinária.

Aos amigos de sextas-feiras **Rodrigo Lezo, Elaine, Carol, Amanda, Arthur** (Tun) e **Diogo Tantan**.

Ao amigo **Ramon** que transformou sua casa em Manaus em pousada por 10 dias.

Aos amigos: **Robert, Rodrigo Theófilo, Aliny Kbça** e **Tiago** (Hermano teu) pelo interesse no meu trabalho.

À **toda galera do mestrado** em especial: **Filipe Nuan** (e **Ananda** é claro valeu pelo apoio sempre e à todo pessoal do escritório do rock); ao **Adélio** José por estar sempre chamando para os rocks; ao **Aice**; ao **Rafael** (o mau elemento que incentivava a não voltar para a aula quando estávamos no butéco); à **Larissa** (Estressada, enjoada quase um pé no saco, mais eu ainda gosto dela assim mesmo);

à **Celina** (que mesmo assustada tava sempre lá) e ao cara que tem um gambá selvagem louco de estimação o Mister Smagmam, **Fred Winehouse**.

Se esqueci de alguém foi mau este **VALEU** é pra vc!!!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Análises Toxicológicas Por Meio De Biomarcadores	17
1.2. <i>Espécie teste:</i> Hippocampus reidi	21
2. OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Delineamento Experimental	24
3.2 Procedimento Experimental	26
3.2.1 Ensaio do Micronúcleo	27
3.2.2 Ensaio Cometa	28
3.2.3 Atividade Enzimática da Glutathione S-Transferase (GST - E.C 2.5.1.18) e Catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6)	29
3.2.4 Preparo das Lâminas Histológicas e Análises	30
3.2.5 Bioacumulação de Metais	31
3.2.6 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS	36
4.1 Ensaio Do Micronúcleo	33
4.2 Ensaio Cometa	34
4.3 Atividades Enzimáticas	47
4.4 Análises Histológicas	38
4.5 Bioacumulação De Metal Traço	41
5 DISCUSSÃO	44
5.1 Ensaio Do Micronúcleo	44
5.2 Ensaio Cometa	45
5.3 Atividades Enzimáticas	48
5.4 Análises Histológicas	50
5.5 Bioacumulação De Metal Traço	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO	55
7 REFERÊNCIAS	56

Lista de tabelas e figuras

Tabela 1. Padrões de alterações em ambientes aquáticos em relação ao tempo de exposição gradativa de poluentes	19
Figura 1. Exemplar de <i>Hippocampus reidi</i> .	22
Figura 2. Aclimatação dos exemplares de <i>H. reidi</i> .	25
Figura 3. Esquema de agrupamento de aquários de teste com suas respectivas concentrações de efluente.	26
Figura 4. Momento da punção caudal em <i>H. reidi</i> .	27
Figura 5. Eritrócitos com micronúcleos.	28
Figura 6. Exemplar de <i>H.reidi</i> , calcinado	32
Figura 7. Frequência de micronúcleos observada nos exemplares de <i>Hippocampus reidi</i> expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a uma recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Os dados estão apresentados em Média \pm Erro Padrão da Média.	34
Figura 8. Frequência do Índice de Danos no DNA (Média \pm Erro padrão) em eritrócitos de <i>Hippocampus reidi</i> expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. E grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8. Os dados estão apresentados em Média \pm Erro Padrão da	

Média. Letras indicam diferença significativa entre os grupos expostos e grupo controle ($p < 0,05$). 35

Tabela 2. Nível de dano no DNA classificados em cada classe do cometa (0, 1, 2 e 3) em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), (Média \pm Erro padrão) durante 96hs. E grupo exposto à recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. $n=8$ para cada tratamento. 36

Figura 9. Atividade da enzima Glutathione S-transferase em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. $n=8$ para cada tratamento. * Indica diferença significativa do grupo recuperado após exposição em relação ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$). As letras diferentes indicam entre os tratamentos ($p < 0,05$). 37

Figura 10. Atividade da enzima Catalase em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. $n=8$ para cada tratamento. 38

Figura 11. **A.** Morfologia das lamelas brânquias do grupo controle de *Hippocampus reidi* (M. O. 40X). **B.** Lamelas alongadas (M. O. 100X), **C.** Hiperplasias (setas) (M. O. 400X) e **D.** Descolamento epitelial (setas) (M. O. 400X) dos exemplares de *H. reidi* expostos na concentração de 50% de efluente setorial não tratado de fábrica de celulose 39

Tabela 3. Média da frequência e estágio de severidade das diferentes alterações histopatológicas dos exemplares da espécie *Hippocampus reidi* expostos às diferentes concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose, durante 96hs (n=8), incluindo o grupo recuperado 96hs após exposição à concentração de 50% do efluente por 96 hs e seu respectivo grupo controle.. Estágio de **nível I** engloba danos pontuais e reversíveis; estágio de **nível II** engloba danos pontuais e irreversíveis; estágio de **nível III** engloba danos extensos e irreversíveis. 40

Figura 12. Índice de alteração histopatológica (IAH) médio dos exemplares da espécie *Hippocampus reidi* expostos às diferentes concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose, durante 96hs (n=8), incluindo o grupo recuperado 96hs após exposição à concentração de 50% do efluente por 96hs e seu respectivo grupo controle 41

Tabela 4. Níveis de metais traço (ppm) presentes na água dos tratamentos antes e após os testes com exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. E o grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle para cada tratamento. 42

Tabela 5. Níveis de bioacumulação de metais traço (ppm) presentes em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de processo de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8 para cada tratamento. 45

RESUMO

Com o intuito de analisar o potencial toxicológico, por meio de biomarcadores, do efluente setorial não tratado de uma fábrica de celulose utilizou-se 32 exemplares da espécie *Hippocampus reidi* sendo expostos a três concentrações do efluente: 10, 30 e 50% por 96hs. Foi averiguada também a possibilidade de recuperação em 96hs dos animais após terem sido expostos na concentração de 50% do efluente por 96hs. Foram utilizados os seguintes biomarcadores: ensaio do micronúcleo, ensaio cometa, atividades enzimáticas da Glutathione S-transferase (GST) e da Catalase (CAT), análises histopatológicas nas brânquias, além da quantificação de metais traço corporais nesses animais. O ensaio cometa apresentou ser um teste sensível a esse contaminante, visto que houve um aumento gradativo no Índice de Danos no DNA (ID) nos exemplares de *H. reidi* expostos às concentrações crescentes do efluente setorial de fábrica de celulose. O ensaio cometa também foi eficiente em detectar a recuperação dos indivíduos após 96hs, visto que houve diminuição do ID quando comparado ao ID dos indivíduos expostos na mesma concentração do efluente (50%). No teste do micronúcleo foi observada alteração significativa apenas nos indivíduos expostos na concentração mais alta do efluente, havendo recuperação dos animais. As atividades das enzimas GST e CAT não apresentaram alterações significativas nos animais após exposição a esse efluente. Assim como as alterações histológicas nas brânquias e a bioacumulação de metais traço não foram significativas nestes exemplares. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que esse efluente setorial de uma fábrica de celulose não apresenta um potencial altamente tóxico para a espécie estudada, levando em consideração o tempo de exposição e as concentrações testadas. E o ensaio cometa é o mais indicado como biomarcador de contaminação para este efluente.

Palavra chave: Cavalo-marinho, Ensaio cometa, Danos histopatológicos, Enzimas, Recuperação.

ABSTRACT

In order to examine the toxicological potential by means of biomarkers, the industry untreated effluent from a pulp mill that used 32 specimens of the seahorse *Hippocampus reidi* exposed to three concentrations of the effluent: 10, 30 and 50% by 96 hours. It also investigated the possibility of recovery at 96 hours after the animals were exposed to the concentration of 50% of the effluent for 96 hours. We used the following biomarkers: the micronucleus test, comet assay, enzyme activities of glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT), pathological examinations in the gills, and the quantification of trace metal body in these animals. The comet assay showed a test sensitive to this contaminant, as there was a gradual increase in the index of DNA damage (ID) in specimens of *H. reidi* exposed to increasing concentrations of the sector effluent pulp mill. The comet assay was also efficient in detecting the recovery of individuals after 96 hours, whereas there was a decrease of ID compared to the ID of the exposed individuals in the same concentration of the effluent (50%). In the micronucleus test was no significant change only in individuals exposed at the highest concentration of effluent, with recovery of the animals. The activities of enzymes GST and CAT showed no significant changes in animals after exposure to this effluent. As the histological changes in the gills and bioaccumulation of trace metals were not significant in these specimens. The results of this study indicate that this sector effluent from a pulp mill does not present a potentially highly toxic to the species studied, taking into account the exposure time and concentrations. And the comet assay is the most suitable as a biomarker of contamination for this effluent.

Keywords: Seahorse, Comet assay, Histopathological damage, Enzymes, Recovery.

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial iniciada no fim do século XVIII e apresentando sua projeção mundial no século XIX, iniciou-se um aumento de liberação de poluentes no ambiente como produtos químicos, considerados tóxicos para a maioria dos organismos que habitam tanto os ecossistemas terrestres como aquáticos (Zagatto e Bertolletti, 2006). Com o desenvolvimento cada vez maior de centros urbanos e tecnologias, diferentes grupos de substâncias passaram a ter efeitos sobre o equilíbrio natural dos ecossistemas aquáticos: nutrientes em excesso, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos pesados, metais pesados, agrotóxicos e outros (Moron et al.,2006).

Estuários e águas costeiras adjacentes são geralmente vulneráveis à presença de compostos xenobióticos, os quais produzem diversas alterações na biota aquática e em vários níveis da cadeia trófica (Simonato et al.,2008). O monitoramento da qualidade ambiental em ecossistemas aquáticos é o modo que permite detectar as alterações de suas características naturais. Usualmente para verificar as alterações na biota utilizam-se análises físico-químicas e biológicas, bem como o emprego de espécimes indicadores (Zagatto e Bertolletti, 2006). Masutti et al.,(2006) ressaltam a importância na determinação de concentrações seguras de agentes químicos para a preservação da vida aquática e para a qualidade das águas e dos sedimentos

No entanto o rápido avanço do desenvolvimento industrial em todo o mundo tem contribuído para o grande aporte de efluentes ao ambiente oceânico, afetando não apenas a vida aquática como também provocando sérias ameaças a toda vida no planeta (Niyogi et al.,2001).

Indústrias de celulose inserem-se entre os tipos de indústrias consumidoras de grande quantidade de água (Rodrigues, 2004). A água é utilizada para a lavagem da polpa, para melhorar a qualidade da celulose, na limpeza, no resfriamento, na selagem e na lubrificação. Na produção é necessário também separar a lignina da celulose processo denominado branqueamento. A lignina por sua vez é uma macromolécula aromática tridimensional, de estrutura não uniforme, e a sua eliminação se dá por oxidação, que a fragmenta em diversas moléculas de

diferentes tamanhos, muitas das quais apresentando maior toxicidade (Bertazzoli e Pelegrini, 2002).

Com a crescente produção de papel e celulose e a busca constante pela obtenção da qualidade dos produtos, as indústrias do setor têm gerado diariamente grandes quantidades de resíduos sólidos e efluentes, os quais têm se constituído numa grande preocupação ambiental e econômica. Diariamente, estima-se que são liberados valores em torno de 200.000 m³/dia por dia de efluentes produzidos por indústrias de celulose distribuídas ao redor do planeta (Rodrigues, 2004).

Os efluentes provenientes de fábricas de processamento de celulose apresentam composição química bastante complexa, contendo compostos orgânicos e inorgânicos, componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, incluindo metais de transição, policloridato dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), policlorinato dibenzofuranos (PCDFs) e pentaclorofenol (Fatima et al.,2001). Os compostos inorgânicos podem inibir processo de tratamento do tipo biológico, tornando-os incapaz de exercer sua função como filtro (Jimenez et al.,2004).

Os fatores que contribuem para esta complexidade química dos efluentes são: (a) a origem e tipo de madeira empregada, (b) a química do processo de branqueamento, (c) o grau de fechamento de circuito, controle de derrames, sistema de coleta e manejo dos condensados, (d) substâncias químicas adicionadas no processo, (e) a carga orgânica que entra na planta de branqueamento (grau de deslignificação), (f) o tipo e a eficiência do tratamento de efluente, e, (g) as instabilidades no processo. Assim, há uma grande variação de fábrica para fábrica, não possuindo fábricas com efluentes idênticos (Jimenez et al.,2004).

Os efeitos tóxicos da descarga de efluentes industriais em corpos hídricos devem ser intensamente investigados, uma vez que podem afetar a sobrevivência, o comportamento ou a composição genética dos organismos aquáticos, bem como a saúde da população (Frizzo et al.1996). Oakes et al.,(2004) relatam que a composição química dos efluentes de fábricas de celulose apresentam alguns compostos bioativos, responsáveis por alterações fisiológicas, em animais da biota aquática, principalmente peixes como por exemplo o *Catostomus catostomu*,

endêmico da América do Norte. Toft et al.,(2004) e Orlando et al.,(2007) descrevem distúrbios por meio de masculinização de *Gambusia holbrooki* (mosquitofish) e *Anguilla rostrata* peixes que vivem em locais contaminados com efluentes industriais de celulose.

