



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS-MBT**

IZABEL CRISTINA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**BIOMARCADORES DE EFEITO DO CHORUME DA LIXEIRA PÚBLICA DE
PARINTINS-AM EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Manaus

2012

IZABEL CRISTINA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**BIOMARCADORES DE EFEITO DO CHORUME DA LIXEIRA PÚBLICA DE
PARINTINS-AM EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais-MBT, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Coorientadora: Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira, Dra.

Manaus

2012

S237b Santos, Izabel Cristina Conceição dos.

Biomarcadores de Efeito do Chorume da Lixeira Pública de
Parintins-Am em tambaqui (*Collossoma Macropomum*) /

Izabel Cristina Conceição dos Santos - Manaus: Universidade
do Estado do Amazonas, 2012.

xii, 110 p. : il.

DISSERTAÇÃO – Título de Mestre - Universidade do
Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais, 2012.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Adalberto Luis Val.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Patrícia Feitosa de
Oliveira.

1. Chorume 2. Biomarcadores 3. *Collossoma Macropomum*
4. Parintins-Am. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Sônia Maria Nunes
de Souza

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Izabel Cristina Conceição dos Santos, sob o título “Biomarcadores de efeito do chorume da lixeira pública de Parintins-Am em tabaqui (*Colossoma macropomum*)”, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros são de parecer pela _____ da dissertação.

Dissertação defendida em 24 de julho de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE: Dr. ADALBERTO LUIS VAL

MEMBRO 1: Dr. WALLICE LUIZ PAXIÚBA DUNCAN

MEMBRO 2: Dra. VERA MARIA FONSECA DE ALMEIDA VAL

Manaus

2012

Aos meus amados pais Maria Izabel e Martimiano Quaresma, pelas palavras de incentivo e exemplo de sabedoria e força que me transmitiram no período em que não podia vê-los; por iluminar meus caminhos quando somente podia senti-los e por me ensinar que tudo pode ser realizado se feito com dedicação e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por sua infinita misericórdia concedidas durante esta trajetória e por me dar fé e esperança em meio as dificuldades enfrentadas, distante de pai e mãe. Obrigada Deus, por me proteger e cuidar de meus pais enquanto estive ausente.

A grande família Santos (pai, mãe, irmãos, sobrinhos e cunhados), a qual amo muito, obrigada pelo carinho, paciência e incentivo. Vocês, com certeza, fazem parte da melhor família do mundo.

Em especial aos meus irmãos Jucilei e Gibion Santos, que me receberam muito bem em Manaus, vocês foram muito mais que irmãos, meus sinceros agradecimentos por todo o apoio recebido na alegria, na tristeza, na saúde, na doença e, principalmente, nas dificuldades financeiras durante os dois anos de mestrado. Tudo que vocês fizeram por mim assemelha-se aos cuidados de pai e mãe! Muito, muito obrigada!

Ao meu orientador, Dr. Adalberto Luis Val, pela orientação, apoio e por ter aberto as portas de seu laboratório para mim, mesmo sem me conhecer. Obrigada pelos ensinamentos e críticas ao longo do mestrado e principalmente durante o “café com ciência” e as reuniões nas sextas-feiras. Obrigada por me permitir fazer parte de seu renomado grupo de pesquisa.

A minha coorientadora, Dra. Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira, pelos ensinamentos e apoio prestados, e por me socorrer nos momentos de dúvidas e dificuldades. Obrigada pela paciência diante de minha falta de experiência, e por ter colocado a “mão na massa” durante os experimentos de campo em Parintins. Você é uma excelente profissional, inteligente, exemplo de simplicidade e sem dúvida a melhor coorientadora do LEEM.

A Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida Val por gentilmente me receber em seu laboratório e, juntamente com meu orientador, me proporcionar fazer parte de seu renomado grupo de pesquisa.

A equipe administrativa do LEEM, Nazaré Paula, Raimunda Brandão, Cláudia Silva e Raquel Abecassis pelo apoio prestado na logística deste trabalho, fundamentais para o desenvolvimento dos experimentos de campo.

À equipe do LEEM pela ajuda prestada, pelas conversas, amizade e apoio, em especial aos companheiros de sala que me auxiliaram nas análises, Valéria Sobral, Karen Yuri, Luciana Fé e Jorge Felipe.

A Dra. Hiléia pela fundamental ajuda nas análises de HPAs.

Ao Mestre Adailton Moreira da Silva (Universidade Federal do Pará) pelo apoio e confiança prestados desde a graduação e por ter me incentivado a seguir este caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por possibilitar a realização deste curso. Meu agradecimento especialmente ao Dr. Ademir Castro e Silva pela iniciativa de implementar o curso no município de Parintins-Am.

A todos os professores do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT-UEA) em especial a Dra. Antônia por quem tenho imensa admiração e considero uma grande amiga e a Dra. Helena Camarão pelos ensinamentos prestados e, principalmente, por sua simpatia e simplicidade.

Ao Dr. Aldo Procópio pelo companheirismo e apoio prestado, principalmente no início desta caminhada.

Aos colegas da turma MBT 2010, em especial as amigas e irmãs Vanessa Gallúcio e Adriana Nunes pelas quais tenho tremenda admiração. Amiga Vanessa o meu muito obrigada por todos os conselhos nos momentos de aflição.

Aos companheiros de Parintins que me auxiliaram no experimento de campo, Franciane Andrade e Luciano Pinheiro que em muitos momentos tiveram que ajudar no “serviço sujo”, os meus sinceros agradecimentos; sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos amigos da faculdade Eraldo Pantoja e Josilene Duarte - vocês com certeza fizeram meus dias mais alegres aqui em Manaus, mesmo que por telefone ou um simples SMS.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por possibilitar a realização deste trabalho, especificamente ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular-LEEM.

Ao INCT ADAPTA, com suporte financeiro do CNPq e da FAPEAM, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas, oriundas de diversas fontes de emissão. Dentre as fontes de poluição aquática, destaca-se o chorume. O chorume é um líquido altamente tóxico, resultante da decomposição do lixo e representa um problema ambiental de escala global. Mesmo as regiões mais prístinas não estão livres dessa pressão. A cidade de Parintins-Am, por exemplo, também vem sofrendo o impacto deste tipo de poluição. O agravante nesta situação específica é que esta região é circundada por inúmeros corpos de água como, por exemplo, o Lago do Macurany. Este é um dos principais lagos que circundam a Ilha de Parintins, sendo de vital importância quanto a sua preservação. Portanto, a qualidade destes ambientes pode estar sendo potencialmente comprometida pela descarga de chorume. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do chorume, proveniente da lixeira pública de Parintins, em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), após 96h de exposição em laboratório e após exposição, por 24 e 48h, *in situ* no Lago do Macurany. Em ambas situações os parâmetros hematológicos, iônicos, enzimáticos e genotóxicos foram determinados e avaliados para utilização como potenciais biomarcadores de contaminação pelo chorume. Para avaliação do efeito do chorume, sob exposição laboratorial, utilizou-se 32 exemplares de *C. macropomum* distribuídos em grupos de 8 exemplares expostos em aquários individuais, com capacidade para 6 litros, contendo água+chorume em três diferentes diluições (1:100, 1:1000 e 1:10000) por um período de 96h de exposição. Outro grupo de 8 espécimes foram expostos somente à água do poço, sendo considerado o grupo controle. A avaliação do impacto ambiental da presença de despejos tóxicos no Lago do Macurany foi realizada através da exposição *in situ* de exemplares de *C. macropomum*, em gaiolas com volume de 9L, em dois diferentes tempos de exposição, 24 e 48h. Nas condições experimentais utilizou-se 30 indivíduos distribuídos em grupo de 3 exemplares expostos em um ponto a jusante da lixeira, outro grupo de 30 indivíduos foi exposto em um ponto a montante da lixeira. A exposição laboratorial resultou num quadro de anemia, comprovada pela diminuição na concentração de hemoglobina, hematócrito e número de células vermelhas. Os níveis de glicose aumentaram nos animais expostos às diferentes concentrações de chorume evidenciando que esses animais passaram por um período de estresse. Os níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ e Cl^- também aumentaram nos grupos expostos às diferentes concentrações de chorume, sugerindo que o chorume pode interferir nos processos de regulação iônica em espécimes de tambaqui. A exposição ao chorume causou sérios danos hepáticos avaliados indiretamente pelo aumento na concentração das enzimas alanina e aspartato aminotransferases e fosfatase alcalina. Foi observado também, um aumento nos níveis de colinesterase, sugerindo distúrbios na transmissão dos impulsos nervosos nesses animais. O aumento dos parâmetros enzimáticos foram proporcionais ao aumento da concentração de chorume, indicando efeito dose-dependente. Os resultados obtidos por meio dos parâmetros genotóxicos, ensaio cometa e anormalidades nucleares, indicam que a exposição às concentrações testadas de chorume causa aumento de danos no material genético e de anormalidades nucleares eritrocíticas. A exposição *in situ* no Lago do Macurany, a jusante da lixeira pública de Parintins-Am, também desencadeou uma série de alterações em todos os parâmetros analisados. Nos parâmetros hematológicos houve diminuição nos valores de hematócrito e não houve diferença significativa na concentração de hemoglobina, quanto ao número de eritrócitos circulantes houve o aumento somente nos espécimes expostos a jusante por 24h para dinamizar o carregamento de oxigênio. A concentração de glicose sanguínea também aumentou nesses animais, sugerindo que os animais passaram por um período de estresse. Os níveis

plasmáticos de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e os níveis das enzimas ALT, AST, FA e Che aumentaram nos espécimes do ponto a jusante lixeira, mostrando mais uma vez que a contaminação da referido lago é capaz de desencadear distúrbios bioquímico-fisiológico diversos. Os resultados para ensaio cometa e anormalidades nucleares sugerem genotoxicidade para a exposição *in situ*. De um modo geral, a exposição de *C. macropomum* às diferentes concentrações de chorume e à contaminação do Lago do Macurany foi suficiente para promover sérios distúrbios fisiológicos e bioquímicos, comprometendo assim a saúde dessa espécie. Os resultados obtidos sugerem que os parâmetros hematológicos, iônicos, enzimáticos e genotóxicos analisados para a espécie *Colossoma macropomum* se mostraram potenciais biomarcadores de contaminação por chorume.

Palavras- chave: chorume; biomarcadores; *Colossoma macropomum*; Parintins; Lago do Macurany.

ABSTRACT

The aquatic biota is constantly exposed to a large number of toxic substances from several emission sources. Among the sources of water pollution, there is leachate. Leachate is a liquid highly toxic, resulting from the decomposition of waste, and represents an environmental problem of global scale. Even the most pristine areas are not free from this pressure. The city of Parintins-Am, for example, also has suffered the impact of such pollution. The aggravating fact this particular situation is that this region is surrounded by a number of bodies of water, for example, Lake Macurany. This is one of the main lakes that surround the island of Parintins, as being of vital importance to their preservation. Therefore, the quality of these environments can potentially being compromised by the discharge of leachate. The present study aimed to evaluate the effect of leachate from the public Parintins, on tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after 96h of exposure in the laboratory and after exposure for 24 and 48, *in situ* in Lake the Macurany. In both situations the hematological parameters, ionic, enzymatic and genotoxic effects were determined and evaluated for use as potential biomarkers of contamination by leachate. To evaluate the effect of leachate under laboratory exposure, we used 32 individuals of the species *C. macropomum* distributed in groups of 8 specimens exposed to individual tanks with a capacity of 6 liters, containing water slurry in three different dilutions (1:100, 1:1000 and 1:10,000) for a period of 96 hours of exposure. Another group of eight specimens were exposed only to well water, considered as the control group. The environmental impact assessment of the presence of toxic dumps in Lake Macurany was performed *in situ* by exposure of specimens of *C. macropomum*, in cages with a volume of 9L in two different exposure times, 24 and 48. Under the experimental conditions used were 30 individuals in group 3 specimens exposed at a point downstream of the trash, and another group of 30 subjects was exposed at a point upstream of the trash. The laboratory exposure resulted in anemia, as evidenced by the decrease in hemoglobin concentration, hematocrit and red blood cells count. Glucose levels increased in animals exposed to different concentrations of manure showing that these animals went through a period of stress. Plasma levels of Na^+ , K^+ and Cl^- also increased in the groups exposed to different concentrations of leachate, suggesting that the slurry can interfere with processes regulating ion in specimens of tambaqui. Exposure to the slurry caused severe liver damage assessed indirectly by increased concentration of alanine and aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase. We also observed an increase in the levels of cholinesterase, suggesting disturbances in the transmission of nerve impulses in these animals. Increases in enzymatic parameters were proportional to the concentration of slurry, indicating a dose-dependent response. The results obtained by means of genotoxic parameters, comet assay and nuclear abnormalities, indicate that exposure to concentrations tested manure causes increased damage to genetic material and erythrocytic nuclear abnormalities. The *in situ* exposure in Lake Macurany downstream of Parintins-Am public trash, also triggered a series of changes in all parameters. For haematological parameters, decreased values of hematocrit and no significant difference in hemoglobin concentration, and the number of circulating red blood cells was increased only in the specimens exposed for 24 hours downstream to streamline the carrying of oxygen. The blood glucose concentration also increased in these animals, suggesting that the animals went through a period of stress. Plasma levels of Na^+ , K^+ and Cl^- and levels of enzymes ALT, AST, ALP and Che increased in specimens from the point downstream tip, showing again that the lake contamination is capable of triggering biochemical and physiological disturbances. The results for comet assay and nuclear abnormalities suggest genotoxicity for exposure *in situ*. Generally, exposure of *C. macropomum* to different concentrations of manure and contamination of Lake Macurany was

sufficient to cause serious physiological and biochemical disturbances, thus compromising the health of this species. The results suggest that the hematological parameters, ionic, enzymatic, comet assay and erythrocytic nuclear abnormalities analyzed for the species *Colossoma macropomum* proved to be a potential biomarkers of contamination by leachate.

Keywords: leachate; biomarkers; *Colossoma macropomum*; Parintins; Lake Macurany.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Experimento de exposição aguda a concentrações subletais de churume (A) e experimentos de exposição in situ no Lago do Macurany (B)..... 34
- Figura 2** Hematócrito (Ht) (A), Concentração de hemoglobina ([Hb]) (B) e Número de eritrócitos circulantes (RBC) (C) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de churume, no período de 96 horas. Letras diferentes tratamentos ($p<0,05$)..... 47
- Figura 3** Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de churume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p<0,05$)..... 48
- Figura 4** Níveis de glicose sanguínea de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de churume por 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p<0,05$)..... 49
- Figura 5** Níveis plasmáticos de (A) Sódio (Na^+), (B) Potássio (K^+) e (C) Cloreto (Cl^-) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de churume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p<0,05$). 51
- Figura 6** Concentração de Alanina Aminotransferase-ALT (A); Aspartato Aminotransferase-AST (B) e Fosfatase Alcalina-FA (C) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de churume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p<0,05$)..... 53

- Figura 7** Concentração de Acetil Colinesterase-Che em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chorume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 54
- Figura 8** Classe de danos de DNA (teste do cometa) observados em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) expostos ao chorume. Classe 0 (sem danos) (A), classe 1 (B), classe 2 (C), classe 3 (D) e classe 4 (dano máximo) (E). Escala 50 μ m 55
- Figura 9** Índices de danos de DNA, obtidos a partir do teste do cometa, em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chorume por 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 56
- Figura 10** Anormalidades nucleares eritrócíticas (ANE) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de chorume, no período de 96 horas. Núcleo lobado (A), núcleo segmentado (B), núcleo em forma de rim (C), micronúcleo (D), e célula normal (E). Escala 20 μ m. 57
- Figura 11** Anormalidades nucleares eritrócíticas (ANE) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chorume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 58
- Figura 12** Hematócrito (Ht) (A), Concentração de hemoglobina ([Hb]) (B) e Número de eritrócitos circulantes (RBC) (C) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).....64
- Figura 13** Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas.

* Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).
..... 65

Figura 14 Níveis de glicose sanguínea de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$) 66

Figura 15 Níveis plasmáticos de sódio Na^+ (A); Potássio K^+ (B) e cloreto Cl^- (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira ($p < 0,05$). 68

Figura 16 Concentração de Alanina Aminotransferase-ALT (A); Aspartato Aminotransferase-AST (B) e Fosfatase Alcalina-FA (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira ($p < 0,05$). 70

Figura 17 Concentração de Acetil Colinesterase-Che em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira ($p < 0,05$).
..... 71

Figura 18 Índices de danos de DNA, obtidos a partir do teste de cometa, em células do sangue periférico de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$). 72

Figura 19 Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) em células do sangue periférico de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do Chorume da Lixeira Pública de Parintins-Am	44
Tabela 2 Parâmetros físico-químicos da água utilizada nos testes de exposição de exemplares de <i>C. macropomum</i> a concentrações subletais de chorume por 96 horas	45
Tabela 3 Média dos valores de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) da água utilizada nos testes de exposição de exemplares de <i>C. macropomum</i> a concentrações subletais de chorume por 96 horas.	45
Tabela 4 Parâmetros físico-químicos da água do Lago do Macurany nos pontos amostrais a montante e a jusante da lixeira pública de Parintins.	60
Tabela 5 Valores de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs), em área sob pico cromatográfico, da água do Lago do Macurany nos pontos amostrais à montante e à jusante da lixeira pública de Parintins.	61
Tabela 6 Concentrações dos metais cobre, cádmio e chumbo presentes na água do Lago do Macurany nos pontos amostrais à montante e à jusante da lixeira pública de Parintins.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs	Absorbância
AChe	Acetil colinesterase
ALA	Ácido aminolevulínico
ALA-D	Desta aminolevulinato desidratase
ALT	Alanina aminotransferase
AM	Amazonas
ANE	Anormalidades nucleares eritrocíticas
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
B.L./mL	Bessey-Lowry por mililitros
Bche	Butinil colinesterase
CCD	Cromatografia de camada delgada
Cd	Cádmio
CESP	Centro de Estudos Superiores de Parintins
CG/EM	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massa
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Che	Colinesterase
Cl ⁻	Íon cloreto
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido dextrorribonucléico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DWSF	Fração de óleo diesel solúvel em água
EC	Ensaio cometa
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPA	Agência de Proteção Ambiental
ESA	Escola Superior de Ciências da Saúde