Segundo Khan (2009), o lançamento de efluente de fábrica de celulose causa impacto direto à biota aquática e em especial na saúde de algumas espécies de peixes como, por exemplo, *Pleuronectes americanus* espécie marinha do mar Ártico, na qual foi observada alterações no processo de homeostase através da alimentação, do crescimento, da fisiologia, do comportamento e da reprodução. Algumas espécies de peixes que vivem em regiões que recebem efluente de fábrica de celulose apresentam predominância elevada de lesões epidérmicas, aumento de índices de alterações hepáticas, modificações na maturação das gônadas, lesões nas brânquias e rins comparados com amostras dos locais da referência sem influência de efluente (Khan e Hooper, 2000; Landman et al.,2008).

1.3. Análises Toxicológicas Por Meio De Biomarcadores

Atualmente, as análises ambientais se constituem em ensaios ecotoxicológicos. Em nível da organização biológica, as ferramentas de análise são chamadas de Indicadores Biológicos ou Biomarcadores, os quais possibilitam a correlação da intensidade da exposição como o efeito biológico da substância (Magalhães e Ferrao Filho, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados em 3 tipos: de Exposição, de Efeito, e Suscetibilidade. Os de Exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, a uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os biomarcadores de Efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde, decorrentes da exposição e absorção das substâncias xenobióticas. Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta. Os biomarcadores de Suscetibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos (Amorim, 2003; Zagatto e Bertolletti, 2006).

O monitoramento por exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde (Amorim, 2003). Quando efluentes entram em contato com organismos vivos, causam uma variedade de respostas. Estas respostas (efeitos biológicos) são normalmente, de dois tipos: de proteção contra efeitos que causam danos e alguns que não são percebidos pelo organismo. Efluentes orgânicos podem causar a indução de enzimas que podem metabolizá-los (respostas de proteção) ou em alguns casos produzirem metabólitos ativos (ativação) (Alves, 2003; Buss et al.,2003).

Por outro lado, podem ocorrer mudanças não relacionadas a nenhuma função de proteção. Estas incluem alterações na concentração ou atividade das enzimas, interação com receptores e alterações no DNA. Estas respostas podem não causar nenhum dano evidente ao organismo rapidamente, porém podem trazer consequências em nível celular ou de organismo afetando sua saúde, em longo prazo (crescimento, reprodução). Neste sentido, as alterações bioquímicas em tecidos mais sensíveis são as primeiras respostas de ação biológica (Alves, 2003). Contudo os biomarcadores se baseiam em demonstrar a perturbação inicial e posterior nos organismos expostos ao efluente (Onsson et al.,2002).

Os indicadores biológicos são muito úteis devido a sua especificidade a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros (Arias et al.,2007). A natureza do impacto e as consequências para o ambiente podem ser mostradas no Tabela 1, a qual demonstra uma sequência de alterações gradativas provocadas nos organismos aquáticos perante a entrada de poluentes no sistema. Essa situação exemplifica uma forma progressiva de dano em um habitat aquático (Gomes et al.,2000).

Tabela 1. Padrões de alterações em ambientes aquáticos em relação ao tempo de exposição gradativa de poluentes.

Entrada de poluentes			
Mudança da qualidade da Água			
Imediato	Mudanças Comportamentais	Efeito no sistema Neuroendócrino	Efeito nas Membranas Epiteliais.
Minutos a Horas	Respostas Bioquímicas		
	Alterações no Metabolismo	Fluidos Corpóreos e Enzimas	
Dias e Semanas	Respostas Fisiológicas		
	Consumo de Oxigênio	Balanço Osmótico	Alimentação e Digestão
Dias a Meses	Alteração no Desempenho Fisiológico		
	Crescimento	Reprodução	
Meses e Anos	Impactos nas Populações		
Anos e Décadas	Estrutura e Dinâmica de Comunidades	Função e Estrutura de Ecossistema	

Modificada de Gomes et al.,2000.

Os efeitos de poluentes em animais aquáticos podem ser avaliados em estudos populacionais, como moluscos, crustáceos e alguns peixes que são usados como bioindicadores (Machado, 1999). Segundo Kodo Filho (2006), os espécimes de peixes seguem uma relação semelhante à descrita na Tabela 1 algumas alterações são melhores demonstradas quando se analisa o tecido hepático. De acordo também com Karr (1981), Ramelow et al.,(1989), Wooton (1990), Frago et al.,(1998) os peixes são excelentes ferramentas no monitoramento de ambientes aquáticos, servindo como importantes bioindicadores, pois estão no topo da cadeia trófica.

A identificação dos efeitos adversos das atividades relacionadas à produção, de efluentes e acidentes ambientais na biota aquática pode ser analisada utilizando

parâmetros diversos em um mesmo animal (Camargo e Martinez, 2006). A utilização de peixes como bioindicadores apresenta qualidades positivas, pois podem ser utilizados para analisar danos fisiológicos, bioquímicos, histopatológicos, bioacumulação de íons, mutagênicos e genotóxicos (Simonato et al., 2008; Cavas e Konen, 2008).

Atualmente, ensaios de ecotoxicidade são baseados em alvos fisiológicos que avaliam alterações bioquímicas, comportamentais ou histológicas têm sido desenvolvidos em lugar das tradicionais respostas na sobrevivência, crescimento e reprodução (Niemeyer et al., 2006). Efeitos tóxicos que resultam em alterações bioquímicas e fisiológicas no sangue dos peixes, que podem ser usados como indicadores do local onde as espécies habitam, ou ao efluente exposto (*in situ*). Nos últimos anos tem-se aumentado o interesse na área da genotoxicidade causada pela poluição ambiental. Os peixes se constituem bioindicadores para monitoramento genotóxico aquático pela habilidade de metabolizar xenobióticos e, em alguns casos, apresentarem acúmulo de poluentes (Moron et al., 2006).

Análises de biomarcadores são bastante usadas pela sua rápida realização e custo relativamente baixo como o teste de micronúcleo e o Ensaio Cometa. O Ensaio Cometa (EC) ou *Single Cell Gel electrophoresis* (SCGE) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade. A metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos, entre estas a necessidade de somente um pequeno número de células e de não ser necessário células em divisão (Tice et al., 2000). Vários trabalhos relatam sua aplicabilidade e eficiência na detecção da quebra da fita de DNA, tanto para peixes quanto para bivalves expostos a efluentes (Buschini et al., 2004).

O teste micronúcleo, ensaio *in vivo*, é mais utilizado para detecção de agentes clastogênicos (lise cromossômica) e aneuploidogênicos (indutores de aneuploidia ou segregação anormal cromossômica). Este fato ocorre quando o material genético é fragmentado ou perdido e não se incorpora ao núcleo da célula filha, originando um novo núcleo e tamanho menor que o principal (Ribeiro, 2007; Cavas e Konen, 2008).

Assim como a utilização de ensaios mutagênicos e genotóxicos a utilização de biomarcadores histopatológicos também são ferramentas importantes no monitoramento ambiental, tanto em estudos laboratoriais quanto em estudos de campo. Uma das vantagens em utilizar estes biomarcadores permite-se o exame de órgãos alvo específicos. (Camargo e Martinez, 2007). O primeiro órgão interno a ter contato com os poluentes aquáticos são as brânquias, devido ao constante contato com o ambiente externo (Figueiredo-Fernandes et al.,2007). Por terem grande eficiência na absorção do oxigênio da água, os peixes utilizam a cavidade bucal e as câmaras branquiais, atuando alternadamente como bombas de sucção e pressão, para manter um fluxo contínuo de água sobre as brânquias (Machado, 1999).

Alguns estudos de alterações enzimáticas em indivíduos aquáticos se mostram favoráveis segundo Lee et al.,(2008). A inserção de xenobióticos na biota aquática pode alterar a ativação de mecanismos de detoxificação de via metabólicas, como por exemplo, a Glutathione S-transferase (GST), enzima responsável pela conjugação de vários compostos e interage no esforço oxidativo em determinadas situações na qual o organismo se encontra (Camargo e Martinez, 2006). A Catalase (CAT) é outra enzima com caráter antioxidante responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio produzido no metabolismo celular. Durante a oxidação de ácidos graxos peroxisomal, H_2O_2 é produzido como um sub-produto; a CAT aparentemente age decompondo o H_2O_2 , podendo servir como biomarcador para um importante grupo de substâncias carcinogênicas não genotóxicos no ambiente aquático (Martins et al.,2005).

1.4. Espécie teste: *Hippocampus reidi*

Os cavalos marinhos (Família Signathidae) apresentam uma distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais de águas quentes originados no oceano Atlântico no período Eoceno (Teske et al.,2007; Olivotto et al.,2006). Em sua alimentação são carnívoros, alimentando-se de micro crustáceos, larvas de peixes e zooplâncton, que são sugados através do seu focinho tubular (Rosa et al.,2005). Geralmente caracterizados por uma distribuição esparsa, baixa mobilidade, pequena abrangência territorial, baixa fecundidade, cuidado parental duradouro, e fidelidade

entre parceiros. (Rosa et al.,2005; Vieira e Gasparini, 2007). A família Signathidae apresenta indivíduos populares para aquários marinhos por serem atrativos e de aparência fraca. E sendo utilizadas no consumo por populações asiáticas na culinária, medicina e suvenires (Casey et al.,2004).

Jones et al.,(2003) descrevem que durante a reprodução, os ovos postos pela fêmea são fertilizados pelo macho, que os guarda numa bolsa na base da sua cauda. Dois meses mais tarde, os ovos rompem-se e o macho realiza violentas contorções para expelir a cria. Quando nascem, são transparentes e medem pouco mais de um centímetro. (Rosa et al.,2005; Vieira e Gasparini, 2007; Freret-Meurer et al.,2009).



Figura 1. Exemplar de *Hippocampus reidi*.

Os Cavalos marinhos se localizam de maneira pontual na costa brasileira, indo do Maranhão até Santa Catarina. Vivendo em locais abrigados, como regiões de recifes e estuarinas, apresentando uma variação de profundidade de 0 a 55m (Teske et

al.,2007). Caracterizam-se por serem maus nadadores, e se ancoram à vegetação ou ao substrato através de uma forte cauda preênsil, e raramente se aventuram por mar aberto para perseguir presas móveis, sendo geralmente considerados predadores de espera (ROSA et al., 2005).

Recentemente o estado do Espírito Santo apresentou uma lista de espécies ameaçadas de extinção, na qual se encontram as duas espécies de cavalo-marinho encontradas no Brasil, *Hippocampus erectus*, muito raro na região e *Hippocampus reidi* (Figura 1), espécie utilizada no atual trabalho.

2. OBJETIVO

Diante disso, este trabalho tem por objetivos verificar a utilização de biomarcadores Genotóxicos (Micronúcleo e Ensaio Cometa), Bioquímicos (atividade enzimáticas GST e CAT), Histopatológico (análise de arcos brânquias) e a Bioacumulação corporal de metais, avaliando também a possível recuperação destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Foram utilizados 48 exemplares adultos da espécie de peixe *Hippocampus reidi* (cavalo-marinho), com aproximadamente 5 meses de vida ($8,35 \pm 0,64$ cm e peso médio de $2,07 \pm 0,42$ g). Os animais foram adquiridos no criadouro de cavalos marinhos Juan Pablo de Marco e Irmão Ltda, Serra - E.S, e transferidos para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, do Centro Universitário de Vila Velha (UVV). No laboratório, os indivíduos foram aclimatados em aquários de vidro, com capacidade de 40L(Figura 2), por um período mínimo de 15 dias, com troca periódica de água, duas vezes por semana.

A água salgada para o abastecimento dos aquários de manutenção e dos aquários testes foi proveniente de uma região da praia de Vila Velha, ES, ($20^{\circ}21'13''S$, $40^{\circ}17'02''O$). Ao ser levada para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática foi filtrada com filtros de papel em seguida a salinada era corrigida utilizando água deionizada preparada no dia. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com misidáceos congelados trazidos do criadouro. A alimentação foi suspensa 24hs antes do início dos experimentos.



Figura 2. Aclimação dos exemplares de *H. reidi*.

O trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu na utilização de 32 espécimes dispostos individualmente em aquários de polietileno, com capacidade de 3L e aeração constante. Estes animais foram expostos em três concentrações (10, 30 e 50%) (Figura 3) de efluente não tratado de uma fábrica de celulose e a um grupo controle que não apresentava o poluente ($n=8$ para cada tratamento), pelo período de 96 horas. Foi acrescentado sal marinho sintético (Coralife) no efluente para que houvesse a mesma salinidade (28 ± 1) da água marinha em que os animais se encontravam. A adição do sal marinho foi realizada de maneira gradativa e homogeneizada com agitador magnético. Um grupo de oito exemplares foi exposto individualmente em água salgada sem efluente pelo mesmo período de tempo, sendo utilizado como grupo controle. Essas concentrações foram utilizadas por se caracterizarem com efeitos subletais de acordo com testes preliminares utilizando duas concentrações (25 e 50% do efluente).

A segunda etapa do experimento consistiu na recuperação dos organismos expostos na concentração de 50% do efluente por 96hs, inclusive para o grupo controle ($n=8$). A concentração de 50% de efluente foi escolhida por apresentar as maiores alterações nos testes realizados durante a primeira etapa do trabalho. Em seguida à

exposição ao efluente, os animais foram dispostos para a recuperação de 96hs, sendo transferidos para aquários contendo água salgada sem efluente, a fim de verificar se houve uma recuperação significativa dos parâmetros testados na primeira etapa. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle.