F.R./mL	Frankel Reitman por mililitros
FA	Fosfatase alcalina
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitros
h	Horas
Hb	Concentração de hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCO_3^-	Íon Bicarbonato
HNO_3	Acido nítrico
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Ht	Hematócrito
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Ferricianeto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
Kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato de potássio
km	Quilômetro
L	Litro
LEEM	Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular
M	Molar
MBT	Mestrado em Biotecnologia
mEq/L	Miliequivalente por litro
mg	Miligramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/L	Miligramas por litro
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimoles
mm^3	Milímetro cúbico
MN	Micronúcleo
N	Número
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanomoles
O ₂	Oxigênio molecular
°C	Graus Celsius
Pb	Chumbo
Pb ⁺²	Íon chumbo
pH	Potencial hidrogeniônico
PIN	Parintins
RBC	Número de eritrócitos
rpm	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
Tris	Trihidroxi-metilaminometano
U.I.	Unidade internacional
U.I/L	Unidade internacional por litro
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Volts
VCM	Volume corpuscular médio
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1 RESÍDUOS SÓLIDOS E ALTERAÇÕES AMBIENTAIS	23
1.1 DEPOSIÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS EM PARINTINS-AM	24
1.2 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES	26
1.3 USO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IÔNICOS E ENZIMÁTICOS COMO BIOMARCADORES	28
1.4 USO DE ENSAIO DO COMETA E ANORMALIDADES NUCLEARES COMO BIOMARCADORES	30
1.5 A ESPÉCIE <i>Collossoma macropomum</i>	31
2.OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 METODOLOGIA	33
3.1 COLETA DE CHORUME	33
3.2 COLETA DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO	33
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: EXPOSIÇÃO AGUDA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE CHORUME	33
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: EXPOSIÇÃO <i>IN SITU</i> NO LAGO DO MACURANY	34
3.5 ACOMPANHAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA	35
3.6 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS	35
3.6.1 Análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	35
3.6.1.1 Extração	35
3.6.1.2 Análises químicas por CG/EM	36
3.6.1.3 Análise de Metais de Transição	36
3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	36
3.7.1 Parâmetros Hematológicos	37
3.7.1.1 Hematócrito (Ht)	37
3.7.1.2 Concentração de hemoglobina [Hb]	37
3.7.1.3 Contagem de eritrócitos circulares (RBC)	37
3.7.1.4 Determinação das Constantes Corpusculares	38
3.7.1.5 Concentração de glicose sanguínea	38
3.7.2 Parâmetros iônicos	38

3.7.2.1	Concentrações de Na ⁺ e K ⁺	38
3.7.2.2	Concentrações de Cl ⁻	38
3.7.3	Parâmetros enzimáticos	39
3.7.3.1	Atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT)	39
3.7.3.2	Atividade da fosfatase alcalina (FA)	40
3.7.3.3	Atividade da colinesterase (Che)	40
3.7.4	Parâmetros Genotóxicos	40
3.7.4.1	Ensaio do Cometa	40
3.7.4.2	Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE)	41
3.7.5	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: EXPOSIÇÃO AGUDA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE CHORUME	43
4.1.1	Sobrevivência dos animais	43
4.1.2	Parâmetros Químicos do Chorume	43
4.1.3	Parâmetros Físico-Químicos da Água	44
4.1.4	Parâmetros Hematológicos	46
4.1.5	Parâmetros Iônicos	50
4.1.6	Parâmetros Enzimáticos	52
4.1.7.1	Ensaio do Cometa	54
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: EXPOSIÇÃO <i>IN SITU</i> NO LAGO DO MACURANY	59
4.2.1	Sobrevivência dos animais	59
4.2.2	Parâmetros físico-químicos da água	59
4.2.3	Parâmetros Hematológicos	63
4.2.4	Parâmetros iônicos	67
4.2.5	Parâmetros enzimáticos	69
4.2.6	Parâmetros genotóxicos	72
4.2.6.1	Ensaio do Cometa	72
4.2.6.2	Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE)	73
5	DISCUSSÃO	74
5.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO CHORUME UTILIZADO NA EXPOSIÇÃO LABORATORIAL E DA EXPOSIÇÃO <i>IN SITU</i> NO LAGO DO MACURANY	74

5.1.1 Compostos orgânicos e inorgânicos detectados nas águas experimentais	75
5.1.2 Exposição à concentração subletal de churume em laboratório e exposição <i>in situ</i> no Lago do Macurany	78
5.1.3 Parâmetros Respiratórios	80
5.1.4 Parâmetros Iônicos	82
5.1.5 Parâmetros Enzimáticos	84
5.1.6 Parâmetros Genotóxicos	86
CONCLUSÕES	90
PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

INTRODUÇÃO

1 RESÍDUOS SÓLIDOS E ALTERAÇÕES AMBIENTAIS

O rápido crescimento populacional aliado ao avanço da tecnologia e da capacidade humana em intervir no ambiente para satisfazer suas necessidades tem contribuído para o aumento da quantidade e variedade de resíduos que precisam ser descartados para dar lugar a novos bens de consumo. Com isso, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição de resíduos no ambiente provocando desequilíbrios na estrutura dos ecossistemas (ZAGATTO, 2008).

Resíduos sólidos, segundo definição da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), são resíduos em estado sólido e semissólido, que resultam da atividade industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola e de serviços de varrição. Estes resíduos podem conter numerosas espécies químicas consideradas perigosas para a saúde humana e para o ambiente, cujas concentrações dependem, principalmente, da composição do lixo, uma vez que este é constituído por mistura complexa de objetos e materiais de várias naturezas.

Os ecossistemas aquáticos estão entre os mais impactados, uma vez que diversos resíduos produzidos pelo homem são lançados nos ambientes aquáticos interiores e marinhos. Desta forma, a biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão. Dentre as inúmeras fontes de poluição aquáticas, destaca-se o lançamento de esgotos domésticos e industriais nos corpos d'água, comprometendo a qualidade da água de inúmeros mananciais (ZAGATTO, 2008). A presença de aterros sanitários e lixões representam outra fonte de contaminação de corpos d'água, pois um dos grandes problemas da disposição inadequada dos resíduos sólidos é a produção do chorume, líquido percolado, que apresenta alta toxicidade ao ambiente, gerado a partir da decomposição do lixo (SISSINO, 2002).

O chorume pode ocasionar diversos efeitos negativos sobre o meio ambiente. O potencial de impacto deste efluente está relacionado com a alta concentração de matéria orgânica. De acordo com Fent (2003), o chorume constitui-se em um dos maiores problemas ambientais, em virtude da elevada concentração de matéria orgânica, reduzida biodegradabilidade, presença de metais de transição, de hidrocarbonetos e de substâncias recalcitrantes. Somado a isso, a inadequação das operações e gerenciamento de aterros sanitários tende a contaminar os ecossistemas circundantes como o solo e as águas

superficiais e subterrâneas. Estudos da Agência de Proteção Ambiental relacionaram mais de 100 espécies químicas perigosas ao ambiente e à saúde humana em amostras de chorume, dentre as quais foram citadas arsênio, tetracloreto de carbono, metais de transição e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (CHILTON e CHILTON, 1992).

A toxicidade potencial de misturas complexas, como é o caso do chorume não deve ser determinada apenas com base nas características físico-químicas, pois somente por meio de testes de toxicidade pode-se avaliar os efeitos da contaminação para os organismos vivos. Dessa forma, ensaios biológicos são fundamentais na análise da qualidade de ambientes aquáticos, uma vez que diferentes substâncias químicas podem apresentar características e efeitos diferenciados sobre os organismos, sendo que uma mesma substância química pode ter efeitos diversos em organismos diferentes (JAGER et al., 2007). A exposição constante da biota aquática a substâncias tóxicas lançadas no meio ambiente é capaz de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações, incluindo efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, que podem gerar graves consequências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (FENT, 2003).

O aumento no número de lixeiras e nos volumes de resíduos depositados associado à disposição inadequada desses resíduos nos chamados 'lixões' não se restringe aos grandes centros urbanos. Pode ocorrer mesmo em locais mais isolados, como ocorre na cidade de Parintins, localizada no Baixo Amazonas, a cerca de 350 km de Manaus, capital do Estado do Amazonas, que também vem sofrendo o impacto deste tipo de poluição. O agravante nesta situação específica é que esta região está circundada por inúmeros corpos de água como igarapés, rios e lagos. Portanto, a qualidade destes ambientes pode estar sendo potencialmente comprometida pela descarga do chorume da lixeira pública de Parintins. Diante deste contexto, conhecer os impactos dos efluentes gerados na lixeira pública do município de Parintins para o ecossistema aquático é relevante.

1.1 DEPOSIÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS EM PARINTINS-AM

O acúmulo de resíduos sólidos na lixeira pública de Parintins-Am é crescente e, como consequência, há um aumento na produção de chorume. Este líquido é produzido pela infiltração da água das chuvas e pela degradação de compostos que percolam através da massa de lixo disposto, carreando materiais dissolvidos ou suspensos.

Em Parintins cada habitante produz diariamente 0,963 gramas de lixo, o que perfaz uma média municipal de 64 toneladas por dia de resíduos despejados no lixão. Por sua vez, não existe coleta seletiva e nenhum tratamento especial é destinado aos resíduos (PESSOA e AZEVEDO FILHO, 2009). Adicionalmente, não existe sistema de canalização para descarte do chorume, nem tão pouco tratamento. O percolado aflora em vários pontos da lixeira e escorre livremente podendo contaminar rios, lagos e igarapés que margeiam a cidade, gerando impactos ambientais e sociais de grande porte. Isto representa uma ameaça ao sistema aquático e as espécies que neles vivem, principalmente se tratando de peixes, que são a principal fonte de proteína para a população local. Segundo Sisinno (2000), no Brasil, aproximadamente, 84,4% dos municípios dispõem os resíduos gerados em lixões a céu aberto, sem qualquer controle ambiental.

Há décadas o armazenamento de resíduos na referida cidade era realizado em um lixão a céu aberto, localizado no perímetro urbano (02°38'45,9''S e 56°45'25,6''W), mas em 2011, este lixão tornou-se um aterro controlado, a fim de se amenizar a problemática do acúmulo de aves perto do aeroporto. Contudo, quanto ao percolado originário da degradação dos resíduos, nada foi feito. O chorume da lixeira de Parintins continua a representar um risco ao meio ambiente.

A lei 12.305 de 2 de agosto de 2010 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos proíbe, Artigo 47, as seguintes formas de destinação ou disposição final de resíduos sólidos ou rejeitos: lançamento em praias, no mar ou em quaisquer corpos hídricos; lançamento *in natura* a céu aberto, excetuados os resíduos de mineração; queima a céu aberto ou em recipientes; instalações e equipamentos não licenciados para essa finalidade; entre outras formas vedadas pelo poder público. De acordo com esta lei, até agosto de 2012, todos os municípios brasileiros devem apresentar um Plano Municipal de Gestão Integrada dos Resíduos Sólidos e até agosto de 2014, nenhum município brasileiro pode ter lixões a céu aberto.

Segundo Nunes e Fonseca (2002), o monitoramento de percolados de aterros sanitários, visando garantir níveis seguros para disposição do mesmo no ambiente, pode ser realizado por uma série complexa de parâmetros físicos e químicos. Porém, essas análises não permitem avaliar eventuais impactos em organismos de ecossistemas aquáticos. Para esta avaliação é fundamental o uso de bioindicadores ou testes ecotoxicológicos. Estes testes se constituem numa importante ferramenta por proporcionar respostas adicionais no que se refere às alterações para o meio ambiente. Eles fornecem informações seguras acerca dos efeitos do mesmo sobre a biota aquática, podendo complementar o monitoramento físico e

químico usual (BRENTANO, 2006). Ainda segundo Brentano (2006), estudos com organismos aquáticos são indispensáveis na avaliação dos efeitos ambientais de efluentes complexos, como o chorume, contribuindo na busca de medidas mitigadoras e possibilitando não apenas a minimização do impacto ambiental causado por efluentes tóxicos, mas, também, a garantia da manutenção da vida aquática.

Na região amazônica os peixes podem ser a principal via de contaminação de metais de transição para o homem (MENEZES, 2005), tendo em vista que as populações que vivem às margens de corpos d'água alimentam-se primariamente de peixes devido a abundância destes na região (ISAAC e RUFFINO, 2000). Isto representa um dos fatores que os tornam importantes como organismos indicadores e para bioensaios para verificar a presença ou a ausência de efeitos aparentes da contaminação sobre os organismos vivos.

Outro fator importante é que organismos como, por exemplo, *Colossoma macropomum*, têm sido estudados nesta região como uma espécie biondicadora para diversos fatores impactantes como metais de transição e compostos petrogênicos. Essa espécie, quando exposta ao cobre e ao chumbo, apresentou sérios distúrbios no transporte de oxigênio, na regulação iônica, danos hepáticos e alterações no controle dos impulsos nervosos, comprovando ser uma espécie sensível a este tipo de contaminação (OLIVEIRA, 2003). Além disso, Oliveira (2010) observou aumento de anormalidades eritrocíticas e danos no DNA em espécimes de *C. macropomum* expostos a concentrações subletais de naftaleno, de benzo[a]pireno e de petróleo por 48 horas.

1.2 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES

O biomonitoramento ambiental é uma das ações que vêm sendo utilizadas para avaliar a qualidade ambiental por meio da utilização de organismos vivos. Os peixes têm sido estudados com frequência no biomonitoramento aquático, pois este ambiente está exposto a processos de poluição diversos, como mencionado. O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. Como os rios estão sujeitos a inúmeras perturbações, a biota aquática reage a esses estímulos, sejam eles naturais ou antropogênicos (LIVINGSTONE, 1998).

Na Amazônia o uso de peixes como ferramenta para o biomonitoramento assume extrema importância, uma vez que os contaminantes ambientais podem promover amplo conjunto de efeitos subletais nesses organismos. Tais efeitos em organismos sensíveis a riscos

de contaminação podem ser utilizados como sinais de alerta para a degradação do meio ambiente (HAVELKOVA et al. 2008).

Os peixes podem bioacumular uma série de compostos, o que pode produzir um efeito de biomagnificação e levar a consequências desastrosas na cadeia trófica, inclusive ao homem. Portanto, o constante monitoramento em áreas de risco é fundamental para que não ocorra contaminação da população. Esta necessidade dá origem à análise dos efeitos morfológicos, moleculares, bioquímicos ou fisiológicos em peixes expostos a contaminantes que possam ser validados como biomarcadores.

Biomarcadores são ferramentas úteis para avaliar a presença e os níveis de poluição química, podendo ser definido como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificar um alvo específico (SILVA et al. 2003). De acordo com Jonsson e Castro (2005), biomarcadores também podem ser definidos como toda substância ou seu produto de biotransformação ou qualquer alteração bioquímica precoce cuja determinação estabeleça a relação entre a exposição e o efeito tóxico refletida em alterações fisiológicas e a suscetibilidade dos indivíduos.

Os biomarcadores também podem ser classificados como de exposição ou de efeito. Um biomarcador de exposição será qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente. Alguns exemplos deste tipo de marcadores são a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de metalotioneínas. Biomarcadores de efeito serão aqueles que evidenciem algum efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente, como por exemplo, a peroxidação de lipídios ou o dano ao DNA. Uma das vantagens de se utilizar os biomarcadores em níveis baixos de organização biológica é a possibilidade de detecção precoce dos efeitos deletérios de poluentes, antes de serem evidenciadas alterações em níveis superiores da organização biológica. Estudos no nível populacional e de comunidade também fornecem informações sobre mudanças em curso; porém, estas somente serão detectadas uma vez que a comunidade já foi impactada (LIVINGSTONE, 1998).

Segundo Schulz e Martins-Junior (2001), os peixes são excelentes ferramentas no acompanhamento da qualidade de ambientes aquáticos, servindo como importantes bioindicadores, pois respondem de várias maneiras à contaminação, como por exemplo, mudanças na taxa de crescimento, na maturação sexual, na estrutura populacional, entre outros.

1.3 USO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IÔNICOS E ENZIMÁTICOS COMO BIOMARCADORES

Os peixes são considerados importantes biomarcadores de efeito (VAN DER OST et al., 2003). Amostras de sangue podem ser regularmente obtidas de forma não destrutiva para a avaliação do efeito. Porém, parâmetros hematológicos típicos não são respostas específicas para estressores químicos (CAVALCANTE, 2009). Por outro lado, podem indicar o quadro geral da fisiologia do animal e o seu estado de saúde, uma vez que o sangue reflete os processos vitais dos animais em função das variações internas ou ambientais (NUSSEY et al., 1995). Embora menos específicos, o hematócrito (Ht), os teores de hemoglobina ([Hb]), os níveis de proteína e glicose são sensíveis a certos tipos de poluentes. Em alguns estudos, esses parâmetros têm sido úteis como biomarcadores de efeito de substâncias químicas em peixes (WINKALER et al., 2001).

Vários estudos têm mostrado mudanças hematológicas em peixes expostos a agentes estressores, como os poluentes inorgânicos (CARVALHO e FERNANDES, 2006; MAZON et al., 2002; ROGERS et al., 2003). Oliveira (2003) observou reduções no Ht e no número de células vermelhas circulantes em exemplares de *C. macropomum* expostos à concentração subletal de chumbo e em uma mistura de chumbo e cobre. A diminuição do Ht e [Hb] também foi observada em truta arco-íris exposta ao chumbo (ROGERS et al., 2003).

O plasma sanguíneo também é constantemente utilizado para aferir os íons envolvidos na homeostase iônica. A manutenção das concentrações iônicas internas constantes e compatíveis com as funções celulares é essencial e requer regulação ativa das taxas de fluxo de água e de íons. Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes. Isto ocorre devido à íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático. Assim, a osmolaridade plasmática, as concentrações individuais dos íons sódio, cloreto e potássio, são exemplos de variáveis fisiológicas utilizadas como indicadoras de efeitos subletais de poluentes em peixes (SIMONATO, 2006).

Adams et al. (1990) e Winkaler et al. (2001) afirmam que os biomarcadores fisiológicos, histológicos e bioquímicos vêm sendo utilizados amplamente para apontar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de contaminantes ambientais. Em peixes expostos a substâncias químicas, um dos principais órgãos afetados é o fígado. Isso ocorre porque no fígado são realizadas várias reações bioquímicas, como, por exemplo, o metabolismo dos metais e de hidrocarbonetos. Desta forma, o fígado acumula grande parte

destes compostos (LINDE et al., 1998). O elevado acúmulo de metais no fígado pode ocasionar sérias lesões hepáticas e histopatológicas como, por exemplo, aumento no volume celular, necrose e degeneração dos hepatócitos, promovendo disfunções hepáticas (MAZON, 1997). Essas lesões também podem ser avaliadas pela presença de algumas enzimas, que são liberadas no plasma pelo fígado danificado, como as aminotransferases e a fosfatase alcalina (HEATH, 1995).

As enzimas aminotransferases são intracelulares e constituem um grupo de enzimas que catalisam a transferência de um grupo amina de um α -aminoácido para um α -cetoácido. As aminotransferases do plasma são utilizadas para o diagnóstico de certas afecções do fígado que levam à destruição e necrose dos tecidos. Portanto, a presença de níveis elevados dessas enzimas no plasma indica lesão de células ricas em transaminases (CHAMPE e HARVEY, 1996). A aspartato amino transaminase (AST) e a alanina amino transaminase (ALT) são exemplos de aminotransferases cujo aumento da atividade no plasma pode ser um indicador de dano celular na membrana de certos órgãos, principalmente, o fígado (BOON et al., 1992). A enzima fosfatase alcalina (FA) também está sendo utilizada para a mesma finalidade. Esta enzima é derivada do fígado, intestino, rins e ossos e sua presença aumentada no sangue está relacionada a certas doenças ósseas ou quando há obstrução dos ductos biliares. Portanto, a dosagem da fosfatase alcalina no sangue é uma das mais sensíveis e úteis provas da função hepática (RAW, 1981).

Estudos sobre a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) estão sendo realizados em peixes expostos a metais de transição, óleo cru, agrotóxicos, pesticidas e hidrocarbonetos, para verificação dos efeitos tóxicos desses poluentes sobre os sistemas enzimáticos desses animais (DAS e MUKHERJEE, 2000; EL-DEMERDASH e ELAGAMY, 1999; KARAN et al., 1998; OLIVEIRA, 2003; MEDDA et al., 1995). Aumento nas concentrações de ALT, AST e FA foi descrito para exemplares de *C. macropomum* expostos a concentrações subletais de cobre e chumbo (OLIVEIRA, 2003) e à fração solúvel de petróleo fotomodificado (OLIVEIRA, 2010).

A enzima acetilcolinesterase (Ache), mais conhecida como colinesterase (Che), é uma enzima do sistema nervoso que desempenha um importante papel na regulação dos impulsos nervosos até as sinapses colinérgicas (HEATH, 1995). De acordo com Rao (2006) e Viarengo et al. (2007), a acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina na sinapse colinérgica de vertebrados e invertebrados, facilitando assim a transmissão de impulsos nervosos de um neurônio colinérgico para o próximo.

As colinesterases (Che) são os biomarcadores mais utilizados na avaliação dos efeitos de exposição de organismos a vários pesticidas organofosforados e carbamatos (ALPUCHE-GUAL e GOLD-BOUCHOT, 2008). Segundo Viarengo et al. (2007), as colinesterases, nos vertebrados, constituem uma classe de serina hidrolases e compreendem duas isoenzimas: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Determinados agentes tóxicos são anticolinérgicos, podendo inibir esta enzima, pela ligação destes compostos ao sítio esteárico da enzima, impedindo a hidrólise da acetilcolina. Na presença de baixas concentrações e curtos intervalos de tempo, os compostos são rapidamente removidos do sítio esteárico e a atividade da colinesterase é rapidamente restaurada. Porém, sob a presença de altas concentrações do poluente, essa ligação pode ser irreversível (SMITH, 1959).

1.4 USO DE ENSAIO DO COMETA E ANORMALIDADES NUCLEARES COMO BIOMARCADORES

Compostos genotóxicos alteram a estrutura química do DNA, podendo causar câncer, morte celular e ocasionar mudanças na frequência de bases nitrogenadas (MICHELMORE e CHIPMAN, 1998). Portanto, esses compostos podem produzir relevantes impactos ecológicos pelo insucesso reprodutivo das populações (WIRGIN e WALDMAN, 1998). O Ensaio Cometa (EC), “Single Cell Gel Electrophoresis”, como um teste de genotoxicidade, apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. A utilização deste teste como biomarcador de contaminação ambiental tem sido recomendada para organismos aquáticos (HOOK e LEE, 2004; KLOBUCAR et al., 2003).

A ocorrência de micronúcleos é outro importante teste de genotoxicidade. De acordo com Heddle et al. (1991), os micronúcleos surgem de fragmentos de cromossomos que não são incorporados no núcleo da célula depois da mitose, como consequência de dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos. A presença de micronúcleos pode ser tomada como indicação prévia de aberração cromossômica (genotoxicidade) (MALUF e ERDTMANN, 2003). Entretanto, os mecanismos de formação das anormalidades nucleares não são completamente conhecidos (AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ, 2001). Carrasco et al. (1990) classificaram as anormalidades em núcleo lobado, núcleo vacuolado, núcleo segmentado e núcleo em forma de rim, além do típico micronúcleo.

Micronúcleos e anormalidades nucleares têm sido utilizados com sucesso como biomarcadores e ou indicadores genotóxicos de contaminação em peixes expostos a

substâncias químicas que possuem capacidade genotóxica como os HPAs (GRAVATO e SANTOS, 2002; PACHECO e SANTOS, 1997, 1998) e os metais de transição (AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ, 2001; RISSO-DE FAVERNEY et al., 2001; SANCHEZ-GALLAN et al., 1999).

1.5 A ESPÉCIE *Colossoma macropomum*

Conhecida na Amazônia por tambaqui, a espécie *Colossoma macropomum* pertence à ordem Characiformes, família Serrassalmidae (MIRANDE, 2010). Essa espécie é nativa da bacia amazônica e orinoco, podendo atingir até um metro de comprimento e pesar 30 kg, sendo considerada o segundo maior peixe da América do Sul (ISAAC e RUFFINO, 2000). Este peixe, quando na natureza, é onívoro e alimenta-se geralmente de frutos e sementes. Em cativeiro aceita ração, fato que em conjunto com sua rusticidade o torna uma espécie das mais utilizadas na piscicultura na região. Sua carne é bastante apreciada pela população local (ARAÚJO-LIMA e GOLDING, 1998). Com a finalidade de preservar o meio ambiente e suprir a demanda crescente de proteína de origem animal e, sobretudo devido ao seu fácil manejo, o tambaqui é uma das principais espécies produzidas comercialmente ou experimentalmente no país (VALENTIN et al., 2000). Esta espécie migradora está amplamente distribuída pela planície hidrográfica.

Colossoma macropomum (tambaqui) é uma espécie de fácil manuseio e manutenção em laboratório. Aspectos da sua fisiologia, genética, bioquímica e ecologia já foram descritos na literatura especializada (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; WOOD et al., 1998). Além disso, o tambaqui tem sido utilizado como espécie alvo em estudos com diversos tipos de agentes estressantes como o pH (WOOD et al., 1998), hipóxia (VAL, 1995), temperatura (MOURA et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001), petróleo e seus derivados (MACO-GARCIA, 1997; VAL e ALMEIDA-VAL, 1999; OLIVEIRA, 2010); e metais de transição como zinco (MATSUO et al. 2001), alumínio (MATSUO e VAL, 2003), e cobre (MENEZES, 2005; OLIVEIRA, 2003).

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do chorume proveniente da lixeira pública de Parintins em tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1818), após 96h de exposição e após exposição *in situ* no Lago do Macurany.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

❖ Caracterizar semi-quantitativamente os compostos orgânicos (naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzopireno, benzoantraceno, benzofluoranteno, e indenopireno) e inorgânicos (cobre, cádmio e chumbo) presentes no chorume da lixeira pública de Parintins-Am e na água do Lago do Macurany.

❖ Avaliar o uso de biomarcadores de efeito da contaminação por chorume, após exposição em testes laboratoriais por 96h.

❖ Validar os biomarcadores após incubação de exemplares de *Colossoma macropomum* no Lago do Macurany.

❖ Avaliação do impacto ambiental da presença de despejos tóxicos no Lago do Macurany após exposição *in situ*, para *Colossoma macropomum*, utilizando-se os biomarcadores testados em laboratório.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DE CHORUME

Foram coletados cerca de oito litros de chorume, proveniente da lixeira pública de Parintins-Am, em vidros âmbar e armazenado em condição refrigerada, para posterior análise. Parte da amostra de chorume foi utilizada nos experimentos de exposição de *C. macropomum* a concentração subletal. Outra parte foi utilizada para realização da análise e caracterização quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos.

3.2 COLETA DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Foram adquiridos juvenis de *C. macropomum* ($39,1 \pm 2,9g$; $11,0 \pm 0,3cm$) em piscicultura ($02^{\circ}38'15,8''S$ e $56^{\circ}45'14,0''W$) da região de Parintins e transportados ao Laboratório de Biologia do Centro de Estudos Superiores de Parintins da Universidade do Estado do Amazonas (CESP-UEA). No laboratório, os animais foram aclimatados em aquários de 6L, dotados de sistema de aeração constante, por 72h, antes do início da exposição ao chorume.

Os experimentos foram desenvolvidos por meio de dois protocolos experimentais. O primeiro buscou testar biomarcadores de chorume, com exposição laboratorial, e o segundo buscou avaliar o impacto ambiental por meio da exposição dos animais *in situ* no Lago do Macurany. Essas séries experimentais estão descritas a seguir.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: EXPOSIÇÃO AGUDA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE CHORUME

Foram realizados experimentos laboratoriais com exposição dos exemplares de *C. macropomum* ao chorume, oriundo da lixeira pública de Parintins-Am, com a intenção de induzir os marcadores fisiológicos, enzimáticos e genotóxicos a serem testados. Utilizou-se 32 indivíduos distribuídos em grupos de 8 exemplares expostos em aquários individuais (figura 1a), com capacidade para 6 litros, contendo água do poço+chorume em três diferentes diluições (1:100, 1:1000 e 1:10000) por um período de 96h. Outro grupo de 8 espécimes de *C. macropomum* foi exposto à água do poço do CESP, sendo considerado o grupo controle. Os

aquários foram dotados de sistemas semiestáticos, com substituição diária de 10% da solução-teste, aeração constante e com o monitoramento da temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido. Foram coletadas amostras de água, dos aquários, no início e no final da exposição para a caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos, seguindo os mesmos procedimentos para análise de chorume.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: EXPOSIÇÃO *IN SITU* NO LAGO DO MACURANY

Foram realizados experimentos de exposição *in situ* de exemplares de *C. macropomum* no Lago do Macurany, nos arredores da lixeira de Parintins-Am, para verificar se os efeitos são semelhantes aqueles do protocolo experimental I e, conseqüentemente, afetam a saúde dos peixes. Os marcadores avaliados foram os mesmos do protocolo I. Os exemplares de *C. macropomum* foram expostos em gaiolas plásticas (Figura 1b), em dois diferentes tempos de exposição, 24 e 48h. Para as condições experimentais utilizou-se 30 indivíduos da espécie *C. macropomum* distribuídos em grupos de 3 exemplares expostos em gaiolas plásticas com volume de 9L à jusante da lixeira (02°38'51,0''S e 56°43'73,6''W). Outro grupo, de 30 espécimes de *C. macropomum*, foi exposto no Lago do Macurany em um ponto à montante da lixeira (02°39'04,1''S e 56°43'68,0''W) sendo considerado grupo controle.

Foi realizado o monitoramento da temperatura, do pH, da condutividade elétrica e do oxigênio dissolvido da água do entorno das gaiolas, bem como foram coletadas amostras de água para a caracterização dos compostos orgânicos e inorgânicos, conforme descrito posteriormente.



Figura 1 Experimento de exposição aguda a concentrações subletais de chorume (A) e experimentos de exposição *in situ* no Lago do Macurany (B).

3.5 ACOMPANHAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA

As medidas das características físico-químicas da água foram efetuadas diariamente durante a execução dos testes experimentais. Os valores de pH foram obtidos com auxílio de um pHmetro da marca Micronal, modelo B374 e as medidas de temperatura e oxigênio dissolvido foram realizadas com o auxílio de um oxímetro da marca YSI, modelo 55/12 FT.

3.6 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS

Foi realizada a caracterização semi-quantitativa de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e de metais de transição presentes no chorume e na água dos experimentos descritos. Para isso, as amostras para leitura de HPAs foram coletadas em vidros âmbar (250 mL) cobertos com papel alumínio e armazenadas em refrigerador no CESP e, posteriormente, foram transportadas ao Laboratório de Biotecnologia da UEA para serem analisadas.

As amostras destinadas a leitura de metais também foram coletadas em vidro âmbar (250 mL) e cobertos com papel alumínio, sendo em seguida acidificadas com ácido nítrico (HNO₃) a 10%. Essas amostras foram refrigeradas e armazenadas no CESP até serem transportadas ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular-LEEM para análise.

3.6.1 Análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

3.6.1.1 Extração

As amostras foram submetidas à extração líquido-líquido. Utilizando um funil de separação de 125 mL, os compostos orgânicos foram extraídos, de 30 mL de amostra, com 60 mL de uma mistura de solventes (hexano e diclorometano, na proporção 1:1). Após agitação vigorosa e separação das fases, foi retirada a fase orgânica. O processo foi realizado em três etapas, divididas por cada 20 mL da mistura de solventes, monitorando a extração por meio da técnica de Cromatografia de Camada Delgada – CCD com revelação na luz ultravioleta. Em seguida, as amostras foram concentradas com a retirada do solvente em um evaporador rotativo. As amostras foram concentradas até o volume final de 1 mL para a análise no cromatógrafo com fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM).

3.6.1.2 Análises químicas por CG/EM

A determinação semi-quantitativa da presença dos compostos orgânicos foi realizada pela injeção de 1 μL da amostra em um cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010) acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM Shimadzu QP 2010). O equipamento operou no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) (70eV), com temperatura da interface e da fonte de íons a 220°C. A coluna capilar utilizada foi a RTX 5 MS da Restec de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com fase estacionária (5% de difenil, 95% de dimetil polisiloxano) de 0,25 μm . A rampa de temperatura utilizada na separação dos compostos iniciou em 40°C mantendo-se em isoterma por um minuto, seguido de uma rampa de aquecimento de 5°C/min até 200°C, que foi mantido sob isoterma por três minutos.

3.6.1.3 Análise de Metais de Transição

Alíquotas das amostras de chorume foram pré-concentradas com ácido nítrico e em seguida foram filtradas para serem lidas em espectrofotômetro de absorção atômica. Os metais analisados foram Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) por meio de espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite com temperatura de aproximadamente 1200 °C, no equipamento marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 800. O teor de cada metal foi lido através de lâmpadas específicas (catodo oco) para cada elemento. As amostras foram colocadas na torre de fonte para serem processadas e lidas. Os valores de cada leitura foram automaticamente transferidos para uma planilha eletrônica pelo próprio software do equipamento. O gás utilizado foi o argônio adquirido da White Martins Ltda com o grau de pureza específico para a leitura de espectrofotometria de absorção atômica.

3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Após a exposição (protocolo I e II), os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,5g.L⁻¹) e as amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal usando seringas heparinizadas. As amostras de sangue foram utilizadas imediatamente na determinação dos parâmetros hematológicos, nos esfregaços e nas lâminas de cometa. Para separação do plasma, o sangue foi transferido para tubos Eppendorf e centrifugado em uma mini-centrífuga

a 3000rpm por 10 minutos para ser utilizado nas análises dos parâmetros iônicos e enzimáticos.

3.7.1 Parâmetros Hematológicos

3.7.1.1 Hematócrito (Ht)

Em tubos de microhematócrito, heparinizados, foram coletadas duas amostras de sangue de cada animal. Os tubos tiveram uma das suas extremidades vedados com fogo e centrifugados em uma centrífuga de microhematócrito FANEM 207N a 12000 rpm durante 10 minutos. A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi realizada com auxílio de um cartão padronizado.

3.7.1.2 Concentração de hemoglobina [Hb]

A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o método da cianomethohemoglobina descrito por Kampen e Zijlstra (1964), que consiste em adicionar 10µl de sangue em 2ml da solução de Drabkin (KCN 0,5g; KH₂PO₄ 14g; K₃[Fe(CN)₆] 2,0 g em 1000ml de água destilada) que, após diluído, permaneceu por 10 minutos em repouso, para a efetivação da hemólise. O conteúdo do tubo foi adicionado em uma cubeta de plástico e a absorbância medida em um espectrofotômetro Bioespectro SP-22. A absorbância foi determinada em 540nm, utilizando a solução de Drabkin como “branco”. A concentração de hemoglobina será determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{g \% Hb} = \text{ABS (540nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra.}$$

3.7.1.3 Contagem de eritrócitos circulantes (RBC)

Para a contagem de eritrócitos o sangue foi diluído em uma solução de formol citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2,0ml de formol 40% e água destilada q.s.p. 100ml), na proporção de 1:200 (volume de sangue: volume de diluente). Após a homogeneização, a contagem dos eritrócitos (10⁶/mm³) foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer em objetiva de 40X em um microscópio Motic.

3.7.1.4 Determinação das Constantes Corpusculares

As constantes corpusculares, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram calculadas como descrito por Brow (1976), conforme segue:

- a) $VCM (\mu m^3) = Ht \times 10/RBC$
- b) $HCM (\mu g) = [Hb] \times 10/RBC$
- c) $CHCM (\%) = [Hb] \times 100/Ht$

3.7.1.5 Concentração de glicose sanguínea

As concentrações de glicose foram determinadas por meio de análise eletroquímica das amostras, em um medidor eletrônico (Accu-Chek Advantage II/Roche®). Para isso aproximadamente 10µl de sangue total foram colocados nas fitas de leitura do aparelho. Os resultados estão expressos em mg/dL.

3.7.2 Parâmetros iônicos

Para avaliação da homeostase iônica foram determinadas as concentrações plasmáticas dos íons sódio, potássio e cloreto (Na^+ , K^+ e Cl^-).

3.7.2.1 Concentrações de Na^+ e K^+

Para determinação das concentrações de Na^+ e K^+ , as amostras de plasma foram diluídas 1000 vezes em água deionizada. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de absorção atômica da marca Perkin Elmer – AANALYST 800 e os resultados estão expressos em mEq/L.

3.7.2.2 Concentrações de Cl^-

O método de determinação da concentração de cloreto no plasma consiste em diluir o plasma 1000 vezes em água MilliQ. A 150 µL de plasma diluído foram adicionados 150 µL de uma solução reagente de cor (tiosulfato de mercúrio e nitrato férrico 20,2%, nas proporções

de 1:1). Esse método depende da liberação do íon tiocianeto proveniente do tiocianeto de mercúrio pela formação da forma não ionizada e solúvel do cloreto de mercúrio. Na presença do íon ferro, o tiocianeto liberado produz uma forte coloração que é proporcional à concentração de cloreto original. A amostra foi lida em comprimento de onda de 480nm em leitor de microplaca Spectra Max® (Molecular Devices).

3.7.3 Parâmetros enzimáticos

Para as análises enzimáticas foram avaliadas as concentrações das enzimas Aspartato aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), e colinesterase (Che).

3.7.3.1 Atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT)

As concentrações de AST e ALT foram determinadas usando-se kits comerciais específicos da marca In vitro®, Itabira-MG-Brasil. O método para a AST consiste na catálise da reação de ácido oxalacético com ácido glutâmico produzindo ácido α -cetoglutárico e ácido aspártico. Para a ALT o método consiste na catálise da reação de ácido pirúvico com ácido glutâmico produzindo alanina e ácido α -cetoglutárico. Ambas as reações são reversíveis. As atividades da AST e da ALT foram determinadas medindo-se o nível de oxalacetato ou de piruvato, formados em condições padronizadas (pH e temperatura), enquanto o ácido α -cetoglutárico se transamina para ácido glutâmico. As concentrações da ALT e da AST foram determinadas por meio da equação da curva padrão de cada uma das enzimas.