Figura 3. Esquema de agrupamento de aquários de teste com suas respectivas concentrações de efluente.

As características físico-químicas mantidas utilizando um multiparâmetro (YSI 85) nos aquários foram: temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, oxigênio $5 \pm 0,5\text{mgO}_2/\text{L}$, e condutividade 48,5 e $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ salinidade 28 ± 1 e pH: $8,14 \pm 0,14$. Após o período de aclimação, os peixes tiveram seu status de saúde averiguado, considerando sua mobilidade nos aquários, e apresentando boas condições, as séries de experimentos foram iniciadas.

3.2. Procedimento Experimental

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. O sangue foi coletado por punção caudal (Figura 4), utilizando

seringas heparinizadas para ser utilizado nas técnicas do Ensaio Cometa e do Micronúcleo. Imediatamente após a retirada do sangue, os peixes foram sacrificados por secção cervical, de acordo com Winkaler et al.,(2007) para a remoção do tecido hepático, que prontamente foi congelado em nitrogênio líquido e mantido até o momento das análises, e para a remoção do segundo arco branquial esquerdo (Díaz et al.,2008) e armazenado em formaldeído 4%.



Figura 4. Momento da punção caudal em *H. reidi*.

3.2.1. Ensaio do Micronúcleo

O sangue foi coletado e gotejado sobre uma lâmina para a realização de extensões sanguíneas. Após seca a temperatura ambiente foi submetida a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100%) para fixação. Sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavada posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente, como descrito por Grisolia et al.,(2005), Búcker et al.,(2006). Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico (400x), 1000 células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas para a quantificação

dos micronúcleos presentes. Foram contadas 2 lâminas para cada peixe em cada tratamento (Figura 5)

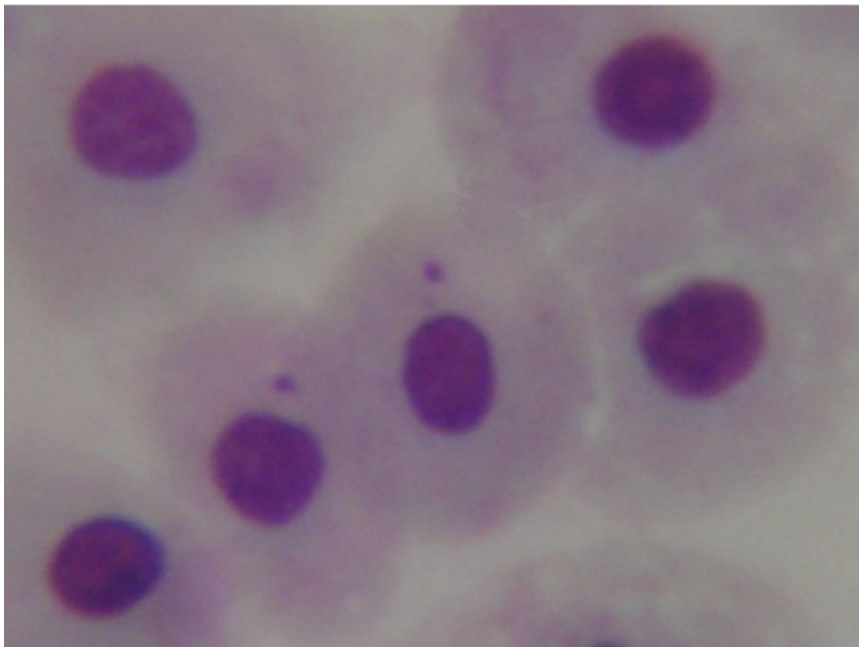


Figura 5. Eritrócitos com micronúcleos.

3.2.2. Ensaio Cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al.,(2000) e Andrade et al.,(2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 μ l do sangue diluído foi misturado com 100 μ l de agarose *low melting* (0,15g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se aderir uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise (146,1g NaCl (2,5M), 37,2g EDTA (100mM), 1,2g de Tris (10mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO) por no mínimo 2h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da

lise celular as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 min. por três vezes e lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2h a 37°C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloacético, 5% de sulfato de zinco (heptahidratado), 5% de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min. com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50mg de nitrato de prata, 50mg de nitrato de amônio, 250mg de ácido tungstosalicílico e 125µl de formaldeído)) por 15 min. a 37°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e então submersas por 5 min. em solução *stop* (ácido acético 1%). Passado os 5 min. de reação, foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram medidos e classificados posteriormente de acordo com o tamanho da cauda em 4 classes: classe 0 – sem apresenta cauda; classe 1 – cauda é menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 – cauda com variação de comprimento de 1x a 2x o diâmetro do núcleo; classe 3 – cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo (Grazeffe et al.,2008). Os resultados foram expressos em porcentagem para cada classe. O índice de danos (ID) analisado pelo teste cometa foi avaliado utilizando a somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (0 a 3). Esses valores demonstram os Danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al.,(2008).

3.2.3. Atividade Enzimática da Glutationa S-Transferase (GST - E.C 2.5.1.18) e Catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6)

O fígado dos animais, congelados em nitrogênio líquido, foram descongelados e homogeneizados com tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugados (30.000 G) por 30 min

a 4 °C, obtendo o sobrenadante utilizado para Glutathione S-transferase (GST) e Catalase (CAT).

A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando o método descrito por Habig et al.,(1974); Habig e Jakoby (1981) utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1mM GSH e 1mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340nm, em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN.

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 240 nm (Aebi, 1984). Para tanto, foi usado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10mM e tampão TE (Tris HCL 1M e EDTA 5mM), sendo as amostras diluídas 100x no tampão TE. Para leitura, 10 μ l de homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990 μ l de tampão de reação, misturadas por inversão e lidas em 240nm em um espectrofotômetro Shimadzu.

A concentração de proteínas totais, no fígado, foi determinada pelo método do biureto modificado usando um kit comercial Doles. Tal procedimento consistiu em misturar 2,5ml do reagente de biureto com 25 μ l de homogeneizado da amostra, tendo como solução padrão a mistura de 2,5ml do reagente de biureto com 25 μ l de padrão. As soluções foram homogeneizadas e, em seguida, ficou em repouso por 5min a temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2 em 550nm.

3.2.4. Preparo das Lâminas Histológicas e Análises

O material histológico foi retirado do formol e transferido para o histotécnico, aparelho no qual o material é desidratado e moldado em blocos de parafina. Após esse processo os blocos contendo o material foram cortados utilizando o micrótomo, no qual foram realizados cortes de 3 micras nas amostras. Posteriormente à realização do corte histológico, o mesmo foi fixado em lâminas de vidro e corado

com eosina e hematoxilina e em seguida fixadas com lamínulas e balsamo do Canadá.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, Leica Galen III. As análises seguiram o critério de dois filamentos em três lamelas de quatro cortes por lâmina de cada animal, sendo um animal por lâmina. A quantificação e classificação das alterações foram descritas de acordo com Negreiros et al.,(2009).

3.2.5. Bioacumulação de Metais

Os corpos dos animais, após a retirada do sangue, brânquias e fígado, foram encaminhados para uma estufa a 80°C por 48 horas. Em seguida as amostras foram calcinadas na mufla a 575°C (Figura 6) por 4 horas obedecendo a normatização descrita no manual do aparelho. As análises foram feitas em espectrômetro de plasma (ICP). Este teste foi realizado com amostras de água e efluente durante a execução do experimento.

Para todos os metais foi feita calibração, sendo que para cada metal as concentrações do padrão foram diferentes. Os metais analisados foram Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na.



Figura 6. Exemplar de *H.reidi*, calcinado.

3.3. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos (controle, expostos a 10, 30 e 50% de efluente setorial não tratado) foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste *a posteriori* de Dunnett's ($p < 0,05$) e Tukey ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico Sigma Stat 2.0. O teste t (*student*) ($p < 0,05$) foi aplicado quando os seguintes grupos foram comparados entre si: grupo exposto à recuperação de 96hs de recuperação e seu respectivo grupo controle; entre o grupo exposto à recuperação de 96hs de recuperação e o grupo exposto a 50% de efluente sem recuperação; e entre os dois grupos controles.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi aplicado em células eritrocitárias de *H. reidi* expostos a diferentes concentrações do efluente de uma fábrica de celulose. Foi observado nestas células um aumento significativo da quantidade de micronúcleo nos indivíduos expostos apenas à maior concentração do efluente (50%) em relação ao grupo controle (Figura. 7). Enquanto que não foi observado aumento significativo da quantidade de células eritrocitárias com micronúcleo nos indivíduos expostos nas demais concentrações de efluente. Já os animais colocados em recuperação, após terem sido expostos à maior concentração por 96hs, apresentaram uma possível recuperação das células sanguíneas, visto que não foi observada diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo controle. Vale salientar aqui que a quantidade de micronúcleos observados foi muito baixa, em nenhuma lâmina do grupo controle foi observado à presença de micronúcleo, e pouquíssimos micronúcleos foram observados nas células dos animais expostos ao efluente setorial, levando-se em consideração que foram contadas 1000 células em cada lâmina com réplica.

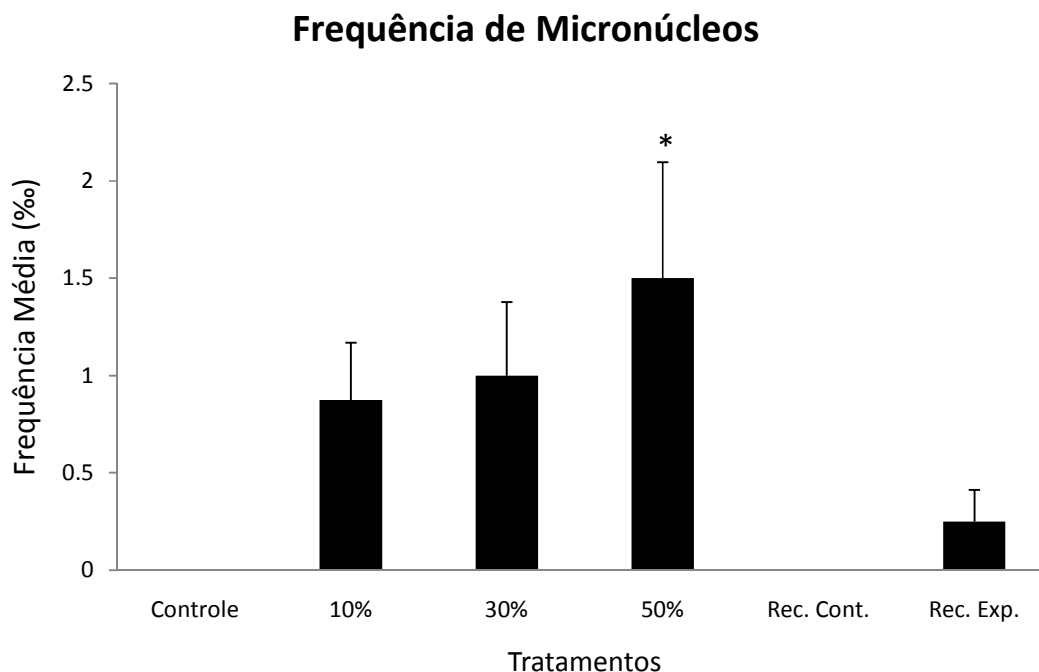


Figura 7. Frequência de micronúcleos observada nos exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a uma recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados em Média \pm Erro Padrão da Média.

4.2. Ensaio do Cometa

Os valores encontrados nos índices de danos no DNA (ID), figura 8, para os animais expostos às diferentes concentrações do efluente aumentaram significativamente à medida que a concentração aumentou, quando comparados com o grupo controle e entre eles, com exceção dos grupos expostos às concentrações de 30 e 50% que apresentaram ID similar. O grupo de recuperação exposto ao efluente não apresentou diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo controle, no entanto apresentou uma diminuição significativa nos valores de ID quando comparado ao grupo exposto à mesma concentração. Os dois grupos controles não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si.

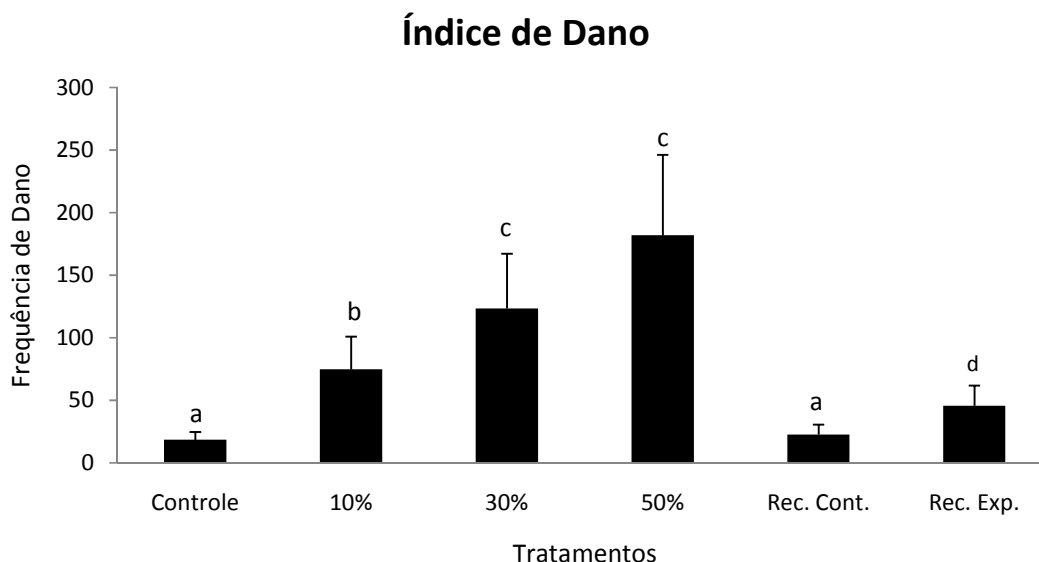


Figura 8. Frequência do Índice de Danos no DNA (Média ± Erro padrão) em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. E grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8. Os dados estão apresentados em Média ± Erro Padrão da Média. Letras indicam diferença significativa entre os grupos expostos e grupo controle ($p < 0,05$).

Ao analisar os níveis de danos no DNA representados pelas quatro classes, (tabela 2), observa-se um aumento progressivo de danos na classe 3 conforme aumenta a concentração do efluente em que os exemplares de *H. reidi* foram expostos quando comparados com o grupo controle e entre eles, não havendo diferença significativa apenas entre os grupos 30 e 50% na classe 3. Os danos na classe 2 foram significativamente crescentes entre os animais expostos nas três concentrações de efluente, só não houve aumento entre o grupo controle e o grupo exposto a 10%. Com relação aos danos na classe 1 houve aumento significativo apenas nos grupos expostos com relação ao grupo controle, não havendo diferença entre os grupos. Já a classe 0, que representa a ausência de danos, foi predominante no grupo controle e a quantidade de células nesta classe foi reduzida conforme houve aumento na concentração de efluente em que os animais foram expostos.

Com relação aos exemplares de *H. reidi* colocados em recuperação após exposição na concentração de 50%, houve uma excelente recuperação nestes parâmetros, visto que ocorreu uma diminuição significativa de danos no DNA nas classes 2 e 3 quando comparados aos peixes expostos a essa mesma concentração de efluente, embora a quantidade de danos na classe 2 nos animais em recuperação tenha sido significativamente maior em relação ao respectivo grupo controle. Houve ainda um aumento significativo na quantidade de células com danos classificados na classe 0, quando também comparados ao grupo exposto à mesma concentração. Não foram observadas diferenças entre os dois grupos controles.

Tabela 2. Nível de dano no DNA classificados em cada classe do cometa (0, 1, 2 e 3) em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), (Média \pm Erro padrão) durante 96hs. E grupo exposto à recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8 para cada tratamento.

Grupos	Nível de Dano			
	0	1	2	3
Controle	83,87 \pm 10,53 ^a	13,87 \pm 8,20 ^a	2,25 \pm 2,60 ^a	0 \pm 0 ^a
Exposto 10%	46,87 \pm 22,54 ^b	36,87 \pm 15,30 ^b	11 \pm 7,01 ^a	5,25 \pm 4,59 ^b
Exposto 30%	18,62 \pm 8,38 ^c	31,12 \pm 10,13 ^{ab}	32,87 \pm 8,32 ^b	19,87 \pm 9,07 ^c
Exposto 50%	0,62 \pm 1,06 ^d	33,75 \pm 19,38 ^b	48,62 \pm 12,16 ^c	17 \pm 12,76 ^c
Rec. Controle	77,5 \pm 8,55	22,37 \pm 9,11	0,12 \pm 0,35	0 \pm 0
Rec. Exposto	63,75 \pm 16,33 [*]	27,75 \pm 12,53	7,5 \pm 6,69 [*]	1 \pm 1,77 [*]

Letras indicam diferença significativa entre os grupos expostos e grupo controle ($p < 0,05$). * Indica diferença significativa do grupo recuperado após exposição em relação ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

4.3. Análises das Atividades Enzimáticas

A atividade de Glutathione S-transferase não apresentou alteração significativa nos animais expostos aos tratamentos quando comparados entre si e entre o controle, exceto o grupo exposto à recuperação que apresentou um aumento significativo em relação ao seu grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos controles (Figura 9).

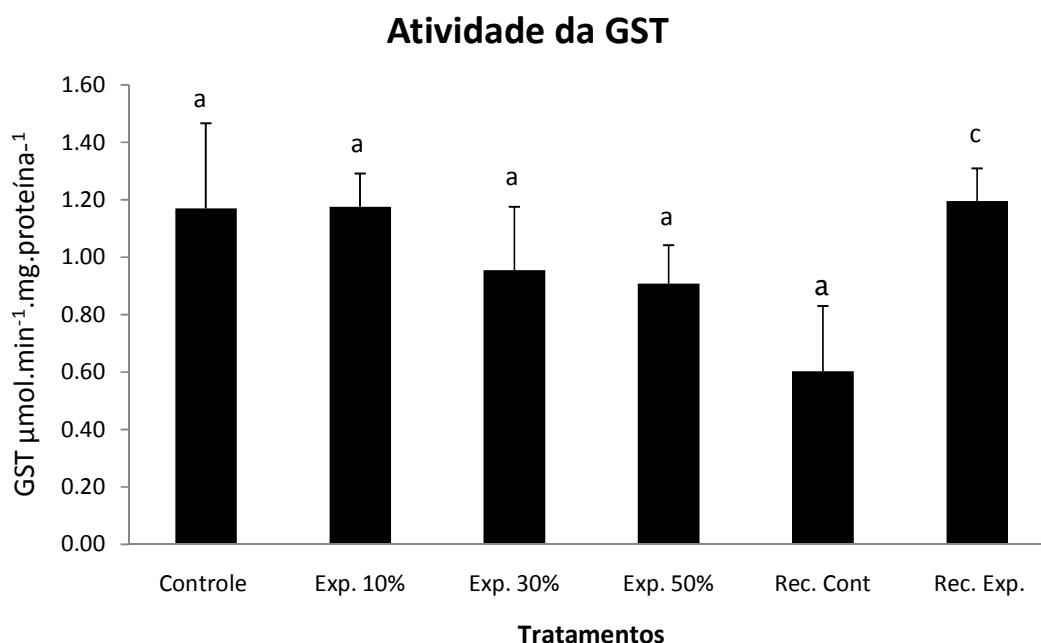


Figura 9. Atividade da enzima Glutathione S-transferase em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8 para cada tratamento. * Indica diferença significativa do grupo recuperado após exposição em relação ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$). As letras diferentes indicam entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Nos valores obtidos na análise enzimática da Catalase não foi observado diferenças significativas quando comparadas entre os grupos expostos ao efluente e entre o grupo controle. O grupo de recuperação não apresentou diferença entre o seu

respectivo grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos controles (Figura 10).

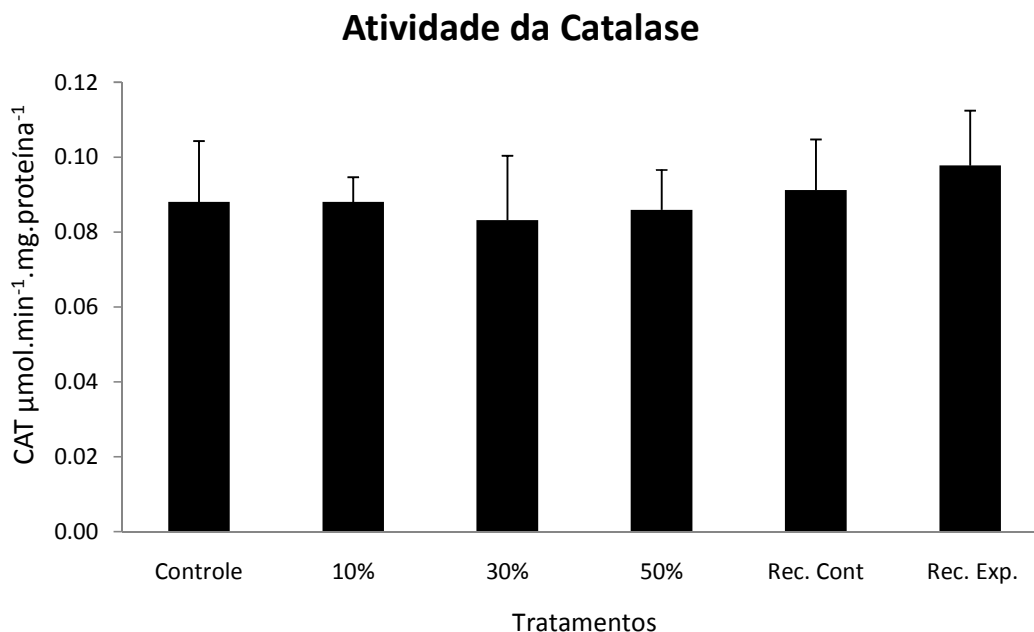


Figura 10. Atividade da enzima Catalase em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos à três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8 para cada tratamento.

4.4. Análises Histológicas

A estrutura geral das lamelas branquiais do tratamento controle de *H. reidi* se caracteriza por apresentarem filamentos curtos e bem próximos (Figura 5A). À medida que ocorre aumento do contato com os poluentes os filamentos se tornam mais alongados e sem forma padrão (Figura 5B). Na concentração de 50% de efluente os filamentos apresentam de maneira bem distorcida. Em relação aos peixes utilizados na recuperação não se notou muita alteração comparando o controle da recuperação, no entanto, ao comparar o tratamento exposto a 50% e as brânquias dos animais após recuperação, nota-se que os filamentos encontravam-se em um processo de reorganização. As brânquias do *H. reidi* apresentaram-se de

maneira similar à maioria dos peixes teleósteos. O epitélio filamentososo consiste em camadas numerosas de células lamelosas (Figura 11).

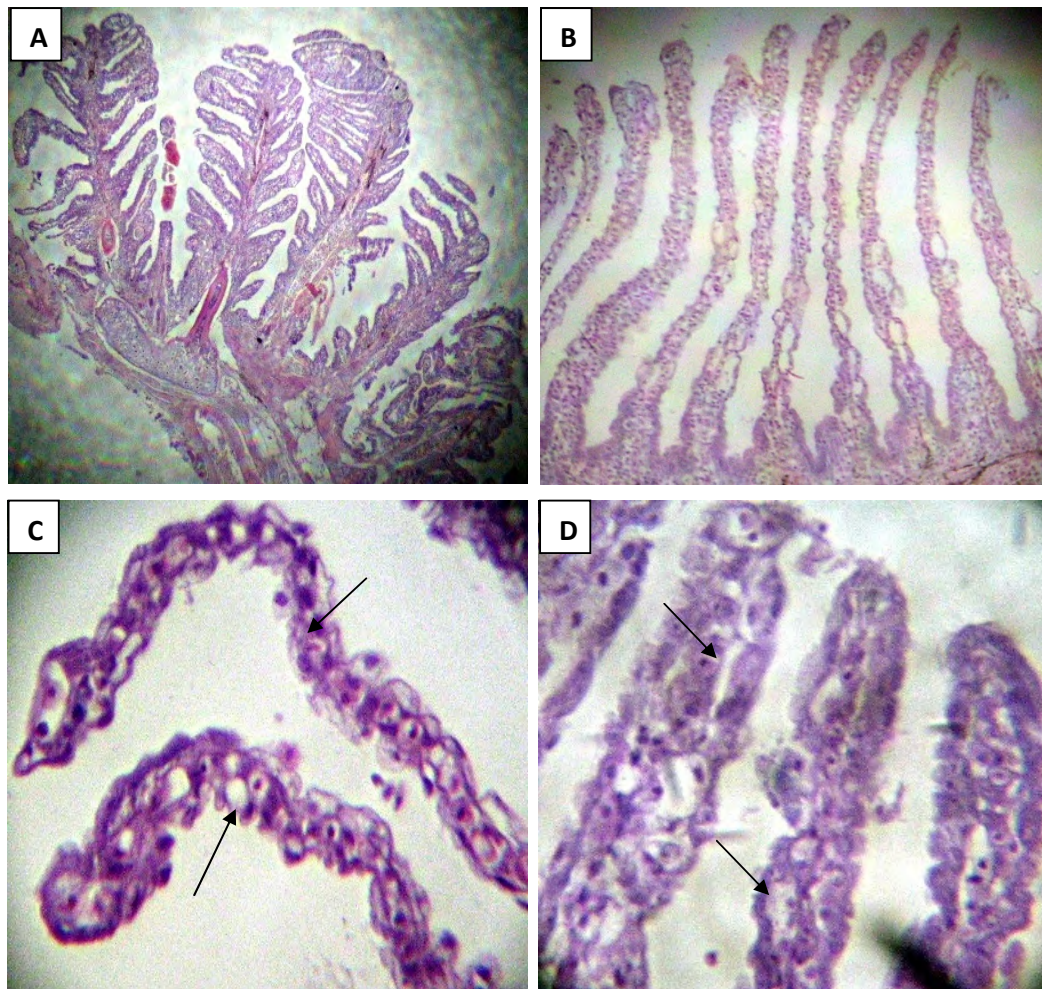


Figura 11. A. Morfologia das lamelas brânquias do grupo controle de *Hippocampus reidi* (M. O. 40X). B. Lamelas alongadas (M. O. 100X), C. Hiperplasias (setas) (M. O. 400X) e D. Descolamento epitelial (setas) (M. O. 400X) dos exemplares de *H. reidi* expostos na concentração de 50% de efluente setorial não tratado de fábrica de celulose.