A leitura das absorbâncias foi realizada em um espectrofotômetro Genesis-2. A diferença na atividade óptica entre os valores de absorbância em 505nm indica o teor de 2,4-dinitrofenil-hidrazona das amostras, que corresponde ao teor de oxalacetato ou piruvato existente na amostra. Uma unidade de transaminase corresponde à quantidade de 1 μ g de ácido pirúvico ou de ácido oxalacético formado em 1 minuto a 25°C. Os resultados foram expressos em unidades internacionais (UI).

3.7.3.2 Atividade da fosfatase alcalina (FA)

A concentração da fosfatase alcalina no plasma foi determinada por meio de Kit específico da marca In vitro®, Itabira-MG-Brasil. O método se baseia no fato de que o soro que apresenta esta enzima hidrolisa o glicerolfosfato (substrato) em pH alcalino, liberando o fosfato. O número obtido na dosagem teste, menos o teor de fosfato inorgânico do soro, fornece o teor da fosfatase expresso em unidades internacionais (UI). A amostra foi lida em um espectrofotômetro Genesis-2 em 410nm.

3.7.3.3 Atividade da colinesterase (Che)

A concentração da enzima Che foi determinada indiretamente pela presença da pseudo-colinesterase presente no plasma com auxílio de um Kit específico In vitro®, Itabira-MG-Brasil. O método consiste na hidrólise da propioniltiocolina pela colinesterase, com a liberação de grupo sulfidrílico livre a partir da tiocolina. O grupo sulfidrílico livre reagiu com DTNB (5,5-ditiobis-(ácido 2-nitronzóico)) levando à formação de um composto amarelo que é proporcional à concentração de colinesterase da amostra. A leitura da absorvância foi realizada em 410nm em um espectrofotômetro Genesis-2. Os resultados estão expressos em UI/mL.

3.7.4 Parâmetros Genotóxicos

Foram realizados ensaios do cometa e anormalidades nucleares para avaliação de danos genéticos nos peixes expostos às condições experimentais descritas nos protocolos I e II.

3.7.4.1 Ensaio do Cometa

As análises de fragmentos de DNA foram realizadas por meio do ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata. O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso, lâminas de microscopia, em duplicata, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80g de agarose e 120mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) e foram mantidas em geladeira para uso posterior. As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em um meio de cultura de células e, posteriormente, 10µl do sangue

diluído foram misturados com 190 μ l de agarose “low melting” (0,15g de agarose em 20mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 37°C. Em seguida as amostras de sangue foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhasse uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocadas na solução de lise (146,1g NaCl (2,5M), 37,2g EDTA (100mM), 1,2g de Tris (10mM)), 1 litro de água destilada, sendo o pH da solução ajustado para 13 com NaOH. No momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO por no mínimo 1h, em geladeira e protegidos da luz.

Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300mM NaOH e 1mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética com 25V e 300mA por 15 min. Depois desta 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 então lavadas duas vezes com água destilada. As lâminas foram secas por no mínimo 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. Novamente, as lâminas foram lavadas por três vezes e secas por 2h a 37°C. Depois de secas, as lâminas foram hidratadas por 5 min e coradas com solução de coloração com prata que consiste em: 66mL da solução de carbonato de cálcio (12,5g de carbonato de cálcio para 250ml de água) e 34mL da solução de nitrato de prata (50mg de nitrato de prata, 50mg de nitrato de amônio, 250mg de ácido tungstosalicílico e 125 μ l de formaldeído) por 15 min a 37°C. Depois de coradas, as lâminas foram lavadas por três vezes 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. A observação dos cometas foi feita com auxílio de microscópio ótico da marca MOTIC com aumento de 100X. Foram contadas 100 células de cada lâmina e os cometas foram classificados conforme forma e tamanho da cauda de 0 (não danificado) a 4 (dano máximo) (COLLINS et al., 1995). O tamanho da cauda é proporcional ao nível de fragmentação de DNA.

3.7.4.2 Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE)

Os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol por 10 minutos e depois de secos foram corados com uma solução May-Grünwald por 2 minutos, May-Grünwald e água destilada 1:1 por 10 minutos e Giemsa e água destilada 1:6 por 10 minutos. Em seguida foram

lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente (SANCHEZ-GALAN et al., 1998). Segundo Carrasco et al. (1990), as lesões nucleares foram divididas em quatro categorias: a) Micronúcleo (M); b) Núcleo lobado (L); c) Núcleo segmentado (S) e d) Núcleo em forma de rim (K). Foram contadas 2000 células adultas de cada indivíduo com o auxílio de microscópio ótico da marca MOTIC com aumento de 100X. O resultado está expresso em porcentagem (%) de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), considerando a soma de todas as lesões (M+L+S+K).

3.7.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro padrão da média (SEM). Os resultados da expressão dos biomarcadores, protocolo I, em relação à concentração do chorume foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA, um fator). Para os resultados que mostraram indicação de existência de diferença significativa em nível de 5% foi aplicado o teste de Tukey para discriminação das diferenças (ZAR, 1984). Os resultados obtidos da expressão dos biomarcadores, protocolo II, Lago do Macurany, foram submetidos à comparação por teste t de Student, assumindo o nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS

Os parâmetros hematológicos, iônicos, enzimáticos e genotóxicos foram determinados e avaliados para utilização como potenciais biomarcadores de contaminação pelo chorume nos protocolos experimentais I e II.

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I: EXPOSIÇÃO AGUDA A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE CHORUME

4.1.1 Sobrevivência dos animais

De um modo geral as concentrações de chorume utilizadas nos ensaios laboratoriais mostraram ser subletais aos exemplares de tambaqui testados. Durante o período experimental de exposição, por 96h, a sobrevivência dos peixes foi de 100% no grupo controle e nas duas maiores diluições, porém na proporção de 1:100 ocorreu a mortalidade de dois exemplares após 24h. Também foi observado que os animais expostos ao chorume, principalmente na diluição 1:100, apresentaram leve produção de muco, leve expansão do lábio inferior e nadavam na coluna superficial da água. A expansão do lábio inferior é frequentemente observada nessa espécie quando os indivíduos encontram-se em ambientes hipóxicos (ALMEIDA-VAL E VAL, 1995), como o verificado aqui, pois as concentrações de oxigênio dissolvido encontravam-se em valores relativamente baixos para sobrevivência da espécie.

4.1.2 Parâmetros Químicos do Chorume

As características químicas do chorume estão apresentadas na tabela 1. Entre os HPAs analisados, o fenantreno foi o que apresentou a maior média amostral, o benzo (a) antraceno foi o que apresentou a menor média, porém este último é de extrema importância quanto ao seu potencial carcinogênico. Os metais analisados cádmio, cobre e chumbo apresentaram concentrações acima dos limites de descarte de efluentes em corpos d água (0,2 mg Cd/l, 0,5 mg Pb/l e 1,0 mg Cu/l).

Tabela 1: Composição do Chorume da Lixeira Pública de Parintins-Am

Chorume	Unidade	Média
Naftaleno	Nap/área	75,700±0, 2
Fenantreno	Phe/área	162,000±0, 1
Pireno	Pyr/área	100,060 5±0, 3
Benzo (a) antraceno	BaA/área	26,083±0, 2
Criseno	Chr	3.410,00±0, 9
Cádmio	mg Cd/l	1,022±0,8
Cobre	mg Cu/l	1,380±1,2
Chumbo	mg Pb/l	2,083±1,0

4.1.3 Parâmetros Físico-Químicos da Água

Durante o período experimental as características físico-químicas da água foram monitoradas diariamente. A temperatura e o pH não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para nenhum dos tratamentos em relação ao controle; entretanto, observou-se uma variação significativa nos níveis de oxigênio e condutividade nos tratamentos em relação ao controle, tabela 2. Os valores de HPAs (determinado apenas em área sob os picos do cromatograma), oriundos da diluição de chorume estão apresentados na tabela 3. O naftaleno, fenantreno e benzo(a)antraceno também foram detectados na água do poço da UEA.

Os dados correspondentes ao teor de metais de transição nas águas experimentais não foram apresentados, pois ocorreram problemas com a leitura desses compostos no equipamento, o que comprometeu a análise estatística dos resultados obtidos. A leitura dos metais será repetida nas águas dos aquários experimentais.

Tabela 2 Parâmetros físico-químicos da água utilizada nos testes de exposição de exemplares de *C. macropomum* a concentrações subletais de chorume por 96 horas.

Tratamentos	Oxigênio (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Condutividade (mv)
(T1) Controle (n=8)	5, 9±0, 1 ^a	29, 0±0, 1 ^a	7, 9±0, 1 ^a	10, 4±1, 3 ^a
(T2) Diluição 1:100 (n=6)	2, 5±0, 1 ^b	29, 5±0, 1 ^a	7, 5±0, 1 ^a	27, 3±3, 3 ^b
(T3) Diluição 1:1000 (n=8)	2, 4±0, 1 ^b	29, 5±0, 1 ^a	7, 2±0, 1 ^a	23, 9±0, 6 ^b
(T4) Diluição 1:10000 (n=8)	2, 5±0, 5 ^b	29, 5±0, 1 ^a	7, 1±0, 1 ^a	21, 3±0, 9 ^b

n= número de unidades experimentais para cada tratamento.

^{a, b}= indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p<0,05).

Tabela 3 Média dos valores de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) da água utilizada nos testes de exposição de exemplares de *C. macropomum* a concentrações subletais de chorume por 96 horas.

Composto	T1-Controle	T2-Diluição 1:100	T3-Diluição 1:1000	T4-Diluição 1:10000
Naftaleno	100.822,00	179.556,00	125.511,00	119.743,00
Fenantreno	6.420,00	170.630,50	158.051,00	146.21,00
Pireno	-	106.558,50	95.508,00	53.380,00
Benzo (a) antraceno	6.145,00	31.328,00	19.700,00	7.427,00
Criseno	-	2.148,00	1.144,00	1.102,00

(-) = compostos não detectados

4.1.4 Parâmetros Hematológicos

Os valores de hematócrito (Ht) (figura 2), diminuíram significativamente no grupo exposto à diluição de 1:100 quando comparado aos demais grupos. Não foram observadas diferenças para os peixes expostos às diluições de 1:1000 e 1:10000 em relação ao controle. No entanto, para concentração de hemoglobina e para RBC ocorreram reduções em todos os grupos expostos ao chorume em comparação ao controle. Ainda, os menores valores de hemoglobina e RBC foram obtidos para o grupo T2, seguido de T3 e de T4.

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), estão apresentados na figura 3, respectivamente. Apesar dos valores de VCM terem variado nos diferentes tratamentos em relação ao controle, os tratamentos T2 e T4 não demonstraram diferença significativa entre si. Houve uma redução significativa nos valores de HCM no grupo exposto à diluição de 1:100 quando comparado aos demais grupos. Não foram observadas diferenças para os peixes expostos às diluições de 1:1000 e 1:10000 em relação ao controle. No entanto, para CHCM ocorreram reduções em todos os grupos expostos ao chorume em comparação ao controle. Ainda, os menores valores de HCM e CHCM foram obtidos para os grupos do T1, seguindo do T2 e T3.

Os valores de concentração de glicose sanguínea (figura 4) revelam um aumento significativo da concentração deste metabólito nos indivíduos expostos às diferentes concentrações de chorume em relação ao grupo controle, porém não ocorreu variação entre os grupos expostos ao chorume.

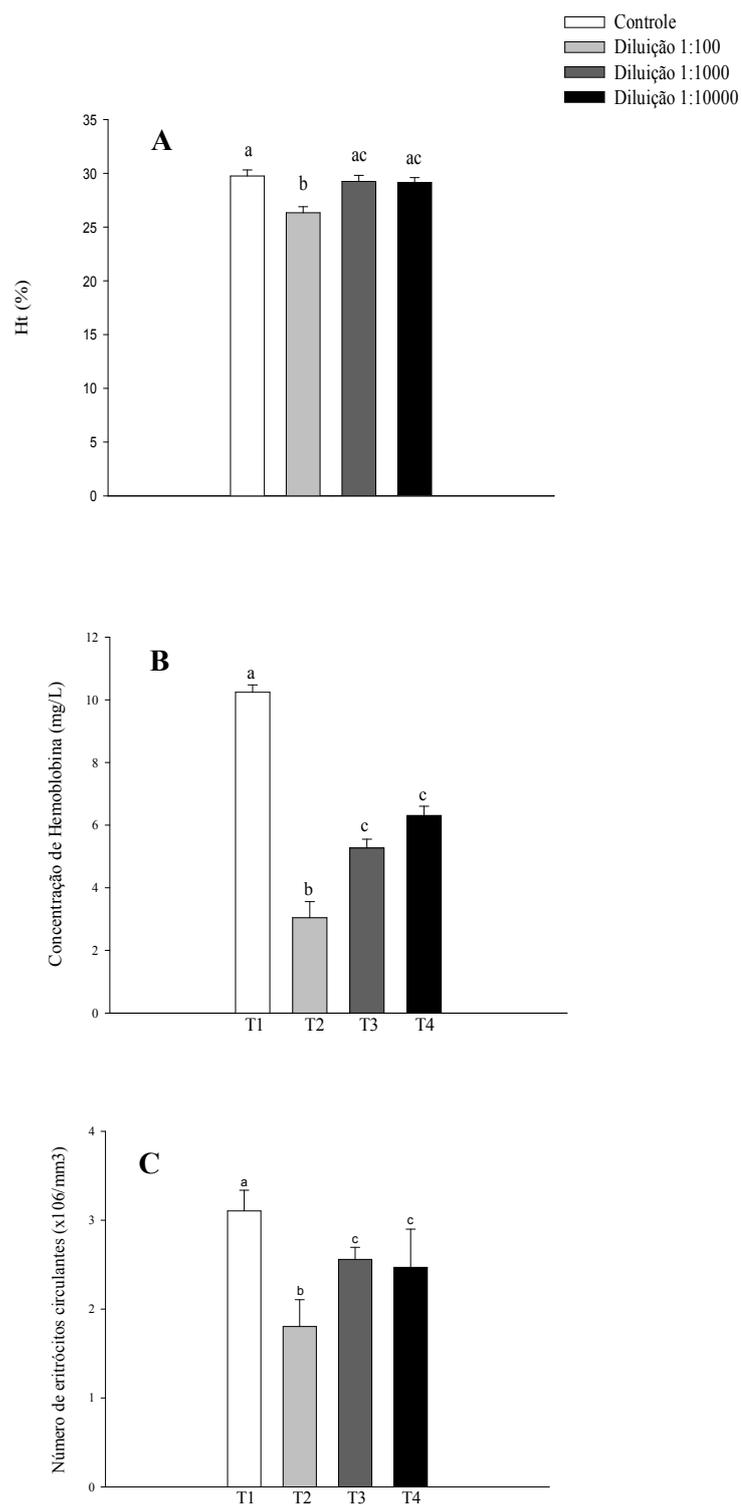


Figura 2 Hematócrito (Ht) (A), Concentração de hemoglobina ([Hb]) (B) e Número de eritrócitos circulantes (RBC) (C) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de choroume, no período de 96 horas. Letras diferentes tratamentos ($p < 0,05$)

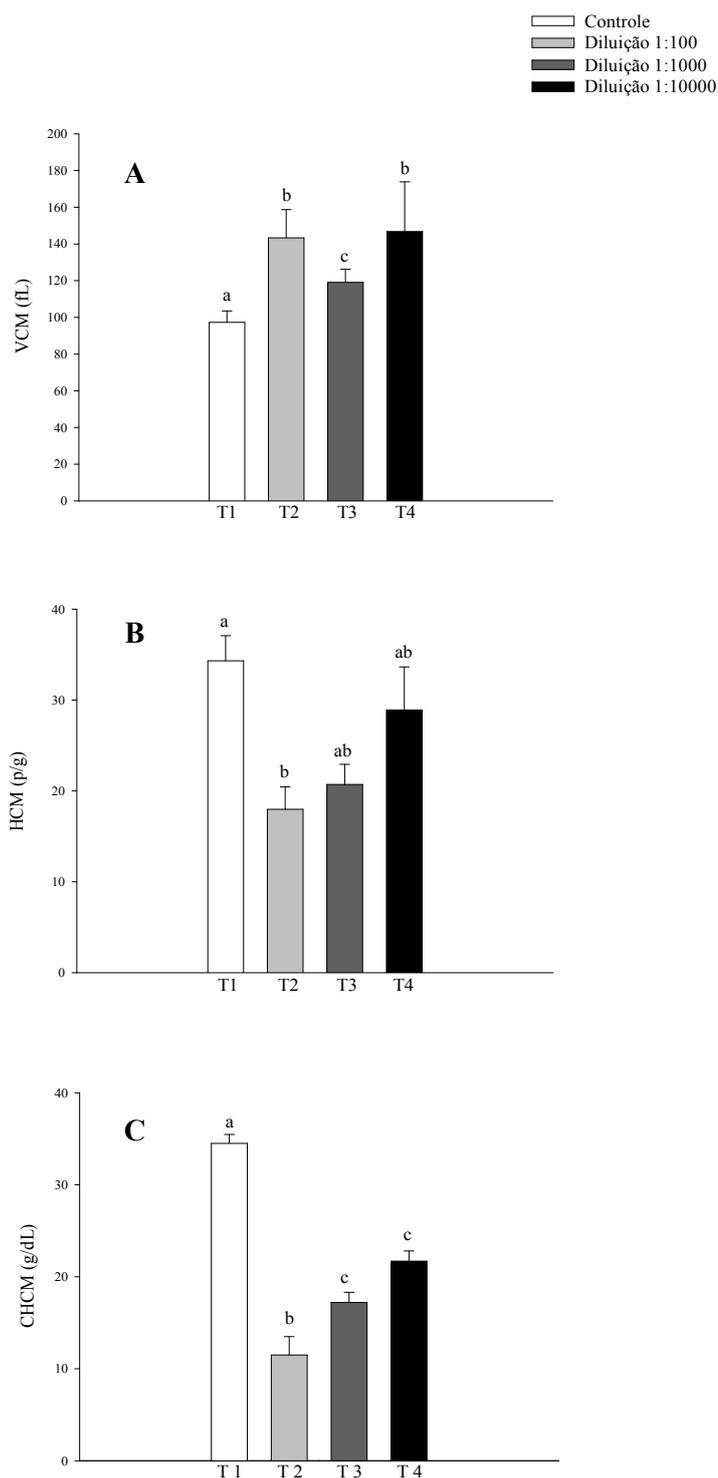


Figura 3 Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de choroume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

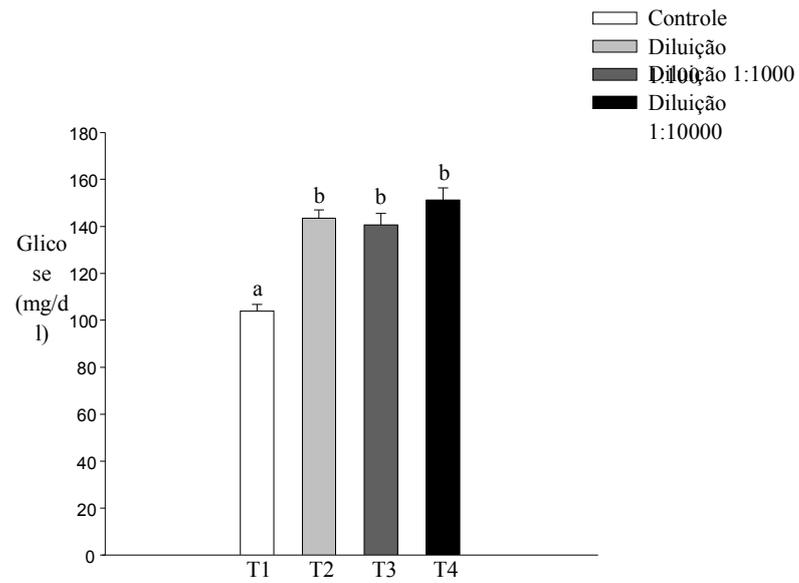


Figura 4 Níveis de glicose sanguínea de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de chorume por 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$)

4.1.5 Parâmetros Iônicos

As concentrações plasmáticas dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- dos exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chorume estão apresentados na figura 5. A concentração de Na^+ plasmático dos espécimes de *C. macropomum* expostos às três diferentes concentrações de chorume aumentaram em relação ao grupo controle, figura 5a. Também foram observados aumentos nos níveis de K^+ plasmático em relação ao controle; entretanto, não houve variação entre os grupos expostos ao contaminante, figura 5b. A concentração plasmática de Cl^- dos espécimes de *C. macropomum* expostos às diferentes concentrações de chorume aumentou em relação ao grupo controle; contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos T3 e T4, figura 5c.

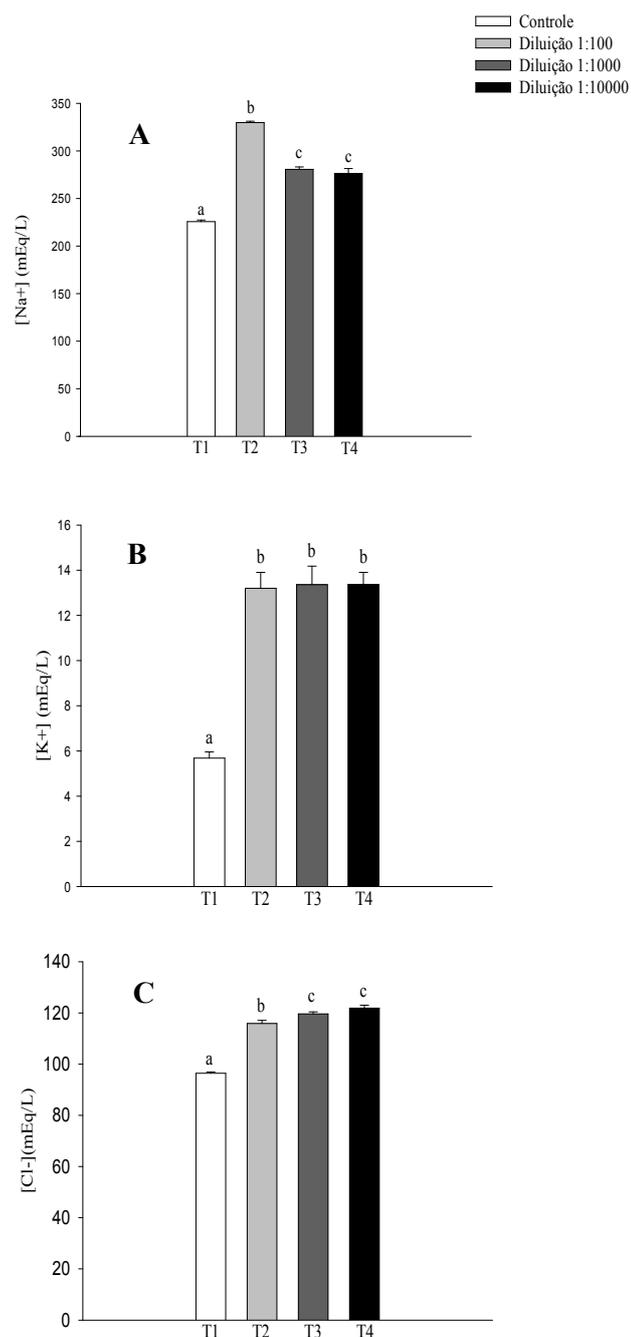


Figura 5 Níveis plasmáticos de (A) Sódio (Na⁺), (B) Potássio (K⁺) e (C) Cloreto (Cl⁻) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chumbo, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos (p<0,05).

4.1.6 Parâmetros Enzimáticos

A avaliação das concentrações das enzimas alanina aminotransferase-ALT, aspartato aminotransferase-AST, fosfatase alcalina-FA foi empregada para inferir os efeitos tóxicos causados pela exposição ao chorume, sobre o fígado de exemplares de *C. macropomum*. A avaliação da Che foi utilizada para inferir possíveis distúrbios neuromusculares ocasionados pela exposição ao chorume. Os resultados obtidos para as concentrações das enzimas ALT, AST, FA e Che estão mostrados na figura 6a, 6b, 6c e 7, respectivamente. Foram observadas diferenças entre todos os tratamentos quando comparados entre si e em relação ao controle. Ainda, exibiram um padrão dose-dependente, onde os maiores níveis enzimáticos foram obtidos para o grupo T2 seguido do T3 e do T4.

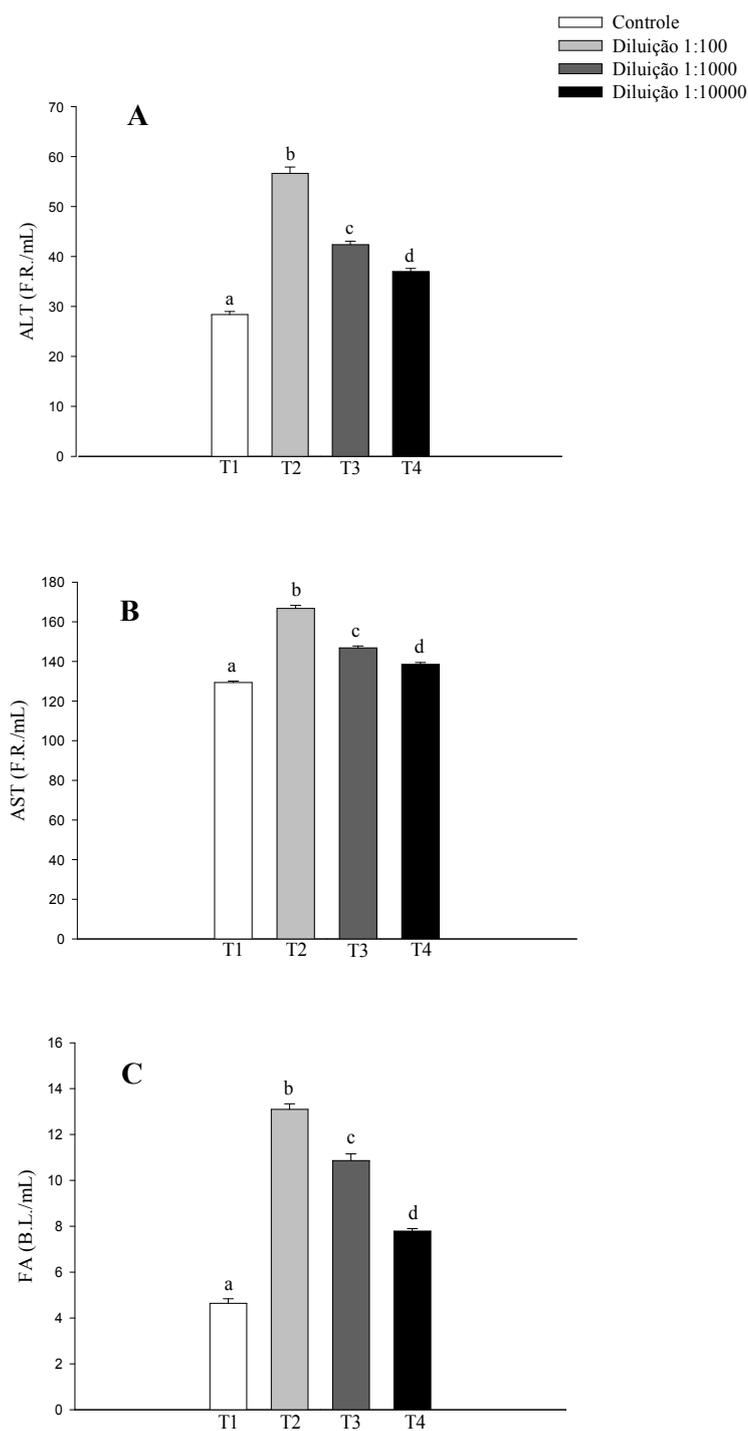


Figura 6 Concentração de Alanina Aminotransferase-ALT (A); Aspartato Aminotransferase-AST (B) e Fosfatase Alcalina-FA (C) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de chumbo, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

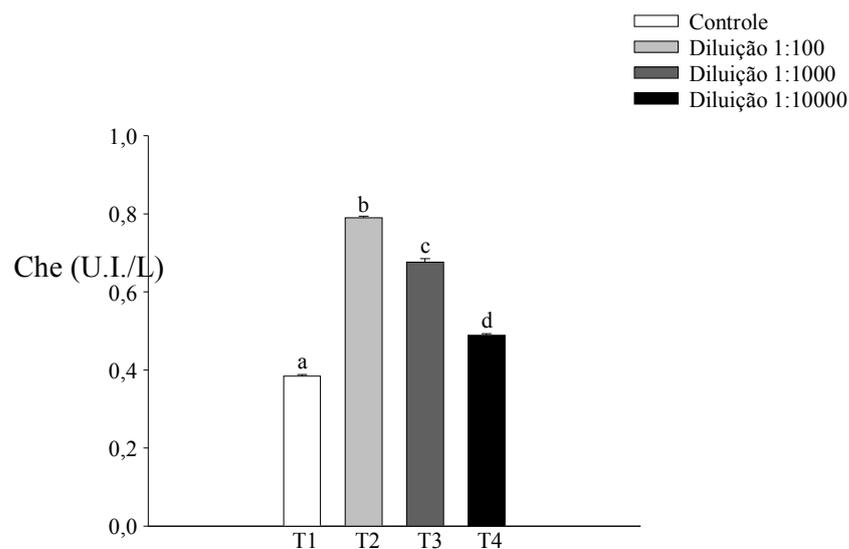


Figura 7 Concentração de Acetil Colinesterase-Che em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de choroume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

4.1.7 Parâmetros Genotóxicos

4.1.7.1 Ensaio do Cometa

Foram observadas todas as classes de danos nos exemplares de tambaqui expostos ao choroume (figura 8), assim como o aumento ($p < 0,05$) no índice de danos de DNA do sangue periférico (teste do cometa) para todos os grupos expostos (figura 9). Os aumentos observados no índice de danos de DNA corresponderam ao aumento na concentração de choroume, demonstrando um efeito dose-dependente.

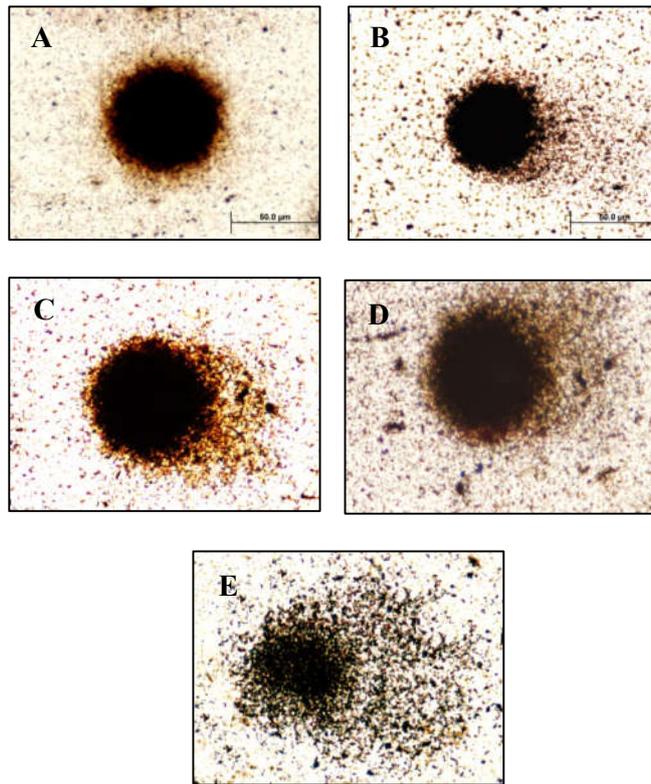


Figura 8 Classe de danos de DNA (teste do cometa) observados em juvenis de tabaqui (*C. macropomum*) expostos ao chorume. Classe 0 (sem danos) (A), classe 1 (B), classe 2 (C), classe 3 (D) e classe 4 (dano máximo) (E). Escala 50µm

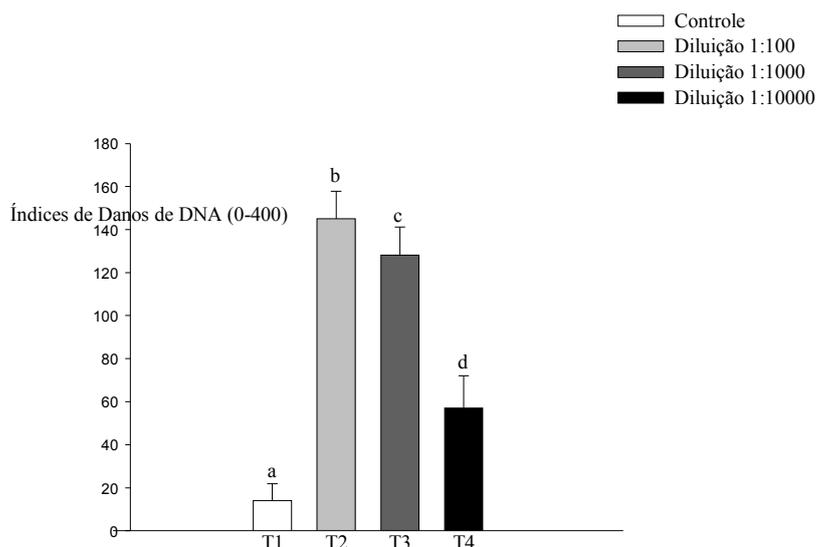


Figura 9 Índices de danos de DNA, obtidos a partir do teste do cometa, em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de choroume por 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

4.1.7.2 Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE)

Todas as anormalidades nucleares eritrocíticas descritas por Carrasco et al. (1990) foram observadas nos juvenis de tambaqui, conforme ilustrado na figura 10, no grupo controle e nos grupos expostos à concentração subletal de choroume por 96 horas. O percentual das ANE aumentou ($p = 0,05$) somente no grupo exposto ao tratamento T2 e T3 em relação ao controle e quanto ao tratamento T4 não houve diferença estatística quando comparado ao controle, conforme visto na figura 11.

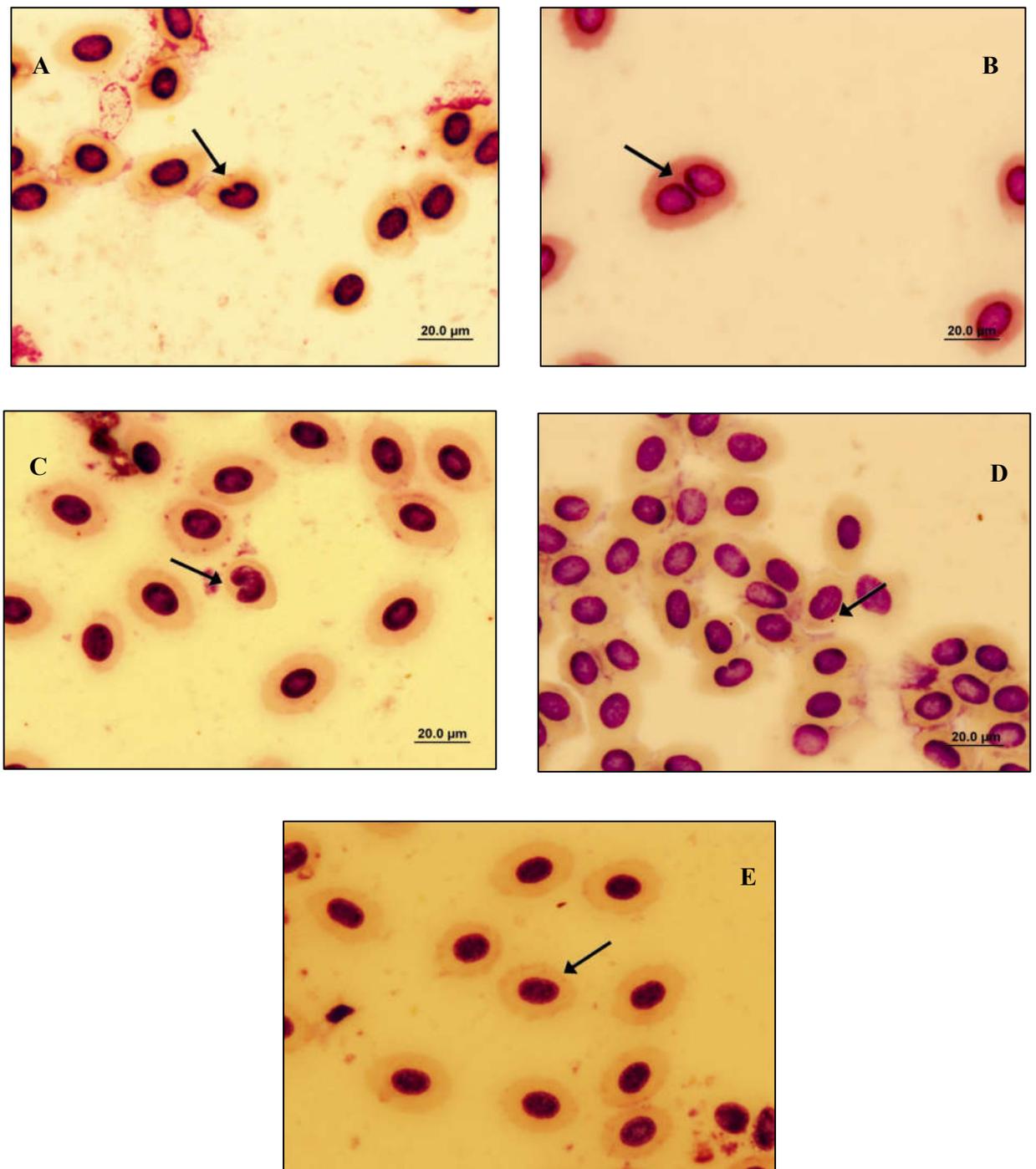


Figura 10 Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) de exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de churume, no período de 96 horas. Núcleo lobado (A), núcleo segmentado (B), núcleo em forma de rim (C), micronúcleo (D), e célula normal (E). Escala 20µm.