As mudanças observadas nas lamelas branquiais de *H. reidi* expostos ao efluente setorial de uma fábrica de celulose foram hipertrofia, hiperplasia epitelial, fusão lamelar: completa e incompleta e dilatação capilar (Tabela 3). Estas alterações foram observadas em todos os grupos expostos ao efluente.

Tabela 3. Média da freqüência e estágio de severidade das diferentes alterações histopatológicas dos exemplares da espécie *Hippocampus reidi* expostos às diferentes concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose, durante 96hs (n=8), incluindo o grupo recuperado 96 hs após exposição à concentração de 50% do efluente por 96 hs e seu respectivo grupo controle.. Estágio de **nível I** engloba danos pontuais e reversíveis; estágio de **nível II** engloba danos pontuais e irreversíveis; estágio de **nível III** engloba danos extensos e irreversíveis.

Alterações histopatológicas	Estágio	Controle	Conc.	Conc.	Conc.	Rec.	Rec.
			10%	30%	50%	Cont	Expo
Hipertrofia	I	***	***	***	***	***	***
Descolamento epitelial	I	A	*	*	*	*	*
Fusão lamelar completa	II	A	*	*	*	A	*
Fusão lamelar parcial	I	*	*	*	*	*	*
Hiperplasia	I	A	A	A	A	A	*
Constricção capilar	I	A	A	A	A	A	A
Dilatação capilar	I	*	*	*	*	*	*
Congestão lamelar	I	A	A	A	A	A	A
Aneurisma lamelar	II	A	A	A	A	A	A
Ruptura epitelial	II	A	A	A	A	A	A
Proliferação do epitélio do filamento	I	A	A	A	A	A	A
Enrolamento da região apical da lamela	I	A	A	A	A	A	A
Alteração do sistema de células pilares	II	A	A	A	A	A	A
Proliferação de células de cloreto	I	A	A	A	A	A	A
Proliferação de células mucosas	I	A	A	A	A	A	A
Secreção de muco	I	A	A	A	A	A	A
Necrose	III	A	A	A	A	A	A

“A” representa a ausência do dano; (*) danos pouco ou raramente freqüentes (1 a 5 observações); (**) danos freqüentes (6 a 15 observações); (***) danos muito freqüentes (16 a 30 observações).

O índice de alteração histopatológica das brânquias (Figura 12) não apresentou variações significativas entre os diferentes tratamentos ($P>0,05$). Os níveis de

alterações das brânquias dos peixes de todos os tratamentos foram considerados normais, por apresentarem valores de IAH inferior a 10.

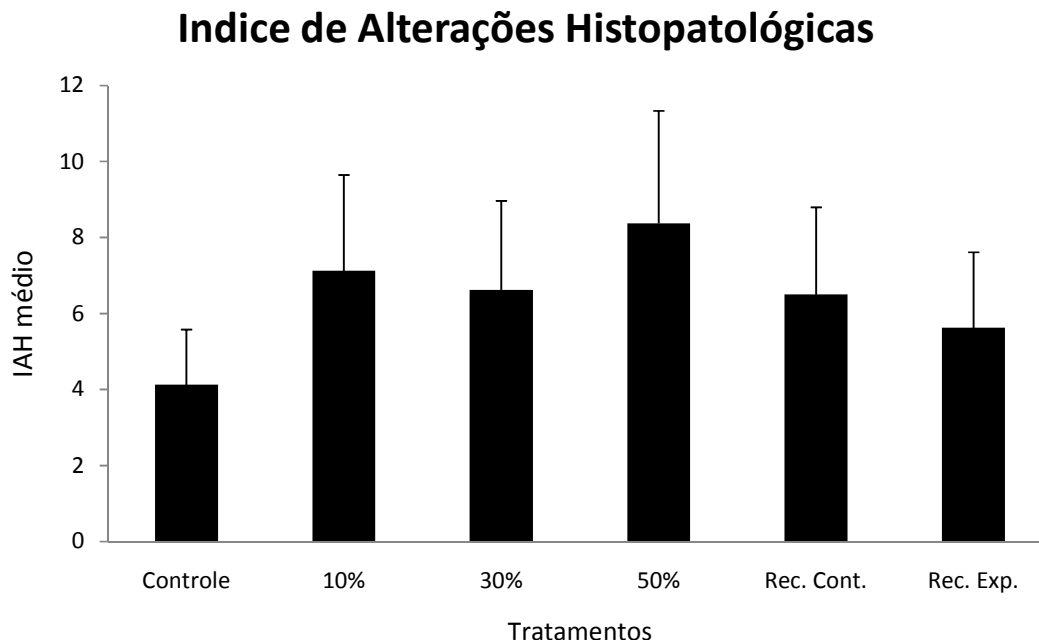


Figura 12. Índice de alteração histopatológica (IAH) médio dos exemplares da espécie *Hippocampus reidi* expostos às diferentes concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose, durante 96hs (n=8), incluindo o grupo recuperado 96hs após exposição à concentração de 50% do efluente por 96hs e seu respectivo grupo controle.

4.5. Bioacumulação de Metal Traço

A tabela 3 apresenta os valores encontrados dos elementos-traço em todas as amostras de água: marinha sem contaminação, efluente sem diluição, efluente após a diluição em água salgada e amostras de água coletadas nos aquários após a exposição às três diluições do efluente (10, 30 e 50%), incluindo o grupo controle. Também foram analisadas amostras de água referentes ao grupo colocado em recuperação após exposição na concentração de 50% e seu respectivo grupo controle. Para estes dados não foi aplicado teste estatístico em virtude de ter sido feita apenas uma medida.

Os valores elevados de Cálcio, Magnésio, Sódio e Potássio apresentados na tabela 4 justificam-se pelas características naturais da água marinha. Ressaltando que os elementos Sódio e Potássio são presentes no processo de branqueamento (Kraft) utilizados nas fibras de celulose.

Tabela 4. Níveis de metais traço (ppm) presentes na água dos tratamentos antes e após os testes com exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. E o grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle para cada tratamento.

Observação	Al	Ba	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na
Água Salgada inicial	0,19	0,17	352,84	0,02	0,17	343,94	1179,65	0,00	9483,59
Efluente Inicial	0,56	0,36	23,65	0,03	1,15	20,98	5,59	0,14	865,51
Efluente Salgado	0,81	0,83	385,53	0,15	0,84	365,29	1061,56	0,33	7408,85
Controle	0,16	0,16	348,31	0,03	0,24	350,90	1127,47	0,00	9496,52
Tratamento 10%	0,18	0,22	359,27	0,04	0,46	367,09	1144,70	0,09	8959,25
Tratamento 30%	0,23	0,12	365,78	0,08	0,22	366,15	1126,78	0,07	8701,58
Tratamento 50%	0,79	0,29	388,78	0,03	0,26	392,74	1098,01	0,10	9137,69
Água da recuperação	0,29	0,06	391,72	0,03	0,25	375,47	1269,42	0,02	9103,40
Controle Rec.	0,42	0,31	356,00	0,03	0,27	340,34	1140,06	0,01	8888,28
Teste 50% Rec.	0,54	0,29	374,65	0,06	0,49	356,88	1095,43	0,13	8329,17
Controle recup.	0,42	0,08	353,12	0,02	0,24	337,60	1129,54	0,01	8733,59
Tratamento 50% recuperado	0,67	0,13	359,40	0,08	0,34	343,06	1158,50	0,01	8982,15

A tabela 5 demonstra as concentrações de elementos traço presente nos corpos nos exemplares de *H. reidi* (com exceção das brânquias e fígado) analisados após o

término do experimento. Não foi encontrado um acúmulo significativo desses metais nos organismos dos peixes expostos às diferentes concentrações de efluente.

Tabela 5. Níveis de bioacumulação de metais traço (ppm) presentes em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos a três concentrações de efluente setorial de uma fábrica de processo de celulose: 10, 30 e 50%, e mais o grupo controle (sem efluente), durante 96hs. Além do grupo exposto a recuperação de 96 horas após exposição na concentração de 50% de efluente, acompanhado do seu grupo controle. n=8 para cada tratamento.

Elementos	Tratamentos					
	Controle	Conc. 10%	Conc. 30%	Conc. 50%	Rec. Cont.	Rec. Exp.
Alumínio	60,40 ±	62,71 ±	39,83 ±	43,27 ±	25,95 ±	73,54 ±
	42,16	27,66	18,61	14,23	9,29	8,59
Bário	11,60 ±	13,86±	11,08 ±	19,77 ±	6,06 ± 0,67	9,04 ± 1,98
	2,51	48,56	3,70	15,56		
Cálcio	84905,87 ±	101815,27±	92155,58 ±	90009,76 ±	75411,81 ±	105193,0 ±
	11824,88	22329,34	26611,30	12871,34	28062,84	32728,04
Cobre	7,98 ± 5,13	13,50 ±	13,54 ±	24,52 ±	5,10 ± 2,33	13,06 ±
		9,42	10,43	20,02		3,43
Ferro	60,34 ±	79,67 ±	65,15 ±	70,76 ±	43,04 ±	78,96 ±
	23,06	19,47	21,24	15,02	18,09	11,41
Magnésio	2659,75 ±	3072,71 ±	3069,65 ±	2914,73 ±	1927,59 ±	3118,22 ±
	530,69	679,03	931,29	558,83	679,78	648,95
Manganês	25,53 ±	41,97 ±	28,24 ±	28,71 ±	22,75 ±	30,68 ±
	2,22	15,52	8,26	4,43	8,38	7,59
Potássio	0,65 ± 0,13	0,64 ± 0,13	0,72 ± 0,20	0,63 ± 0,13	0,59 ± 0,21	0,52 ± 0,05
Sódio	15243,32 ±	16655,84 ±	16996,64 ±	19235,78 ±	11780,83 ±	20815,11 ±
	2281,33	3475,62	4467,92	3666,27	4113,63	3497,11

5. DISCUSSÃO

5.1. Ensaio Do Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, formados por fragmento cromossômico separados do núcleo principal e perdidos durante a fase de mitose celular. Este fato pode ocorrer de maneira natural caso ocorra falha no sistema de reparação da célula ou pode ocorrer devido à presença de compostos xenobióticos de origem orgânica ou inorgânica, que influenciam no aumento da formação de micronúcleo (Cavalcante et al.,2008).

A avaliação genotóxica por meio do teste do micronúcleo nos exemplares de *H. reidi* apresentou um pequeno aumento apenas nos exemplares expostos na concentração mais elevada do efluente da fábrica de celulose em comparação ao grupo controle, muito embora essa quantidade de micronúcleos encontrada tenha sido baixa. Estes resultados indicam que apenas altas concentrações desse efluente são capazes de causar danos genotóxicos nos eritrócitos desses indivíduos. Rocha et al.,(2009), analisaram o potencial genotóxico em *Oreochromis niloticus* coletados em 5 pontos do rio Tietê (São Paulo, Brasil), e verificaram um aumento significativo da frequência de micronúcleos, comparando com seu respectivo controle, principalmente nos animais coletados no ponto que recebe um maior lançamento de efluentes industrial e doméstico.

Com relação a essa baixa incidência de micronúcleos observada nos exemplares de *H. reidi* expostos ao efluente da fábrica de celulose, Gravato et al (2002) também descreveu em seu trabalho essa baixa incidência de micronúcleos em eritrócitos de juvenis de *Dicentrarchus labrax* expostos a uma concentração constante de um dos compostos existentes em um efluente de fábrica de celulose (Aveiro, Portugal), em diferentes tempos. Explicação esta que pode ser aplicada aos resultados obtidos no presente trabalho, em que as concentrações das diversas substâncias presentes no efluente setorial dessa fábrica de celulose nas três dosagens testadas (10, 30 e 50%) não foram suficientes para causar danos genotóxicos mais pronunciados nos eritrócitos dos exemplares de *H. reidi*. Em contraste com os resultados obtidos no presente trabalho, exemplares de *H. reidi* apresentaram uma quantidade de

micronúcleos muito maior quando expostos por apenas 8hs ao óleo cru em testes realizados em nosso laboratório (dados ainda não publicados). O que nos leva a sugerir que o potencial genotóxico do petróleo é maior do que das substâncias presentes no efluente setorial da fábrica de celulose.

Cavas et al.,(2005) descrevem que as espécies *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio* e *Corydoras paleatus* expostas a metais traço (Cu,Cr e Cd), pelos períodos de 14 e 21 dias, apresentaram valores médios menores que um micronúcleo por lâmina, exceto em *Cyprinus carpio*. De forma que todas as espécies de peixes usadas neste estudo exibiram respostas similares, com exceção da espécie *C. carpio* que apresentou maior quantidade de micronúcleo ao ser exposto ao Cu.

De acordo com Grisolia et al.,(2005), os exemplares de *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis rendalli* coletados em uma lagoa artificial a qual recebe efluente com diferentes tratamentos de esgoto também apresentaram uma baixa taxa de micronúcleos. Segundo os autores, a ausência de alterações genotóxicas significativa pode indicar um risco genotóxico menor, porém sem descartar a ocorrência de alterações.