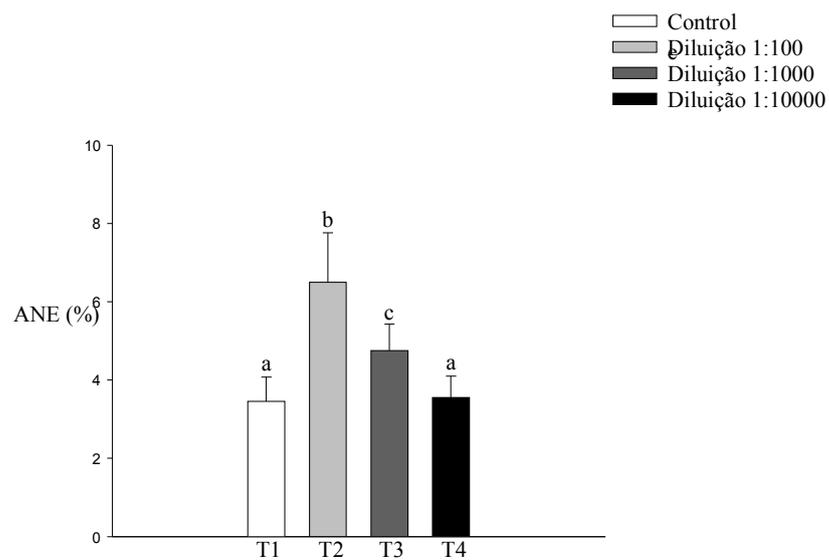


Figura 11 Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) em exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes concentrações de choroume, no período de 96 horas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II: EXPOSIÇÃO *IN SITU* NO LAGO DO MACURANY

4.2.1 Sobrevivência dos animais

A exposição *in situ* no Lago do Macurany apresentou-se subletal para os exemplares de *C. macropomum* expostos no ponto a montante da lixeira, com 100% de sobrevivência. Porém, no ponto a jusante da lixeira houve 50% de mortalidade dos exemplares testados, após 24 h. Da mesma forma ao observado nos experimentos laboratoriais, os exemplares de *C. macropomum* expostos a jusante da lixeira apresentaram leve produção de muco, expansão do lábio inferior e nadavam na coluna superficial da água.

4.2.2 Parâmetros físico-químicos da água

A tabela 4 apresenta os parâmetros físico-químicos da água observados nos pontos amostrais. Os valores encontrados demonstram variação significativa nas concentrações de oxigênio do ponto a jusante, quando comparado ao ponto a montante, bem como para o parâmetro condutividade, no tempo 24 e 48h de exposição. Entretanto os demais parâmetros apresentaram valores satisfatórios de modo que não influenciaram na indução aos biomarcadores avaliados.

Verificou-se a presença de HPAs e metais de transição na água do Lago do Macurany, tanto no ponto a montante da lixeira como no ponto a jusante, mostrados na tabela 5 e 6, respectivamente, sendo que todos os compostos analisados foram detectados em maior proporção no ponto a jusante da lixeira. .

Os resultados das análises dos compostos orgânicos mostram a presença de onze HPAs, sendo que dois deles, acenaftileno e o fluoreno, só foram identificados na água do lago no ponto a jusante da lixeira. O HPA detectado em maior proporção foi o naftaleno seguido do fenantreno e fluoreno no ponto a jusante.

Dos metais de transição analisados tanto no ponto a jusante quanto no ponto a montante do Lago do Macurany somente os valores para cádmio estão acima dos valores permissíveis pela resolução do CONAMA 357-05 para águas de classe 3. A água do Lago do Macurany é classificada nessa classe 3, isto é, água que se destina a pesca amadora, recreação, abastecimento para consumo humano após tratamento, entre outras atividades.

Tabela 4 Parâmetros físico-químicos da água do Lago do Macurany nos pontos amostrais a montante e a jusante da lixeira pública de Parintins.

Pontos amostrais	Oxigênio (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Condutividade (mv)
Montante 24h	3,7±0,1	30,0±0,1	6,3±0,4	28,4±1,3
Jusante 24h	1,6±0,2*	31,7±0,1	6,5±0,5	40,3±1,2*
Montante 48h	3,7±0,1	31,2±0,4	6,3±0,6	28,2±1,4
Jusante 48h	0,9±0,1*	31,0±0,0	6,4±0,1	41,7±1,8*

* = Indica diferença estatística significativa em relação ao local de amostragem ($p < 0,05$).

Tabela 5 Valores de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs), em área sob pico cromatográfico, da água do Lago do Macurany nos pontos amostrais à montante e à jusante da lixeira pública de Parintins.

Composto	Montante	Jusante
Naftaleno	175.954,00	260.630,50
2- Metil naftaleno	7.831,00	33.031,00
1-Metilnaftaleno	3.807,66	9.777,50
Acenaftileno	-	3.806,00
Fluoreno	-	1.017,00
Fenantreno	4.649,00	213.354,00
Pireno	4.649,00	34.725,25
Benzo (a) antraceno	1.901,00	9.603,75
Criseno	2.003,00	1.329,00
Antraceno	592,50	87.222,00
Fluoranteno	2.017,50	31.194,50

(-) = compostos não detectados

Tabela 6 Concentrações dos metais cobre, cádmio e chumbo presentes na água do Lago do Macurany nos pontos amostrais à montante e à jusante da lixeira pública de Parintins.

Metais de transição	Montante (mg/l)	Jusante (mg/l)	CONAMA (mg/l)
Cádmio	0,06	0,08	0,01
Cobre	0,002	0,009	0,013
Chumbo	0,008	0,009	0,033

4.2.3 Parâmetros Hematológicos

Os valores de hematócrito diminuíram nos grupos incubados a jusante da lixeira, no período de 24 e 48h de exposição, em relação ao controle, conforme figura 12a. Por sua vez, a concentração de hemoglobina no tempo 24h foi mais elevada que o de 48h, tanto para o grupo à montante quanto à jusante; porém, não houve diferença significativa entre montante e jusante, figura 12b. O número de eritrócitos circulantes também aumentou no grupo incubado a jusante, em relação ao incubado a montante da lixeira no período de 48h; porém, não houve diferença significativa no período de 24h, figura 12c.

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), estão apresentados na figura 13a,b,c, respectivamente. Os valores de VCM no grupo incubado à jusante diminuíram em relação ao incubado à montante. Não foram observadas variações significativas para o HCM e CHCM.

A concentração de glicose sanguínea, figura 14, aumentou significativamente nos indivíduos incubados no lago Macurany à jusante em relação aos incubados a montante da lixeira.

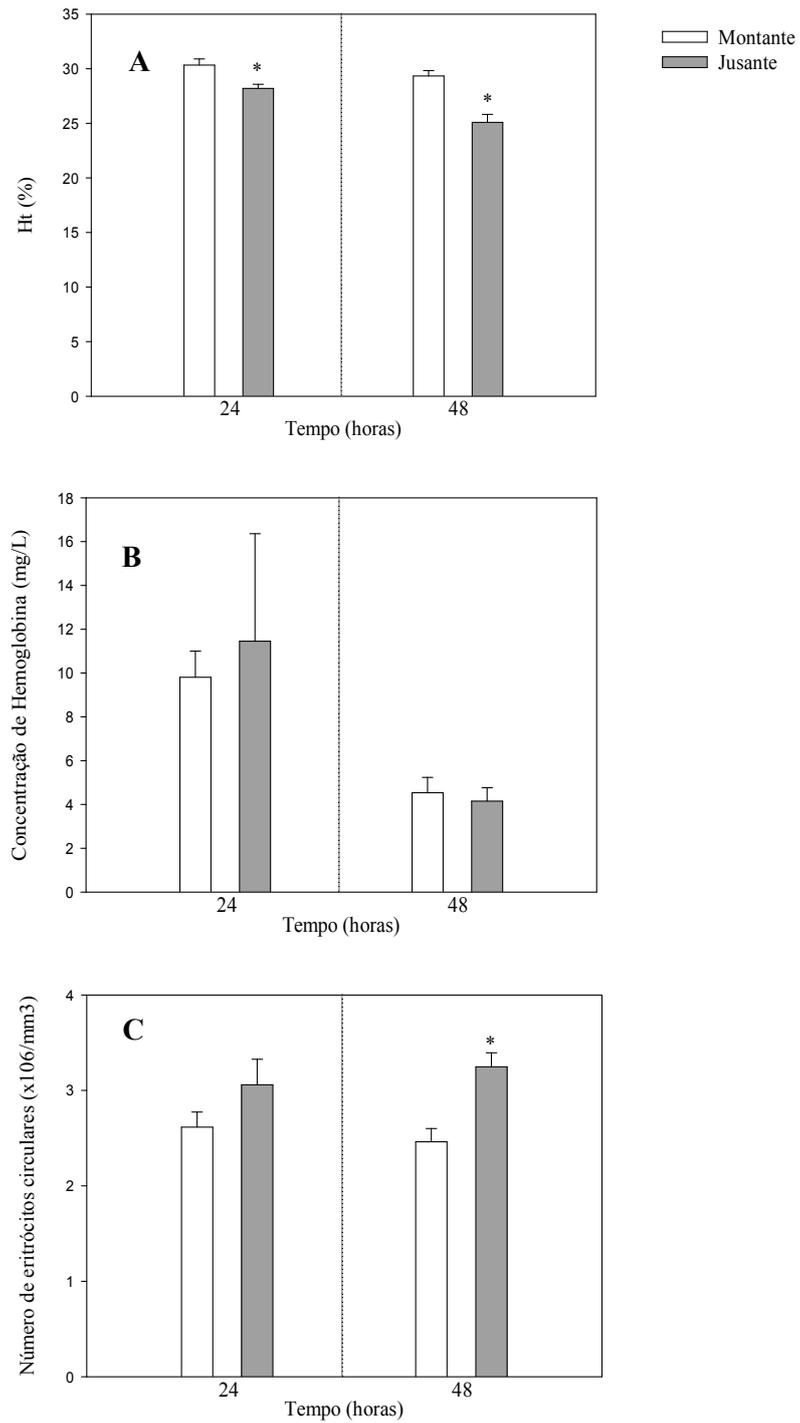


Figura 12 Hematócrito (Ht) (A), Concentração de hemoglobina ([Hb]) (B) e Número de eritrócitos circulantes (RBC) (C) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).

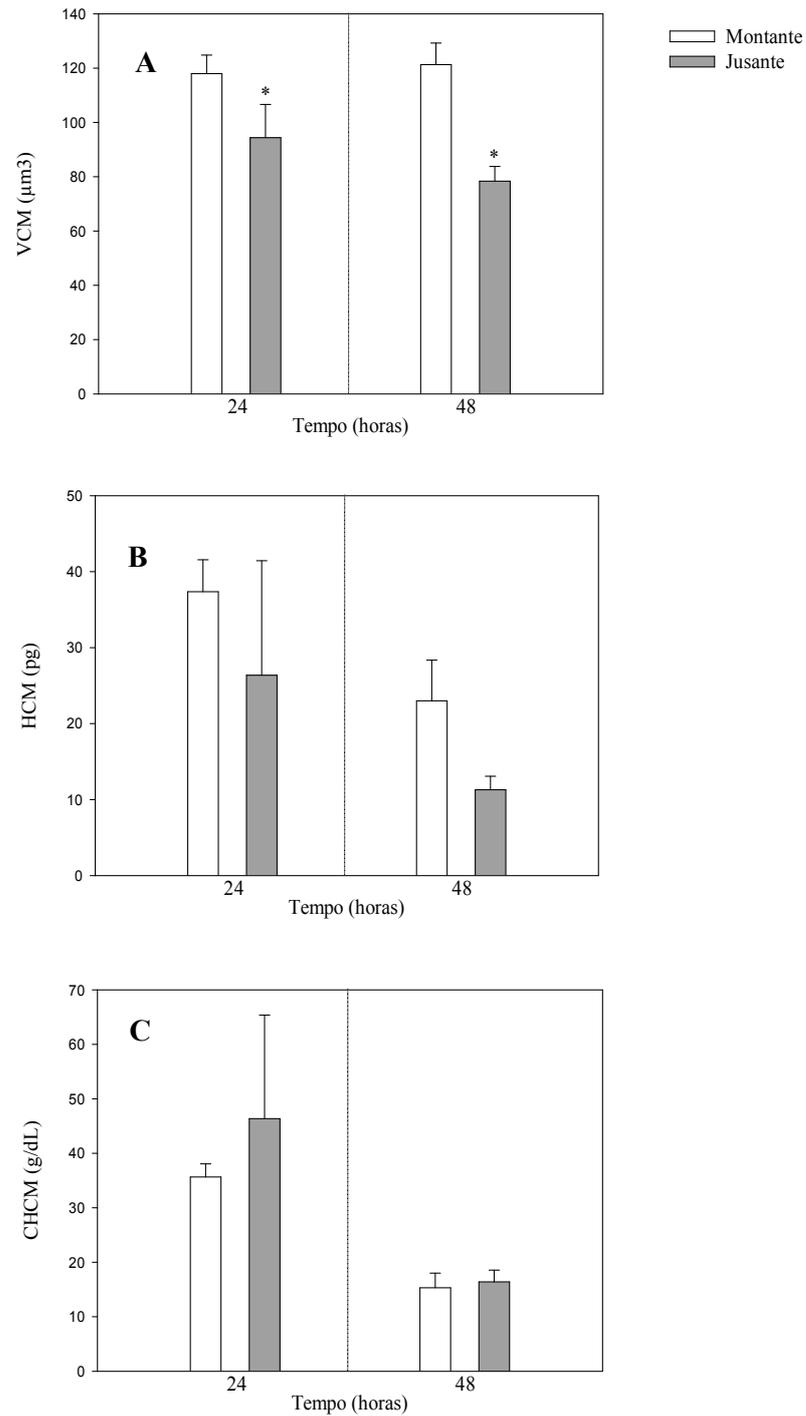


Figura 13 Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).

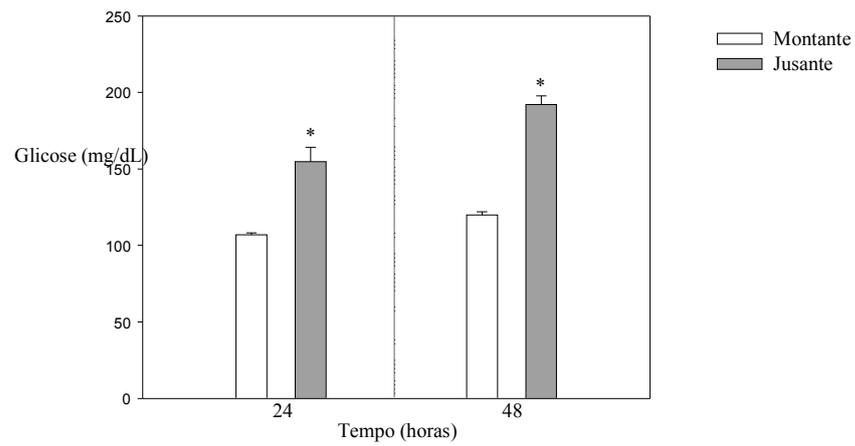


Figura 14 Níveis de glicose sanguínea de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).

4.2.4 Parâmetros iônicos

A concentração de Na^+ , K^+ e Cl^- no plasma dos espécimes de *C. macropomum* do grupo incubado à jusante da lixeira, no lago do Macurany, aumentou significativamente em relação ao grupo incubado à montante do referido lago, representados na figura 15a, b, c, respectivamente.

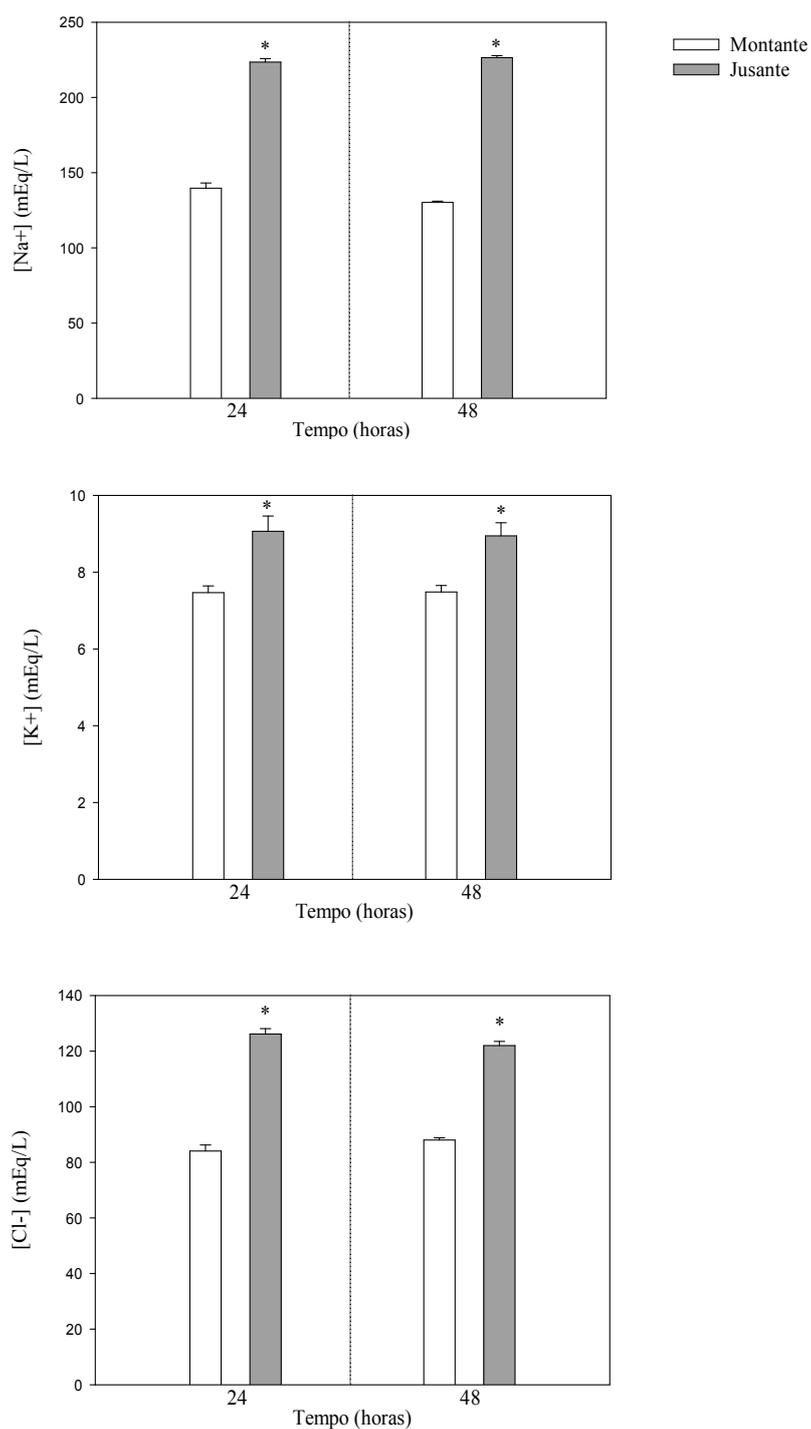


Figura 15 Níveis plasmáticos de sódio Na⁺ (A); Potássio K⁺ (B) e cloreto Cl⁻ (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira (p<0,05).

4.2.5 Parâmetros enzimáticos

Os níveis de ALT, AST, FA e Che no plasma de espécimes de *C. macropomum* do grupo incubado à jusante da lixeira aumentaram significativamente em relação ao incubado à montante da lixeira no lago do Macurany, mostrados na figura 16a,b,c e 17, respectivamente.

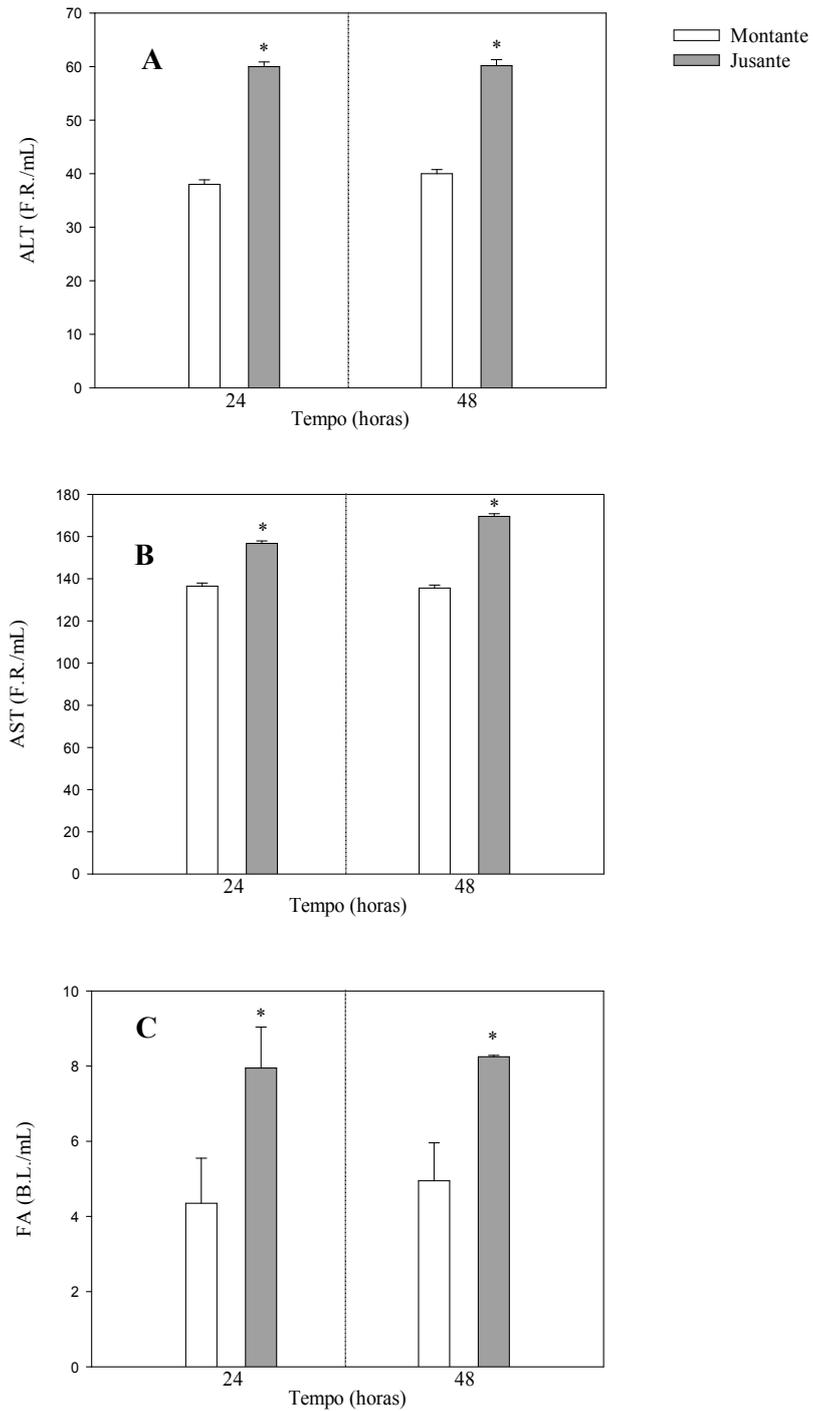


Figura 16 Concentração de Alanina Aminotransferase-ALT (A); Aspartato Aminotransferase-AST (B) e Fosfatase Alcalina-FA (C) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira ($p < 0,05$).

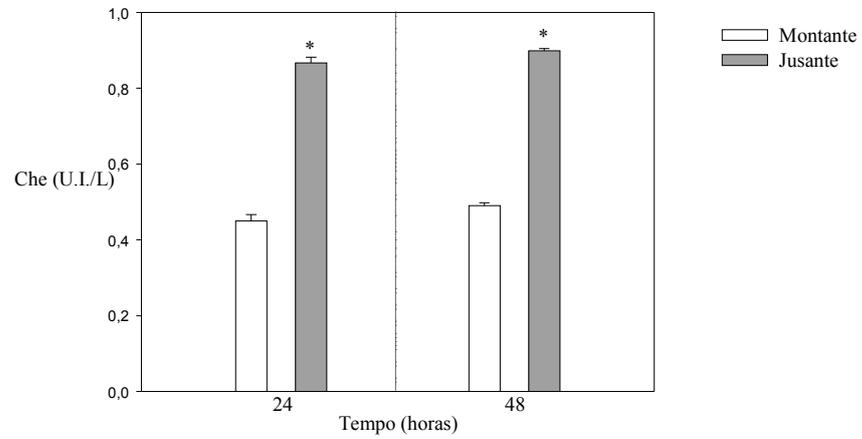


Figura 17 Concentração de Acetil Colinesterase-Che em exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos a montante e a jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto à montante da lixeira ($p < 0,05$).

4.2.6 Parâmetros genotóxicos

4.2.6.1 Ensaio do Cometa

Foram observadas todas as classes de danos nos exemplares de tambaqui expostos ao chorume, assim como o aumento ($p < 0,05$) no índice de danos de DNA do sangue periférico (teste do cometa) para todos os grupos incubados no Lago do Macurany, a jusante da lixeira, figura 19.

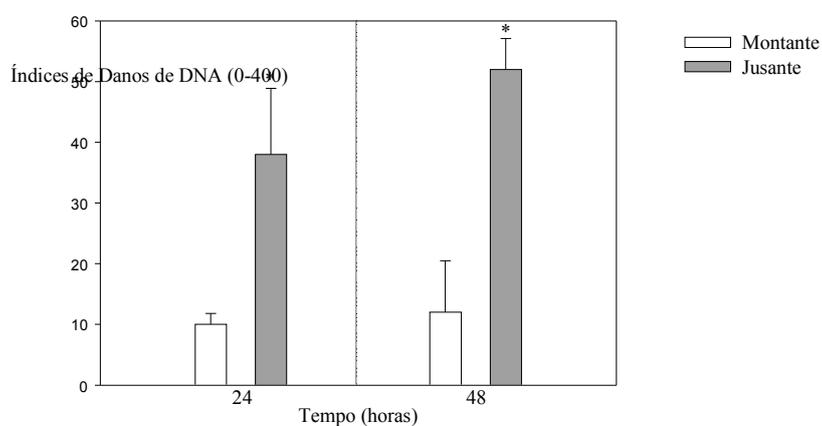


Figura 18 Índices de danos de DNA, obtidos a partir do teste de cometa, em células do sangue periférico de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).

4.2.6.2 Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE)

Houve aumento significativo nas frequências de ANE em espécimes de *C. macropomum* somente no grupo incubado à jusante da lixeira no período de 48h em relação ao incubado à montante pelo mesmo período (figura 18).

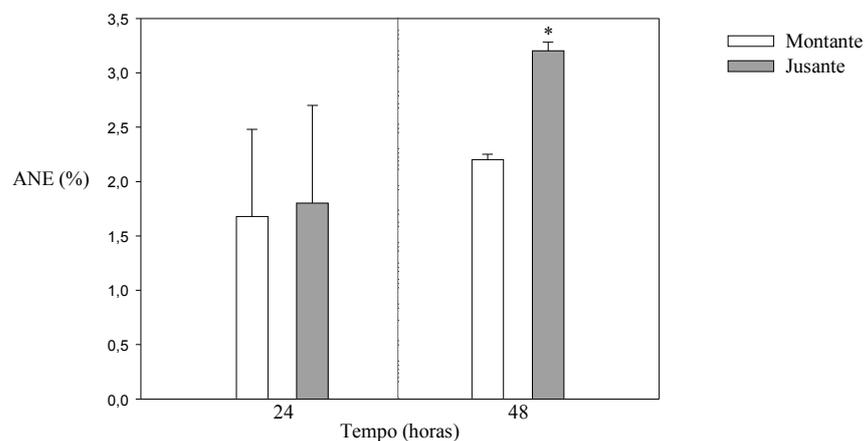


Figura 19 Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) em células do sangue periférico de exemplares de *C. macropomum* dos grupos expostos à montante e à jusante no Lago do Macurany, no período de 24 e 48 horas. * Indica diferença estatística significativa em relação ao ponto a montante da lixeira ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO CHORUME UTILIZADO NA EXPOSIÇÃO LABORATORIAL E DA EXPOSIÇÃO *IN SITU* NO LAGO DO MACURANY

O chorume é um efluente variável entre as áreas de despejo e ao longo do tempo e espaço em uma mesma área. Vários fatores influenciam sua composição, destacando-se: quantidade e tipos de resíduos; o clima local, a estação do ano e o estágio de decomposição dos resíduos (CHU et al., 1994). Por exemplo, o chorume do lixo disposto recentemente possui diferenciação daquele oriundo do lixo que já se encontra há mais tempo depositado. Esta observação pode ser notada de um modo geral, por exemplo, através do pH que a princípio tende a ser ácido, passando para a faixa alcalina em chorume de lixo depositado há mais tempo e da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) que, inicialmente altas, tendem a decrescer com o passar do tempo (PHILIPS et al., 1994).

O chorume aqui utilizado nos experimentos laboratoriais apresentou um pH neutro (7,26) com tendência a alcalino. Os níveis de oxigênio nos aquários experimentais demonstram variações de acordo com a concentração de chorume utilizada; ou seja, quanto maior a concentração de chorume, menor foi a concentração de oxigênio. Tais fatores sugerem ser o chorume coletado na Lixeira Pública de Parintins relativamente novo, com presença, provavelmente, de bactérias aeróbicas, características essas, representativas do primeiro mês de deposição e recobrimento dos resíduos. A ação de decomposição é realizada pelas bactérias aeróbicas que utilizam o oxigênio presente, sendo mais intensa no início e à medida que o oxigênio vai ficando escasso, a decomposição torna-se mais lenta. No entanto, a análise microbiológica do chorume não foi realizada nesse trabalho, o que seria recomendável em trabalhos futuros. Observou-se, também, um aumento na condutividade das águas experimentais. Um aumento da concentração de sais, como o provocado pela presença do chorume, pode causar, associado a outros fatores, desequilíbrio iônico.

Na exposição *in situ* no Lago do Macurany também levou-se em consideração as variações nos parâmetros físico-químicos dos locais avaliados, os quais, de acordo com CAMARGO e MARTINEZ, (2006; 2007); PANDEY et al., (2001); POMPEU et al., (2005); SOFIA et al., (2006), são essenciais na avaliação da qualidade da água. A determinação desses parâmetros juntamente com as alterações manifestadas pelos organismos diante da exposição à contaminação é fundamental para caracterização dos impactos da contaminação

sobre a biota de um local (MAGALHAES e FERRÃO FILHO, 2000; VAN DER OOST et al., 2003).

No presente trabalho, os dados obtidos através dos parâmetros físico-químicos indicam que a qualidade da água do Lago do Macurany vai sendo reduzida conforme a aproximação de regiões mais urbanizadas, como esperado. Mais especificamente, e, principalmente, a região a jusante da Lixeira Pública de Parintins foi à área que apresentou pior qualidade nas suas águas. As análises físico-químicas realizadas na água do Lago do Macurany mostraram níveis de oxigênio muito baixos, tal fato pode estar associado ao baixo nível de água do referido lago, haja visto que o experimento foi realizado no período de seca dos rios. Além disso, a contaminação é um importante fator que ocasiona a redução de oxigênio dissolvido.

O Lago do Macurany apresenta pontos que recebem efluentes de diversas fontes de atividade antrópica, desde tráfego de embarcações a descarga de esgoto. A contaminação encontrada nesse lago é caracterizada, deste modo, por uma mistura complexa de contaminantes. A alta condutividade detectada nesta área é um claro indicador de baixa qualidade da água (CAMARGO e MARTINEZ, 2006, 2007).

A condutividade do Lago do Macurany, ponto a jusante, é mais alta do que no ponto a montante, como esperado já que representa a área com maior influência humana, maior material particulado. Adicionalmente, é importante ressaltar que o regime dos corpos de água esta intimamente relacionado às influencias sazonais, que afetam, por exemplo, a deposição de matéria orgânica e elementos químicos nos sedimentos, fluxos de matéria orgânica, e níveis de oxigênio dissolvido. Além disso, no ambiente aquático, os poluentes sofrem diferentes transformações, como diluição, ou concentração, fotodegradação, resultando em interações de antagonismo e sinergismo (MAGALHAES e FERRAO FILHO, 2000; POMPEU et al., 2005)

5.1.1 Compostos orgânicos e inorgânicos detectados nas águas experimentais

Os resultados encontrados para o chorume da Lixeira Pública de Parintins e para a água do Lago do Macurany, à montante e à jusante, mostraram a presença de compostos orgânicos e inorgânicos na amostra utilizada para a exposição laboratorial e *in situ* dos juvenis de tambaqui. Deve-se ressaltar que a concentração de uma espécie química, em particular encontrada no chorume, vai depender principalmente da composição e do estágio de

decomposição do lixo, da solubilidade daquela espécie química e do pH da amostra (PHILIPS et al., 1994).

Quanto aos compostos orgânicos, foram identificados cinco, para a amostra laboratorial, e nove para a água do Lago do Macurany, dos dezesseis HPAs considerados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como os mais importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários. Na amostra utilizada para a exposição laboratorial dos juvenis de tambaqui foram identificados, naftaleno, fenantreno, pireno, benzo (a) antraceno, e criseno, que representam um risco ao ambiente, uma vez que são compostos com potencial carcinogênico. Adicionalmente alguns HPAs (naftaleno, fenantreno e benzo (a) antraceno) foram detectados na água do poço da UEA, porém, em menor proporção que os detectados no chorume. A presença desses compostos na água do poço da UEA pode ser advindo de outras fontes de contaminação ou mesmo do chorume, por percolação, uma vez que o poço da UEA está localizado especificamente a 100m da lixeira.

No Lago do Macurany, ponto a jusante, foram identificados o naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, pireno, benzo (a) antraceno, criseno, antraceno e fluoranteno. No ponto a montante também foram identificados à presença dos mesmos compostos, com exceção apenas do acenaftileno e fluoreno. Os HPAs detectados no chorume também foram identificados nas águas do referido lago em estudo. Tal fato sugere que o Lago do Macurany pode estar recebendo influência do chorume advindo da lixeira, mas que existem outras fontes de contaminação para o referido lago, como por exemplo, o próprio tráfego de embarcações que usam como combustível derivados de petróleo, que contém HPAs. Outro fator relevante, que corrobora a presença de tais compostos, dá-se pela habitação de comunidades no entorno do lago. Além dos HPAs sugeridos pela EPA, foram detectados 2-metilnaftaleno e 1-metilnaftaleno. Vale ressaltar que os níveis de HPAs apresentam-se maiores no ponto à jusante da lixeira em relação ao ponto à montante.

De um modo geral, analisando o perfil de cada HPA observa-se que a área à jusante da lixeira no Lago do Macurany é mais impactada e que região à montante recebe menos influencia antrópica, pois de acordo com (CAMARGO e MARTINEZ, 2006; 2007), os ambientes aquáticos próximos a centros urbanos recebem descargas de efluentes resultantes de diversas atividades humanas, as quais são caracterizadas por uma mistura complexa de contaminantes.

As propriedades físico-químicas dos HPAs estão relacionadas com a massa molecular, sendo divididos em HPAs de baixo peso molecular (2 a 3 anéis benzênicos) e alto peso molecular (4 a 7 anéis benzênicos). Os HPAs de baixo peso molecular apresentam toxicidade

aguda significativa para os organismos aquáticos enquanto os de alto peso molecular podem ser carcinogênicos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (NEWMAN e UNGER, 2003).

Os HPAs detectados tanto no chorume quanto no Lago do Macurany são em sua maioria de baixo peso molecular, porém há também a presença de HPAs de alto peso molecular, fato preocupante, pois os mesmos apresentam propriedades carcinogênicas e mutagênicas. Além disso, os HPAs são sólidos à temperatura ambiente, têm alto ponto de fusão e ebulição e baixa solubilidade em água, mas com o aumento da massa molecular a solubilidade diminui, os pontos de fusão e ebulição aumentam e a pressão de vapor diminui. Consequentemente, estes compostos variam bastante de comportamento, tanto em relação à sua distribuição no ambiente aquático quanto em relação aos seus efeitos nos sistemas biológicos (LIMA, 2001). Por exemplo, os peixes são capazes de metabolizar hidrocarbonetos e só o acumulam em áreas muito poluídas. Já os organismos invertebrados têm metabolismo mais lento acumulando maiores quantidades de HPAs (MEADOR et al., 1995). A maioria dos HPAs que entra nos sistemas aquáticos permanece relativamente próxima às suas fontes, decrescendo aproximadamente de forma logarítmica, com a distância da origem. Assim, a grande maioria dos HPAs encontrados está localizada em rios, estuários e águas costeiras (LIMA, 2001).

Quanto aos compostos inorgânicos foram detectados cádmio, cobre e chumbo, nas amostras de chorume, em concentrações relativamente baixas para um efluente, porém, os três metais detectados estão acima dos limites máximos de lançamentos de efluentes dispostos na resolução do CONAMA 357/05. De acordo com Renou et al. (2008) o chorume relativamente novo possui concentrações baixas ou médias de metais de transição. Baixas concentrações de metais de transição são descritos na literatura como característica de chorume disposto recentemente (RENOU et al., 2008; KJELDSEN e CHRISTOPHERSEN, 2001). De acordo Christensen et al. (2001), os hidrocarbonetos aromáticos são mais frequentes que metais de transição em amostras de chorume (CHRISTENSEN et al., 2001).