O tempo de exposição pode ter sido outro fator que influenciou nestes resultados, visto que as células têm que realizar processos de divisão celular durante o tempo de exposição para que ocorra a presença de micronúcleos, já que estes são fragmentos cromossômicos separados do núcleo principal e que são perdidos durante a mitose, sendo considerados erros (clastogênicos e aneugênicos) presentes no ciclo celular de células eucariotas (Gustavino et al.,2005). Sendo assim, para a obtenção de mais células com micronúcleos seria necessária uma exposição prolongada variando entre um e dois meses de exposição

5.2. Ensaio Cometa

De acordo com diretrizes internacionais, o ensaio do cometa é um método de quantificação de danos no DNA bem validado que pode ser usado com confiabilidade elevada na avaliação de alguns organismos expostos a efluentes (Grazeffe et al.,2008). Este ensaio oferece vantagens consideráveis sobre os outros

métodos citogenéticos, por exemplo, os testes de identificação da presença de aberrações de cromossoma, da troca de cromátide irmã e até mesmo do teste do micronúcleo usados para a detecção de dano ao DNA, visto que no ensaio do cometa as células não precisam estar em fase mitótica ativa (Andrade et al.,2004).

Poucos são os trabalhos que avaliaram o efeito de efluentes de fábrica de celulose sobre a incidência de danos no DNA de peixes. No entanto esta ferramenta na avaliação do potencial mutagênico deste efluente ambiental apresentou-se como sendo de excelente sensibilidade, visto que houve um aumento gradativo do ID conforme aumento das concentrações de efluente da fábrica de celulose em que os exemplares de *H. reidi* foram expostos em comparação ao grupo controle. Shumathi et al., (2001), utilizando *Cyprinus carpio* como bioindicador para cinco concentrações (0, 1, 2, 5 e 10%) de efluente de fábrica têxtil em diferentes tempos de exposição (3, 9, 15, 21 e 28 dias) descreve um aumento nos níveis de danos a medida que aumenta a concentração do efluente.

Segundo Frenzilli et al.,(2008), o ensaio cometa pode demonstrar a toxicidade de diversos compostos unidos ou elementos distintos. E dessa forma demonstra sua efetividade como biomarcador para diversos efluentes, conforme testado em vários trabalhos em diferentes espécies de peixes, tais como na espécie *O. niloticus* exposta a concentrações gradativas de ácido domóico (Cavas e Konen, 2008), onde os resultados observados foram similares aos obtidos no presente trabalho. Estes resultados também foram obtidos para a mesma espécie alvo deste estudo, o *H. reidi*, exposto a três concentrações de óleo cru em estudos realizados pelo nosso laboratório (dados ainda não publicados). Vanzella et al.,(2007), também observaram aumento significativo no ID de exemplares de *Prochilodus lineatus* expostos a hidrocarbonetos leves por 96hs e 15 dias. De acordo com Lemos et al.,(2005) essa indução na quebra do DNA é favorecida quando ocorre um aumento gradativo de poluentes no meio, levando conseqüentemente a um aumento do nível de danos em concentrações mais elevadas. Simoniello et al.,(2009), referem que a interação de agentes genotóxicos com DNA podem contribuir para um nível do aumento de rupturas das bases nucleicas motivando o aumento de danos no DNA. Conseqüentemente, se não houver reparo do DNA poderá ocorrer efeitos em cascata resultando em alterações a níveis celulares e fisiológicos.

A intensidade de danos no DNA pode ser observada por meio da avaliação da quantidade de danos presentes em cada classe. Os indivíduos de *H. reidi* expostos nas concentrações mais elevadas do efluente da fábrica de celulose (30 e 50%) apresentaram uma quantidade maior de danos na classe mais alta (3), quando comparadas aos animais do grupo controle e aos expostos na concentração de 10%. Sendo as classe 0 e 1 predominantes nestes grupos respectivamente. Zhu et al.,(2004) ao induzir *Cyprinus carpio* a diferentes concentrações de cobre, cromo e cádmio e diferentes tempos (0, 10, 20, 30 e 40 Dias) foi observado um aumento significativo até a metade do tempo exposto após este período foi constante o numero de danos no material nuclear encontrados.

A avaliação da recuperação de animais após exposição a efluentes é fundamental para saber o grau de dano sofrido no organismo e suas consequências. Quando a recuperação é mais rápida indica danos leves ocorridos e que o organismo foi capaz de se defender com descrito por Amado et al.,(2006). No entanto quando há lentidão na recuperação indica que esse organismo foi seriamente afetado, podendo ter atingido não apenas os níveis mais baixos da organização biológica (molecular e bioquímico), mas também os níveis fisiológicos.

No presente trabalho, os exemplares de *H. reidi* apresentaram uma excelente recuperação após exposição à concentração de 50% por 96hs, visto que os resultados obtidos para estes indivíduos, tanto com relação ao ID quanto em relação aos níveis de classes de danos, foram significativamente menores quando comparados aos animais expostos a essa mesma concentração, embora esses resultados ainda tenham sido elevados quando comparados ao seu respectivo grupo controle. Estes resultados sugerem que o tempo de 96 h ainda não foi o suficiente para que todo o dano no DNA causado pelo efluente da fábrica de celulose tenha sido reparado na espécie *H. reidi*. De acordo com Grazeffe et al.,(2008), o aumento da concentração de efluente induz a ocorrência de mais danos no material genético, fazendo com que o sistema de reparo da célula seja induzido a fazer reparos. Contudo ao retirarmos o efluente é esperado que o nível de recuperação seja acelerado. Hook e Lee (2004) ao exporam camarões, *Palaemonetes pugio*, a benzo-a-pireno e ao cromo, descreve um forte dano gradativo no DNA, no entanto, ao

repetir as análises 7 dias depois, sem contato com o efluente, observou uma diminuição do nível de dano.

5.3. Atividades Enzimáticas

O fígado é um órgão que executa várias funções associadas com o metabolismo de xenobióticos em peixes. A Glutathione S-transferase (GST) é um grupo de enzimas que catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de metabólitos, e está envolvida na desintoxicação de reativos e radicais de oxigênio (Langiano e Martinez, 2008).

Vanzella et al.,(2007) relatam que a degradação do material genético pode estar correlacionada com a atividade enzimática da GST, dependendo do grau do efluente a qual a espécie teste é relacionada. No atual trabalho, a atividade enzimática da GST não demonstrou variação quando os animais mantiveram-se em contato com efluente de fábrica de celulose nas três concentrações testadas no tempo de 96hs. Camargo e Martinez (2006) sugerem que a não observação de um aumento significativo na atividade dessa enzima em animais expostos a efluentes pode ser ocasionado pelo curto tempo de exposição e à baixa atividade de compostos exógenos. Esta explicação também pode ser sugerida para os resultados obtidos neste trabalho. Provavelmente a exposição a um período maior provocasse ativação dessas enzimas, ou o fato foi devido à composição do efluente, que assim como nos resultados do micronúcleo, o conjunto de substâncias presentes no efluente não possuem um efeito agressivo às células em 96h de exposição. Esses dados são corroborados com a observação feita por Schreck et al.,(2009) na qual a atividade enzimática da GST pode não apresentar alterações relevantes quando os animais foram expostos a efluente de origem orgânica.

No entanto Amado et al.,(2006), relataram que atividade enzimática da GST em *Paralichthys orbignyanus* declina em contato com xenobiótico de origem orgânica quando o mesmo é presente no ambiente. Porém é esperado que ocorra a elevação da atividade da GST, visto que essa enzima está associada aos mecanismos de desintoxicação do organismo quando em presença de outros xenobióticos no ambiente. Teles et al.,(2005) e Filipak Neto et al.,(2007) ressaltam o aumento da

atividade enzimática em *Sparus aurata* exposta a 17 hs ao estradiol combinado a 4-nonylphenol e em *Hoplias malabaricus* quando expostas a uma mistura complexa de halogenados lipofílicos, por 48 horas respectivamente. Na realidade, a integração de xenobióticos na biota aquática pode afetar o funcionamento de grupos de enzimas detoxificadoras como a GST que é uma enzima de catalização conjugada com vários componentes eletrolíticos como a glutathione reduzida (Almeida et al.,2005).

Ao mesmo tempo em que os exemplares de *H. reidi* expostos ao efluente de uma fábrica de celulose não apresentaram alterações significativas na atividade da enzima GST, o grupo exposto à recuperação apresentou aumento na atividade dessa enzima quando comparado com o respectivo grupo controle. Se fossem observados apenas estes valores, poderia ser dito que o tempo de 96 h foi curto para que a atividade retornasse aos valores basais, porém estes valores encontrados não diferem do grupo exposto à 50% e seu respectivo grupo controle. Simonato et al.,(2006) avaliaram a atividade enzimática da GST em *P. lineatus* expostos por 24h, 48h, 96h e 15 dias a fração solúvel de óleo diesel e observou-se que apenas com 15 dias de exposição a atividade enzimática se apresentou diferente significativamente ao seu controle, demonstrando assim que esta enzima pode ser usada como um biomarcador de longo prazo.

Almeida et al.,(2005) e Winkaler et al.,(2007) descrevem a catalase como uma enzima antioxidante que interage com fluxo de oxigênio reativo em O_2^- , H_2O_2 e OH^- , com princípio de retirar radicais livres que são evidenciados pela presença de elementos exógenos nos indivíduos. No atual trabalho, a atividade enzimática da CAT analisada em *H. reidi* expostos ao efluente de fábrica de celulose também não demonstrou alterações significativas entre os tratamentos, assim como na enzima GST, provavelmente devido ao curto tempo de exposição dos animais e ao conjunto de substâncias presentes neste efluente. De acordo com Pinho et al.,(2005), a atividade enzimática da GST e CAT são alteradas pela indução de compostos oxidativos presentes no ambiente, no entanto, é passível de não ocorrer a interação destes compostos no ambiente com os animais estudados. Camargo e Martinez (2006) ressaltam ainda que diversos compostos não provocam alterações significativas em peixes se comparados com seus controles na atividade enzimática

da catalase em peixes quando é exposta a PAHs, a PCBs e também a efluente de fábrica de celulose.

Alvarez-Munoz et al.,(2009), descrevem que a atividade enzimática da catalase pode ser amplificada quando o animal está em um processo de biotransformação e em contato com poluentes que apresentam alto valor de toxicidade. Segundo Avilez et al.,(2008), algumas espécies de peixes apresentam alteração na expressão enzimática apenas quando há um estresse oxidativo nas células, do contrário não ocorrerá esse aumento na atividade da enzima. Os dados obtidos no presente trabalho com relação às alterações enzimáticas da GST e CAT nos leva a sugerir que o efluente dessa fábrica setorial de processamento de celulose possui um baixo poder oxidativo sobre as células da espécie *H. reidi*. Diante disso, o uso das enzimas GST e CAT como biomarcadores de contaminação por efluente de uma fábrica de celulose em *H. reidi* não se mostram efetivas neste tipo de efluente na espécie estudada.

5.4. Análises Histológicas

As alterações histopatológicas observadas em brânquias dos peixes são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição de poluentes diferentes aos peixes (Biagini et al.,2009). Segundo Camargo e Martinez (2007), essas alterações podem ser de vários tipos, como elevação do epitélio, hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais, além da fusão parcial de algumas lamelas secundárias. Sendo a presença dessas alterações exemplos de mecanismos de defesa, visto que, no geral, resultam em um aumento da distância entre o meio externo e o sangue, servindo portanto, como uma barreira contra a entrada de efluentes.

Para todos os grupos, os valores obtidos não demonstraram danos significantes, não caracterizando risco a sobrevivência dos indivíduos, apresentando se reversíveis, apesar disso, os indivíduos que apresentam essas alterações se tornam mais vulneráveis em situações como a necessidade de fuga ou de captura de alimento, por apresentarem uma redução na capacidade de oxigenação sanguínea.

Os resultados obtidos no atual trabalho com a exposição de *H. reidi* ao efluente setorial de fábrica de celulose, mostram que esse efluente não provocou toxicidade suficiente capaz de modificar o epitélio branquial de forma irreversível no prazo de 96 h, como demonstrado pelo índice de alteração celular. De acordo com Cengiz e Unlu (2006), os níveis de alterações branquiais variam de acordo com o efluente utilizado e o prazo de exposição. Costa et al.,(2009), averiguou impactos causados pela presença de metais traço em sedimentos em uma região de estuários (Lisboa, Portugal), e também não observou alterações significativas ao analisar as brânquias de *Solea senegalensis* em dois tempos de exposição 14 e 28 dias, período este maior do que o realizado neste trabalho. As lamelas desses exemplares apresentaram apenas um elevado número de hipertrofias, que segundo os autores, foi causada pela elevada atividade metabólica da espécie. Garcia-Santos et al.,(2007) descrevem que dilatações capilares ocorrem devido ao aumento do fluxo sanguíneo nas lamelas podendo conduzir a ruptura das células epiteliais induzindo ao aparecimento de aneurismas lamelares. A presença de dilatação capilar de *H. reidi* não expostos ao efluente não se caracteriza como dano uma vez que o comprimento do capilar não se alterou se comparados com os demais tratamentos.

Kumari et al.,(2009) analisaram exemplares de *Rita rita* coletados no rio Ganges, em Varanasi (Índia), e observaram apenas alterações nas células mucosas e nas células pilares, por provavelmente elevarem o funcionamento das mesmas, o que leva a uma produção maior da quantidade de muco e dessa forma funciona como um mecanismo de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente. Simonato et al.,(2006), em estudo envolvendo a exposição de peixes da espécie *P. lineatus* à fração solúvel do óleo diesel, constataram a ocorrência de alterações histopatológicas como o descolamento epitelial, que foi considerado como uma alteração com fim adaptativo, pois visava proteger o organismo da entrada de agentes xenobióticos.

Rombough (2007) descreve a hipótese que mesmo apresentando contato direto com o meio externo, as brânquias apresentam proteção maior do opérculo, variando em fases de vida dos indivíduos e espécie. Característica essa bem evidente na morfologia de *H. reidi* que além da proteção do opérculo apresenta uma pequena membrana que diminui o contato com substância xenobióticas na água. Diante

dessas observações, o efluente de fábrica de celulose não demonstrou ser um efluente que provoque alterações histopatológicas em brânquias de *H. reidi* no prazo de 96hs e nas condições do ensaio.

5.5. Bioacumulação De Metal Traço

Pequenas quantidades de metais ocorrem de forma natural no ambiente aquático, contudo a atividade industrial, com o lançamento de efluentes, tem elevado essas concentrações (Carvalho et al.,2000), podendo acarretar bioacumulação nos organismos dos diversos níveis tróficos e gerar alterações genotóxicas e mutagênicas e enzimáticas (Adhikari et al.,2008).

Jesus et al.,(2004) descrevem que a região da grande Vitória (Espírito Santo) apresenta uma formação geomorfológica com metais traço de Na, Ca, Mg, K, Cu, Mn Zn, Pb, óxidos hidratados de Fe e Mn com associações de Al e Fe. Caracterizando assim os elementos que possivelmente são encontrados adsorvidos na água. De acordo com Adhikari et al.,(2008), a disposição de cada elemento químico lançado em um corpo hídrico se apresenta de maneira variada. Assim como os níveis de elementos traços como Cr e Cu encontrados no tecido muscular e nas brânquias de *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala*, *Oreochromis mossambicus*, e *Cyprinus carpio* em uma lagoa que recebe despejo de esgoto em Kolkata, Índia. Virga et al.,(2007) ponderam que a baixa concentração de metais acumulados em tecidos de siris azuis (*Callinectes* sp.) está relacionado a fatores fisiológicos, além da maneira como esses animais eliminam e estocam determinados efluentes.

A bioacumulação de metais traço em exemplares de *H. reidi* expostos ao efluente setorial não tratado de fábrica de celulose não foi significativa nos exemplares expostos aos três tratamentos, característica essa que não apresentou relevância para acumulação provavelmente devido ao curto tempo ao qual os indivíduos foram expostos. De acordo com Burger et al.,(2002), a acumulação de diversos metais traço em peixes ocorre de maneira gradativa e lenta por fatores bióticos como hábitos alimentares, idade dos indivíduos e tempo de contato com o poluente. Li et al.,(2009) relataram em seu trabalho que o aumento da bioacumulação de metais

em tecidos de *Onchidium struma* coletados na região estuarina de Yangtze, China está ligada a dois fatores determinantes temperaturas mais elevadas sendo somadas ao longo prazo de exposição aos elementos uma vez que a exposição a vários metais traço por pouco tempo não representaria a bioacumulação total dos elementos.

Outro fator a ser levado em consideração para este trabalho é que estas análises de bioacumulação realizadas no corpo dos exemplares de peixes não constavam com as brânquias e principalmente o fígado, órgão de contato inicial direto com o poluente em questão e órgão responsável pela detoxificação do organismo, respectivamente, uma vez que estes foram utilizados para outras análises. Muito provavelmente estes seriam os primeiros órgãos a bioacumularem os metais. Para que houvesse uma bioacumulação nos demais órgãos haveria a necessidade de uma exposição a um período mais longo. Assim como é descrito por Martins e Bianchini (2008) em alevinos de *Trachinotus marginatus* expostos a diferentes concentrações de sulfato de cobre por 96 horas.

Segundo Khan (2009), o lançamento de efluente de fábrica de celulose causa impacto direto a biota aquática e em especial na saúde de algumas espécies de peixes. Algumas espécies de peixes que vivem em regiões que recebem efluente de fábrica de celulose apresentam uma predominância elevada de lesões epidérmicas; um aumento de índices de alterações hepáticas, modificações na maturação das gônadas, uma variedade de lesões nas brânquias e rins comparados com amostras dos locais da referência sem influência de efluente (Khan e Hooper, 2000; Landman et al., 2008). Essa variedade de respostas foi observada em peixes que vivem em locais que recebem esse tipo de efluente, ou seja, a exposição por longos períodos de tempo permite que sejam observados danos mais pronunciados/evidentes. O tempo de exposição em que os exemplares de *H. reidi* foi curto para que os componentes presentes no efluente setorial da fábrica de celulose utilizado neste trabalho provocassem alterações mais significativas com relação aos biomarcadores testados, com exceção dos danos no DNA, observados pelo ensaio cometa.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que os danos no DNA, descrito pelo ensaio cometa, mostrou ser significativamente sensível, ao demonstrar

os níveis de danos e a recuperação dos exemplares de *Hippocampus reidi* expostos ao efluente em questão. O teste do micronúcleo, mesmo não se mostrando tão positivo quanto o ensaio cometa, pode ser usado como biomarcador para exposições em altas concentrações, ou então expor os animais por um prazo mais longo. Também demonstrou que pode ser utilizado como biomarcador em experimentos de recuperação. As atividades enzimáticas da GST e CAT não apresentaram relevância quando medidas em exemplares de *Hippocampus reidi* expostas ao efluente setorial de fábrica de celulose, precisando ser reavaliadas se houver o intuito de usá-las como biomarcadoras para a espécie em questão e para este tipo do efluente, aumentando talvez o tempo de exposição, assim como proposto para o micronúcleo, ou então investigando outras enzimas. Em relação à bioacumulação de metais traço, mais uma vez o curto tempo de exposição não foi suficiente para demonstrar a bioacumulação, e os órgãos a serem avaliados devem ser mais direcionados às brânquias e ao fígado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO

- A utilização de biomarcadores de resposta rápida é favorável para demonstrar alterações ambientais causadas por xenobióticos complexos.
- O efluente setorial não tratado de fábrica de celulose não apresenta grande toxicidade para esta espécie marinha avaliada em 96hs de exposição.
- E o ensaio cometa é o mais indicado como biomarcador de contaminação para este efluente.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS M. B.; GROSS K. A.; NOWAK B. F. Branchial mechanical injury does not accelerate the progression of experimentally induced amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Aquaculture**, v. 290 p. 28-36, 2009.

ADHIKARI S.; GHOSH L.; RAI S. P.; AYYAPPAN S. Metal concentrations in water, sediment, and fish from sewage-fed aquaculture ponds of Kolkata, India. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 2008.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method. Enzim.**, 121-126. 1984.

AKCHA F.; HUBERT F. V.; PFHOL-LESZKOWICZ A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mut. Res.**, v. 534 p.21–32, 2003.

ALI D.; KUMAR S. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. **Scie. total environ.**, v. 405, p.345 – 350, 2008.

ALMEIDA J. S.; MELETTI P. C.; MARTINEZ C. B. R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C, v. 140, p. 356 – 363, 2005.

ÁLVAREZ-MUÑOZ D.; GÓMEZ-PARRA A.; BLASCO J.; SARASQUETE C.; GONZÁLEZ-MAZO E.; Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese sole. **Chemosphere**, v. 74, p. 1216-1223, 2009.

ALVES S. R. C. Respostas Bioquímicas em Tilápias Mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

AMADO L. L.; ROBALDO R. B.; GERACITANO L.; MONSERRAT J. M.; BIANCHINI A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). **Mar. Pol. Bul.**, v.52 p. 207–213, 2006.

AMORIM L. C. A. Os Biomarcadores e sua Aplicação na Avaliação da Exposição aos Agentes Químicos Ambientais. **Ver. Bras. Epidemiol.**, v. 6, 2003.

ANDRADE, V.M., FREITAS, T.R.O., SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mut. Res.**, v. 560, p. 57-67, 2004.

ARIAS A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE C.; INÁCIO A. F.; FREIRE M. M.; EGLER M.; MUGNAI R.; BAPTISTA D. F. Utilização de bioindicadores na

avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciê. Saúde Col.**, v.12, 2007.

AVILEZ I. M.; HORI T. S. F.; ALMEIDA L. C.; HACKBARTH A. BASTOS NETO J. C.; BASTOS V. L. F. C.; MORAES G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C, v. 148, p. 136-142, 2008.

BARSIENE J.; DEDONYTE V.; RYBAKOVAS A.; ANDREIKENAITE L.; ANDERSEN O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil **Aqua. Toxicol.**, v. 78 p.99-104, 2006.

BERTAZZOLI R.; PELEGRINI R. Descoloração e Degradação de Poluentes Orgânicos em Soluções Aquosas através do Processo Fotoeletroquímico. **Quim. Nova**, v. 25, p. 477-482, 2002.

BIAGINI F. R.; DAVID J. A. O.; FONTANETTI C. S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**. 2009.

BÜCKER A.; CARVALHO W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmania virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amaz.**, v. 3, p. 357-364, 2006.

BURGER J.; GAINES K F.; BORING C. S.; STEPHENS W. L.; SNODGRASS J.; DIXON C.; MCMAHON M.; SHUKLA S.; SHUKLA T.; GOCHFELD M. Metal Levels in Fish from the Savannah River: Potential Hazards to Fish and Other Receptors. **Environ. Res.** Section A, v.89, p.85-97, 2002.

BUSCHINI A.; MARTINO A.; GUSTAVINO B.; MONFRINOTTI M.; POLI P.; ROSSI C.; SANTORO M.; DÖRR A. J. M.; RIZZONI M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake Waters treated with disinfectants for potabilization. **Mut. Res.**, v.557 p.119-129, 2004.

BUSS D. F.; BAPTISTA D. F.; NESSIMIAN J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p.465-473, 2003.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environmental of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Tot. Environ.** v. 247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO M. M. P.; MARTINEZ C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxic. Pharmac.**, v.21, p.61-69, 2006.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxic. Pharmac.**, v. 21, p.61–69, 2006.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotrop. Ichth.**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CARVALHO C. E. V.; FARIA V. V.; CAVALCANTE M. P. O.; GOMES, M. P.; REZENDE C. E. Distribuição de Metais Pesados em Peixes Costeiros Bentônicos da Região de Macaé, RJ. Brasil. **Ecotoxicol. Environ. Res.**, v.2, n.3, 2000.

CASEY S. P., HALL H. J., HELEN F. STANLE H.F., VINCENT A. C. J. The origin and evolution of seahorses (genus Hippocampus): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. **Mol. Phylogene. Evol.**, v. 30, p.261-272, 2004.

CAVALCANTE D. G. S. M.; MARTINEZ C. B. R.; SOFIA S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mut. Res.**,v.6, p. 41-46, 2008.

CAVAS T.; GARANKO N. N.; ARKHIPCHUK V. V. INDUCTION of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food Chemic. Toxicol.**, v.43 p.569–574, 2005.

CAVAS T.; KÖNEN S. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aqua. Toxicol.**, v.90, p.154-159, 2008.

CENGIZ E. I.; UNLU E.; Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.22 p. 200-204. 2006.

CHRISTOFOLETTI C. A.; DAVID J. A. O.; FONTANETTI C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Gen. Mol. Biol.** Online Ahead of Print, 2009.

COLLINS R. A.; AI-GUO M., DUTHIE S. J. The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in Human Cells. **Mut. Res.** v. 336, p. 69-77, 1995.

COSTA M. M.; COLODETTE J. L.; LANDIM A.; SILVA C. M.; CARVALHO A. M. M. L. Nova Tecnologia de Branqueamento de Celulose Adaptada ao Fechamento do Circuito de Água. **Rev. Árv.**, v. 30, p.129-139, 2006.

COSTA P. M.; DINIZ M. S.; CAEIRO S.; LOBO J.; MARTINS M.; FERREIRA A. M.; CAETANO M.; VALE C.; DELVALLS T. A.; COSTA M. H. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. **Aqua. Toxicol.**, v.92, p. 202-212, 2009.

FATIMA M.; AHMAD, I.; SIDDIQUI R.; RAISUDDIN S. Paper and Pulp Mill Effluent-Induced Immunotoxicity in Freshwater Fish *Channa punctatus* (Bloch). **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v.40, p. 271–276 2001.

FIGUEIREDO-FERNANDES A.; FERREIRA-CARDOSO J. V.; GARCIA-SANTOS S.; MONTEIRO S. M.; CARROLA J.; MATOS P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesq. Vet. Bra.**, v. 27, p. 103-109, 2007.

FILIPAK NETO F.; ZANATA S. M.; ASSIS H. C. S.; BUSSOLARO D.; FERRARO M. V. M.; RANDI M. A. F.; COSTA J. R. M. A.; CESTARI M.M.; ROCHE H.; RIBEIRO C. A. O. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicol. Vitro**, v.21 p. 706-715, 2007.

FRAGOSO, N. M.; PARROT, J.L.; HAHN, M.E; HODSON, P.V. Chronic retene exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v.17, n.11, p. 2347-2353, 1998.

FRIZZO S. M. B.; SILVA M. C. M.; FOELKEL C. E. B. Contribuição ao Estudo de Efluentes de Indústrias de Celulose e Papel. **Ciê. Flor.**, v.6, p. 129-136, 1996.
GAETE H.; ARÁNGUIZ F.; CIENFUEGOS G.; TEJOS M. Metales Pesados y Toxicidad de Aguas del Río Aconcagua en Chile. **Quim. Nova**, v. 30, p. 885-891, 2007.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de Tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bra. Med. Vet. Zoo**. Belo Horizonte, v. 59, p. 376-381, 2007.

GOMES, A. S.; PALMA J. J. C.; SILVA, C. G. Causas conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Braz. Jour. Geoph.**, v. 18, n.3, 2000.

GONÇALVES R. O. G.; MELO N. A.; CARVALHO F. M.; GÓES R. C. Efeitos genotóxicos e alterações de enzimas hepáticas em trabalhadores do refino de petróleo. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 5, 2005.

GRAVATO C.; SANTOS M. A. Juvenile Sea Bass Liver Biotransformation and Erythrocytic Genotoxic Responses to Pulp Mill Contaminants. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.53, p. 104-112, 2002.

GRAZEFFE V. S.; TALLARICO L. F.; PINHEIRO A. S.; KAWANO T.; SUZUKI M. F.; KAYO OKAZAKI K.; PEREIRA C. A. B.; NAKANO E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mut. Res.**, v.654 p. 58–63, 2008.

GRISOLIA C. K.; OLIVEIRA A. B. B.; BONFIM H.; KLAUTAU-GUIMARÃES M. N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Gen. Mol. Bio.**, v.28, p. 334-338, 2005.

HABIG, W. H.; JAKOBY W. B. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. **Meth. Enzymol.**, v.77. 398-405. 1981.

HABIG, W. H.; PABST, W. B.; JAKOBY W. B. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biolog. Chemist.**, v. 249, p. 7130-7139. 1974.

HARTMANN C., C. Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Curso de Pós-Graduação em Ecologia. Porto Alegre, 2004.

HEUSER V.; D.; ANDRADE V. M.; PERES A.; BRAGA L. M. G. M.; CHIES J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Bio. Inter.**, v. 32, p. 1223-1229, 2008.

HOOK S. E.; LEE R. F. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. **Aqua. Toxicol.**, v.66 p.1-14, 2004.

IGUCHI T.; WATANABE H.; KATSU Y. Application of Ecotoxicogenomics for Studying Endocrine Disruption in Vertebrates and Invertebrates. **Environ. Health Persp.**, v.114, 2006.

JESUS H. C.; COSTA E. A.; MENDONÇA A. S. F.; ZANDONADE E. Distribuição de Metais Pesados em Sedimentos do Sistema Estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Quim. Nova**, v. 27, p. 378-386, 2004.

JIMENEZ R. S.; BOSCO S. M. D.; CARVALHO W. A. Remoção de Metais Pesados de Efluentes Aquosos pela Zeólita Natural Escolécita-Influência da Temperatura e do pH Na Adsorção em Sistemas Monoelementares. **Quim. Nov.**,v. 27, n. 5, p. 734-738, 2004.

JONES A. G., MOORE G. I., CHARLOTTA KVARNEMO C., DEETTE WALKER D., AVISEJ. C. Sympatric Speciation as a Consequence of Male Pregnancy in Seahorses. **PNAS**, v. 100, 2003.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, p. 21-27, 1981.

KHAN R. A. Influence of Sediment Contaminated with Untreated Pulp and Paper Mill Effluent on Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*. **Arch Environ Contam Toxicol**. 2009.

KHAN R. A.; HOOPER R. G. Decontamination of Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) Following Chronic Exposure to Effluent from a Pulp and Paper Mill. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 38, p.197-201, 2000.

KLOBUCAR G. I. V.; PAVLICA M.; ERBEN R.; PAPES D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aqua. Toxicol.**, v.64 p. 15-23, 2003.

KOMJAROVA I.; BLUST R. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. **Aqua. Toxicol.**, v.90 p.138–144, 2008.

KUMARI U.; YASHPAL M.; MITTAL M.; MITTAL A. K. Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita* (Siluriformes, Bagridae). **Tissue and Cell**, v.41, p. 271-280, 2009.

LANDMAN M. J.; TAYLOR S.; HEUVEL M. R. V. Carotenoid depletion and ovarian dysfunction in common bully exposed to a New Zealand pulp mill effluent. **Aqua Toxic.**, v.87 p. 303-309, 2008.

LANGIANO V. C.; MARTINEZ C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C, v. 147, p.222–231, 2008.

LEE K.; RAISUDDIN S.; RHEE J.; HWANG D.; YU I. T.; LEE Y.; PARK H. G.; LEE J. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. **Aqua. Toxicol.**, v. 89 p.158–166, 2008.

LI X.; JIA L.; ZHAO Y.; WANG.; CHENG Y. Seasonal bioconcentration of heavy metals in *Onchidium struma* (Gastropoda: Pulmonata) from Chongming Island, the Yangtze Estuary, China. **Jour. Environ. Scie.**, v. 21, p. 255–262, 2009.

LIMA P. L. Biomarcadores de Estresse Oxidativo e Dano ao Dna em Tilápia do Nilo Exposta às Águas da Planta de Tratamento de Agroindústria de Suínos. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2004.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.** Part. v. 120, p. 43-49, 1998.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde.**, v. 1, p. 63-76, 1999.

MAGALHAES, D. P.; FERRAO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, p. 355-381, 2008.

MARTINS S. A.; BIANCHINI A. Copper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). *Pan-American Jour. of Aquatic Scien.*, v.3, p. 384-390, 2008.

MARTINS V.; MANFREDINI V.; BENFATO M. S. High Levels Of Catalase In Sod Mutants Of *Saccharomyces verevisiae* In High Aeration Conditions. **Braz. Jour. Microbiol.**, v.36, p. 347-351, 2005.

MASUTTI M. B.; ESPÍNDOLA E. L. G.; NOGUEIRA A. D. M.; SIMÕES F. C. F. Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. **Jour. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, 2006.

MORON S. E.; POLEZ V. L. P.; ARTONI R. F.; RIBAS J. L. C.; TAKAHASHI H. K. Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina. **Jour. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, 2006.

NEGREIROS L. A.; CHIPPARI-GOMES A. R.; SILVA B. F.; PAULINO M. G.; FERNANDES M. N. Genotoxic and histopathological effects caused by the exposure to hypoxia associated with oil in the fish species *Hippocampus reidi*. **Compar. Biochem. Physiol.** No prelo 2009

NERO V.; FARWELL A.; LISTER A.; KRAAK G. V. D.; LEE L. E. J.; MEER T. V., MACKINNON M. D.; DIXON D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.63, p. 365-377, 2006.

NESSLANY F.; ZENNOUCHE N.; SIMAR-MEINTIÈRES.; TALAHARI I.; NKILIMBOUI E.; MARZIN D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mut. Res.**, v. 630 p. 28-41, 2007.

NIEMEYER J. C.; SANTOS V. C.; RODRIGUES J. M. L.; SILVA E. M. Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em Solo com Glifosato: Testes de Fuga em Laboratório. **Jour. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, p. 13-16, 2006.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S. DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.**, v. 52, p. 13-26, 2001.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.** v. 52, p. 13-26, 2001.

OAKES K. D.; HEWITT L. M.; MCMASTER M. E.; WOOD C.; MUNKITTRICK K. R.; KRAAK G. J. V. D. Oxidative Stress And Sex Steroid Levels In Fish Following

Short Term Exposure To Pulp-Mill Effluents. **Jour. Toxicol. Environ. Health**, Part A., v.68 p. 267-286, 2005.

OAKES K. D.; McMASTER M. E.; KRAAK G. J. V. D. Oxidative stress responses in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. **Aquat. Toxicol.**, v. 67, p. 255–271, 2004.

ONSSON, C. M. et al., Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scienti agrícola**, v. 59, p. 441-446, 2002.

ORLANDO E. F., BASS D. E., CALTABIANO L. M., WILLIAM P., DAVIS L., GRAY JR E., GUILLETTE JR. L. J. Altered development and reproduction in mosquitofish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida USA. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 399 – 405, 2007.

PARROTT J. L.; McMASTER M. E.; HEWITT L. M. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: development and application of fish bioassays. **Jour. Toxicol. Environ. Health**, Part B, v. 9, p.297–317, 2006.

RAMELOW, G.J.; WEBRE, C.L.; MUELLER, C.L.; BECK, J.N; YOUNG, J.C.; LANGLEY, M.P. Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien River and Lake, Louisiana. **Arch. Environ. Contamin. Toxicol.**, v. 18, p. 804-818, 1989.

RAMOS-VASCONCELOS G. R.; HERMES-LIMA M. Hypometabolism, antioxidant defenses and oxidative stress in pulmonate land snails *Helix aspersa*. Oxyradical research group. **Departamento de Biologia Celular**. Universidade de Brasília. Brasília, DF. 1998.

REZENDE A. A P.; MATOS A. T.; SILVA C. M. Utilização do Efluente de Indústria de Celulose e Papel em Irrigação – Uma Revisão. **Congresso Internacional de Celulose e Papel**. São Paulo – Brasil. 23 a 26 de Outubro, 2000.

RIBEIRO E. A. Efeitos de concentrações subletais dos Hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) no peixe *Sphoeroides testudineus* (LINNAEUS, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Paraná, CURITIBA, 2007.

ROCHA, P.S., LUVIZOTTO G. L.; KOSMEHL T.; BÖTTCHER M.; STORCH V.; BRAUNBECK T.; HOLLERT H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. **Ecotoxicol. Environ Safety**, 2009.

RODRIGUES C. M., Efeito da Aplicação de Resíduo da Indústria de Papel e Celulose nos Atributos Químicos, Físicos e Biológicos do Solo, na Nutrição e Biomassa do *Pinus taeda* L. **Dissertação de Mestrado**. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Depto de

Solos e Eng. Agrícola, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

ROMBOUGH P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? **Comp. Biochem. Physiol.** Part A, v. 148 p. 732-742, 2007.

ROSA I. M. L.; ALVES R. R. N.; BONIFÁCIO K. M.; MOURÃO J.S.; OSÓRIO F. M.; OLIVEIRA T. P. R.; NOTTINGHAM M. C. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Jour. Ethnobiol. Ethnomedic.**, v. 1, n. 12, 2005.

ROSA I. M. L.; ALVES R. R. N.; BONIFÁCIO K. M.; MOURÃO J.S.; OSÓRIO F. M.; OLIVEIRA T. P. R.; NOTTINGHAM M. C. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Jour. Ethnobiol. Ethnomedic.**, v. 1, 2005.

SANCHES-GALLAN S.; LINDE A.R.; IZQUIERDO J. I.; GARCIA-VAZQUEZ E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mut. Res**, v. 412, p. 219-225, 1998.

SCHRECK E.; GERET F.; GONTIER L.; TREILHOU M. ChE, GST and CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 72 p. 1609–1613, 2009.

SIMONATO J. D.; ALBINATI A. C.; MARTINEZ C. B. R. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 76, p.505–511, 2006.

SIMONATO J. D.; GUEDES C. L. B.; MARTINEZ C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p.112-120, 2008.

SIMONIELLO M. F.; GIGENA F.; POLETTA G.; LOTESTE A.; KLEINSORGE E.; CAMPANA M.; SCAGNETTI J. ; PARMA M. J. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v.83, p.155–158. 2009.

SOUZA, G. P.; HOLANDA J. N. F. Comportamento de sinterização de massas argilosas contendo resíduo proveniente do setor petrolífero. **Cerâm.**, v. 49, 2003.

TELES M.; PACHECO M.; SANTOS M. A. Sparus aurata L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. **Scien. Total Environ.**, v. 336, p.57- 69, 2005.

TESKE P. R.; LOCKYEA J. F.; HECHT T.; KAISER H. Does the endangered Knysna seahorse. *Hippocampus capensis*, have a preference for aquatic vegetation type, cover or height? **Afri. Zoo.**, v. 42, 2007.

TICE R. R.; AGURELL E.; ANDERSON D.; BURLINSON B.; HARTMANN A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE Y.; ROJAS E.; RYU J. C.; SASAKI Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environ. Mol. Mutag.**, v.35 p. 206-22, 2000.

TOFT G.; BAATRUP E.; GUILLETTE JR L. J. Altered social behavior and sexual characteristics in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) living downstream of a paper mill. **Aqua. Toxicol.**, v. 70, p. 213-222, 2004.

TORRES M. C. L.; SOARES N. F. F.; MAIA J. F. Parâmetros Cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua Ativação por Extratos de Vegetais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, 2004.

VANZELLA T.P.; MARTINEZ C.B.R.; CÓLUS I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mut. Res**, v.631 p.36-43, 2007.

VIEIRA, F.; GASPARINI, J. L. **Os Peixes Ameaçados de Extinção no Estado do Espírito Santo**. Espécies da fauna ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo. Vitória: Ipema, p. 87-104, 2007.

VIRGA R. H. P.; GERALDO L. P.; SANTOS F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.27, p. 779-785, 2007.

WINKALER E. U.; THIAGO R. M. SANTOS T. R. U.; JOAQUIM G. MACHADONETO J. G.; MARTINEZ C. B. R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Compar. Biochem. Physiol.** Part C, p. 236-244. 2007.

WOOTON, R.J. Ecology of teleost fishes. **Fishes and Fisheries Series 1. New York**, Chapman and Hall, 1990.

ZAGATTO P. A., BERTOLETTI E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Rima, 2006.

ZHU Y.; WANG J.; BAI Y.; ZHANG R. Cadmium, Chromium, and Copper Induce Polychromatocyte Micronuclei in Carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 72, p. 78-86, 2004.