As atividades antropogênicas resultam na liberação de uma série de contaminantes no ambiente, os quais acabam chegando aos corpos d'água e acabam por interferir na qualidade destes ecossistemas e o crescimento acelerado de Parintins vem comprometendo seriamente a qualidade ambiental do Lago do Macurany. Esta área sofre constantes agressões provocadas pela atividade humana, há sinais de degradação como assoreamento, contaminação de suas águas por agentes químicos e por organismos patogênicos, entre outros (CPRM, 2005). Além do agravante do chorume da Lixeira Pública de Parintins, recentemente houve um

derramamento de óleo combustível no referido lago, procedente da Usina Termoelétrica Parintins, que estaria causando dores de cabeça e vômitos na população local pela inalação dos odores tóxicos além da mortandade de peixes e pássaros (IBAMA, 2011). Na análise de metais de transição no Lago do Macurany também detectou-se a presença do cádmio, cobre e chumbo tanto no ponto à jusante quanto no ponto à montante, porém, apesar de todos os indícios de contaminação, dos três metais analisados somente o cádmio está acima dos valores permissíveis pela resolução do CONAMA 357-05.

5.1.2 Exposição à concentração subletal de chorume em laboratório e exposição *in situ* no Lago do Macurany

Apesar de conter inúmeras substâncias tóxicas em sua composição, o chorume comumente é despejado em ecossistemas aquáticos. No meio aquático, essas substâncias químicas dissolvidas ou em suspensão na água podem atingir os organismos vivos, peixes, por exemplo, através da pele e brânquias, acarretando manifestações imediatas no comportamento dos indivíduos, seguido de ajustes bioquímicos e fisiológicos na tentativa de neutralizar os distúrbios decorrentes (HOCHACHKA e SOMERO, 1984; HEATH, 1995).

Foi observada a produção de muco nas brânquias dos exemplares de *C. macropomum* expostos a concentrações subletais de chorume. Tal fato foi observado, também, nos exemplares expostos *in situ* à jusante da lixeira e se justifica pelo estresse causado pelos compostos encontrados no chorume como os metais de transição e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estudos realizados com exemplares de *C. macropomum* expostos a metais de transição confirmam tais manifestações (MENEZES, 2005; OLIVEIRA, 2003). A hiperprodução de muco nas brânquias foi também observada em outras espécies de peixes como, por exemplo, em indivíduos de *Carassius auratus* expostos ao chumbo, em carpas *Cyprinus carpio* expostos ao cobre (TAO et al., 2000ab) e em exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos a poluentes com grande quantidade de metais pesados (LICHTENFELS et al., 1996).

A exposição aguda a metais ocasiona a hipersecreção de muco nas brânquias, que serve como um importante meio de proteção contra a absorção dos metais (MCDONALD e WOOD, 1993) por meio da quelação e inibição de difusão (HEATH, 1995). Entretanto, tal fator que serve para reduzir o efeito tóxico do contaminante, acaba sendo prejudicial para o peixe, pois pode dificultar as trocas gasosas, levando o indivíduo a hipóxia (LICHTENFELS

et al., 1996) e, também, por resultar em distúrbios na osmoregulação e na regulação iônica (HEALTH, 1995).

Os HPAs e seus derivados possuem caráter lipofílico, podendo ser absorvidos pelas brânquias, por ingestão e absorção, sendo rapidamente absorvidos pelo organismo (MEIRE et al., 2007). A hipersecreção de muco nas brânquias dos exemplares de *C. macropomum* foi ocasionada, provavelmente, devido o efeito sinérgico dos compostos oriundos do chorume.

O chorume apresentou-se altamente tóxico para dois dos exemplares expostos a diluição de 1:100 causando a morte dos mesmos nas primeiras 24h de exposição; tal fato deve-se, provavelmente, a baixa concentração de oxigênio e a grande quantidade de matéria orgânica na água experimental associadas à baixa resistência desses exemplares. Foi observado também mortalidade para a exposição *in situ* no Lago do Macurany, à jusante da lixeira, devido, principalmente, à baixa oxigenação da água, além dos contaminantes presentes no Lago do Macurany.

A caracterização de contaminantes industriais tem sido realizada, sobretudo, por meio de análises físico-químicas, sendo que as concentrações máximas são estabelecidas na legislação vigente, por padrões numéricos de emissão. No entanto, a diversidade e a complexidade das substâncias num mesmo efluente líquido, por exemplo o chorume, tornam inviável a sua completa caracterização, não só do ponto de vista analítico, como econômico. Enquanto a análise química identifica e quantifica isoladamente as substâncias em um efluente industrial, a avaliação de bioindicadores e biomarcadores avaliam a reação de organismos vivos a uma situação global (VAN DER OOST et al., 2003).

Vários estudos têm avaliado o potencial tóxico sobre os ambientes aquáticos sob a influência de contaminação por atividades industriais, urbanas e rurais usando uma variedade de métodos analíticos, bioensaios e biomarcadores, tanto *in vitro* como *in vivo* (AYLLON e GARCIA-VASQUEZ, 2000; ERDTMANN, 2000; LEMOS et al., 2008; LEMOS et al., 2007; PACHECO e SANTOS, 2002). Avaliar o impacto dessa contaminação sobre a biota local é de extrema importância para caracterizar melhor os seus efeitos reais, resultantes da interação entre esses poluentes. A análise se torna mais complexa, mas proporciona inúmeras vantagens em relação a simples quantificação de variáveis abióticas da água (VAN DER OOST et al., 2003; WENDELAAR BONGA, 1997). Deste modo, estudar o comportamento e a biologia de uma determinada espécie de peixe frente às variações ambientais naturais ou decorrentes da ação antrópica é fundamental para a conservação tanto do ambiente quanto das espécies.

Estas observações, aliadas a avaliação da qualidade da água e do uso de gaiolas para a submissão de organismos às reais condições do ambiente, são essenciais para determinação

dos efeitos da contaminação gerada por efluentes urbanos e industriais (CAMARGO e MARTINEZ, 2006; 2007; MAGALHAES e FERRAO-FILHO, 2000; PACHECO e SANTOS, 2001ab; VAN DER OOST et al., 2003; WINKALER et al., 2001).

O Lago do Macurany é um dos principais lagos que circundam a Ilha de Parintins, sendo de vital importância a sua preservação, uma vez que banha a sede municipal e está mais suscetível a depredação e poluição, por diversos fatores inclusive pela descarga de chorume (AZEVEDO FILHO e LIMA, 2009). Nesse contexto, utilizou-se a espécie *C. macropomum* como espécie indicadora de contaminação da Lixeira Pública de Parintins-Am, em exposição em laboratório à concentrações subletais de chorume e em exposição *in situ* no Lago do Macurany. Diversas alterações fisiológicas foram observadas nesta espécie como resposta ao efeito da exposição ao chorume e a contaminação do Lago do Macurany, como apresentado anteriormente.

5.1.3 Parâmetros Respiratórios

A exposição de peixes a condições estressantes resulta numa série de ajustes por meio de mecanismos homeostáticos (VAL, 1995) e este estresse pode ocasionar alterações nos valores de parâmetros hematológicos. Os componentes hematológicos são biomarcadores promissores em peixes, porque além de não ser necessário o uso de técnicas destrutivas, fornecem uma indicação da fisiologia geral e do estado de saúde dos organismos (BEYER et al., 1996), uma vez que o sangue reflete os processos vitais dos animais em função das variações internas ou ambientais (NUSSEY et al., 1995; PEREZ e GONZALES, 1978).

As análises dos parâmetros hematológicos representam um dos primeiros passos para se reconhecer e medir respostas subletais, podendo, assim, contribuir para o entendimento do impacto da presença de compostos químicos sobre as espécies e, conseqüentemente, estabelecer relações de causa-efeito, o que possibilita dirigir ações adequadas (LUEBKE et al., 1997) antes que os danos atinjam os níveis de maior relevância ecológica. Esses métodos têm sido usados para avaliar a saúde dos peixes nos laboratórios de pesquisa (HEATH, 1995).

Dadas essas informações, foram observadas diversas alterações nos parâmetros sanguíneos dos exemplares de *C. macropomum* expostos ao chorume em relação ao controle, sendo que tais alterações também foram observadas nos exemplares expostos *in situ*. Ainda de acordo com Heath (1995), o espessamento do epitélio branquial dificulta as trocas gasosas predispondo o indivíduo a hipóxia, conseqüentemente, os parâmetros sanguíneos são

alterados de forma a desenvolver um melhor transporte de oxigênio pelo sangue e sua liberação nos tecidos.

A exposição em laboratório ao churume, principalmente, ao tratamento T2, provocou alterações hematológicas, com diminuições do hematócrito, da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos. Enquanto o VCM aumentou, houve diminuição na HCM e na CHCM caracterizando, assim, um quadro de anemia nos exemplares de *C. macropomum* intoxicados pelos compostos do churume, sendo que anemia ocorreu, possivelmente, devido a um distúrbio fisiológico no controle desses parâmetros nos animais sob exposição ao churume. Estudos realizados com esta mesma espécie de peixe exposta chumbo e a uma mistura de cobre e chumbo mostraram resultados similares (OLIVEIRA, 2003). A exposição *in situ*, tanto a exposição de 24h quanto de 48h provocaram alterações hematológicas, com diminuição do hematócrito, aumento na concentração de hemoglobina, aumento no número de eritrócitos e diminuição no VCM, na HCM e aumento na CHCM.

Quanto a diminuição no número de hematócrito na exposição *in situ*, Rogers et al. (2003) também encontraram alterações semelhantes nos valores de hematócrito em experimentos realizados com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao chumbo. Casos de redução nos níveis desse parâmetro também foram relacionados com a exposição a outros metais, como em exemplares de *Carassius auratus gibelio* intoxicados por cádmio (ZIKIC et al., 2001), e a compostos orgânicos, como fenol e atrazina, em exemplares de *Dicentrarchus labrax* (ROCHE e BOGE, 1996). É possível que a diminuição do hematócrito e de outros parâmetros hematológicos seja devido ao rompimento de células sanguíneas, associado ao aumento do potássio plasmático. O aumento dos níveis de K^+ plasmático também ocorreu nos espécimes de *C. macropomum* deste estudo. Sabe-se que o potássio é um íon encontrado em altas concentrações no interior das células e, portanto, quando sua concentração plasmática encontra-se elevada, infere-se que tenha ocorrido hemólise (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

Na exposição *in situ* ocorreu, também, um aumento no número de eritrócitos circulares associado, possivelmente, na tentativa de melhorar a transferência de oxigênio aos tecidos em condições de estresse. A redução no tamanho médio dos eritrócitos, que pôde ser observado com a redução significativa do volume corpuscular médio (VCM) no grupo exposto a jusante da lixeira, facilita, assim, o fluxo celular na corrente sanguínea. Por outro lado, o peso da hemoglobina nos eritrócitos, medido pelo índice de hemoglobina corpuscular média (HCM), não foi alterado significativamente, fazendo com que a concentração média de hemoglobinas

contidas nos eritrócitos (CHCM) diminuíse proporcionalmente nas primeiras 24h de exposição, como foi observado entre os indivíduos do grupo à montante da lixeira.

A exposição ao chorume também ocasionou um aumento significativo nos níveis de glicose, porém não houve diferença entre as diluições, ou seja, tanto pequenas como grandes concentrações de chorume são capazes de ocasionar a hiperglicemia. De acordo com Santos e Pacheco (1996), alterações na concentração de glicose podem ocorrer simplesmente por estresse devido às mudanças nas características ambientais. A hiperglicemia é uma resposta muito comum a agentes estressores em peixes de água doce e, por isso, tem sido considerada um indicador secundário de poluição ambiental (ALKINDI et al., 1996).

Os indivíduos do grupo à jusante da lixeira apresentaram também um aumento significativo da glicose sanguínea, resultados semelhantes ao protocolo I, revelando a importância deste metabólito no suprimento energético em condições de baixos níveis de oxigênio e de exposição a compostos orgânicos e inorgânicos. O aumento da glicose sanguínea sugere a ativação do metabolismo anaeróbico, já que a glicose é o principal combustível da glicólise, uma das principais vias energéticas utilizadas na ausência de oxigênio. Almeida-Val et al. (1995), sugerem que a maioria das espécies de peixes da Amazônia apresenta alteração nos níveis de glicose plasmática quando submetida a algum nível de depleção de oxigênio. Adicionalmente, diversos trabalhos com *C. macropomum* expostos a metais de transição apresentaram alterações neste parâmetro (MENEZES, 2005; OLIVEIRA, 2003).

5.1.4 Parâmetros Iônicos

A osmoregulação é um mecanismo essencial para a sobrevivência de peixes de água doce, uma vez que o ambiente em que vivem proporciona um alto gradiente iônico favorecendo as perdas iônicas (RANDALL et al., 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002). A osmoregulação pode, ainda, ser considerada o processo pelo qual a pressão osmótica dos fluidos corpóreos e o volume de água em um organismo são mantidos relativamente constantes.

Danos nas funções fisiológicas iniciam-se a partir do contato do animal com a contaminação, principalmente através das brânquias (CAMARGO e MARTINEZ, 2007; EVANS et al., 2005; FONTAINHAS-FERNANDES et al., 2008; PARVEZ et al., 2006; VAN DER OOST et al., 2003; WENDELAAR BONGA, 1997; WINKALER et al., 2001). Como as

brânquias correspondem à interface entre o animal e o meio, as mesmas estão envolvidas em diversas funções essenciais, como por exemplo, osmoregulação, respiração, dentre outras, fazendo com que a exposição a contaminantes leve a desequilíbrios nestas funções.

A ocorrência de distúrbios osmorregulatórios é causada pela exposição a um ou mais fatores de estresse, sejam eles agudos ou crônicos, naturais ou xenobióticos, e podem ser elucidadas por estimativas dos eletrólitos do plasma sanguíneo e ou por meio da osmolaridade total (HEATH, 1995). No presente estudo foram evidenciadas alterações nas concentrações dos íons plasmáticos Na^+ , K^+ e Cl^- em espécimes de *C. macropomum* expostos à concentração subletal de chumbo por 96h e nos grupos expostos à jusante da lixeira, no Lago do Macurany.

Os níveis de Na^+ e Cl^- aumentaram significativamente no tratamento T2, T3 e T4 em relação ao controle, tratamento T1, porém não houve diferença entre os tratamentos T3 e T4 demonstrando que o chumbo, mesmo em menor concentração, é capaz de induzir alterações nas trocas iônicas. Foi verificado, também, aumento na concentração de K^+ plasmático em relação ao controle, mas não houve diferença estatística entre os tratamentos (T2, T3 e T4). Os espécimes de *C. macropomum*, quando expostos à jusante da lixeira, apresentaram aumento nas concentrações iônicas plasmáticas (Na^+ , K^+ e Cl^-), em relação aos espécimes expostos à montante, tanto com 24 quanto com 48h, presumivelmente, por aumento na capacidade de absorção ativa de sais pelas brânquias, tendo em vista que a condutividade da água, à jusante da lixeira, apresentou-se elevada.

O aumento na concentração de K^+ pode ser resultado do efluxo de potássio vindo dos compartimentos intracelulares (WILSON e TAYLOR, 1993ab). Segundo Health (1995), a Na^+/K^+ -ATPase das membranas celulares é responsável pela concentração diferencial de potássio entre os fluidos corporais e o citosol. De acordo com este mesmo autor, determinados metais de transição podem inibir esta enzima em diversos tecidos do corpo, o que pode causar o aumento da concentração de potássio plasmático quando o peixe está exposto ao agente tóxico. A inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, por exemplo, foi apontada como uma das principais causas dos prejuízos hidroeletrólíticos em exemplares de *Oncorhynchus mykiss* expostos a chumbo (ROGERS et al., 2003); de *Channa punctata* expostos a efluentes de fábricas de papel (PARVEZ et al., 2006) e de *Prochilodus scrofa* expostos ao cobre (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002). Estudos com exemplares de *C. macropomum* expostos ao cobre e chumbo (OLIVEIRA, 2003) e ao cobre (MENEZES, 2005) corroboram esses resultados.

Neste estudo, os aumentos nas concentrações de Cl^- podem ocorrer devido à diminuição dos parâmetros hematológicos e, conseqüentemente, à diminuição da concentração de O_2 no sangue, como forma de excretar rapidamente o CO_2 . De acordo com Gilmour (1998), o CO_2 é convertido a HCO_3^- e, conseqüentemente, ocorre a liberação do Cl^- para entrada do HCO_3^- no eritrócito.

Adicionalmente, situações de estresse geram aumento na taxa metabólica dos peixes, especialmente em estações mais quentes (CAMARGO e MARTINEZ, 2006; 2007; CRAFFORD e AVENANT-OLDEWAGE, 2010; WILHELM FILHO et al., 2001). Com taxas metabólicas elevadas, aumenta também a sensibilidade do organismo, facilitando a incorporação de contaminantes, por exemplo, por aumento na permeabilidade branquial (CAMARGO e MARTINEZ, 2006; CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MARTINEZ et al., 2004; MAGALHAES e FERRAO FILHO, 2000). Além de afetar a permeabilidade branquial, xenobióticos podem especificamente competir e inibir mecanismos de transporte de sal.

5.1.5 Parâmetros Enzimáticos

O fígado é um dos órgãos mais prejudicados pela exposição à xenobióticos. Isso ocorre porque nele são realizadas várias reações bioquímicas, incluindo o metabolismo dos metais e HPAs, compostos presentes no chorume. Durante os processos de biotransformação dos xenobióticos é formada uma grande quantidade de radicais epóxi e superóxidos que interagem com as estruturas celulares podendo causar danos celulares (HEATH, 1995). O metabolismo dos metais e HPAs no fígado pode ocasionar sérias lesões hepáticas e histopatológicas como, por exemplo, aumento no volume celular, inflamações locais, necrose e degeneração dos hepatócitos, promovendo, assim, disfunções hepáticas (HEATH, 1995; MAZON, 1997; PACHECO e SANTOS, 2002). A ocorrência de áreas de necroses é umas das lesões hepáticas mais evidentes e este tipo de lesão tem sido registrada em peixes de áreas impactadas por múltiplos contaminantes (MARTY et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; PACHECO e SANTOS, 2002; SCHMALZ et al., 2002; STEHR et al., 2003; STENTIFORD et al., 2003; SIMPSON et al., 2000).

Lesões hepáticas podem ser avaliadas indiretamente pela presença de algumas enzimas indicadoras de danos hepáticos que são liberadas no plasma pelo fígado danificado, como as transaminases e a fosfatase alcalina (CHAMPE e HARVEY, 1996; HEATH, 1995, HINTON et al., 2008). Além de danos hepáticos, os xenobiontes podem promover distúrbios em nível neuromuscular (HEATH, 1995). A avaliação da atividade da colinesterase (DELLALI et al.,

2001; QUINTANEIRO et al., 2006; TORTELLI et al., 2006) representa um parâmetro bastante utilizado em programas de monitoramento ambiental. A acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções musculares. No presente estudo foram avaliadas as enzimas ALT, AST, FA e Che. Os espécimes de *C. macropomum* demonstraram-se bastante sensíveis aos compostos tóxicos do chorume, apresentando um aumento nas concentrações enzimáticas proporcional às diferentes concentrações de chorume utilizadas neste estudo. Os parâmetros enzimáticos analisados aumentaram em torno de 50% no tratamento T2, com exceção da AST, o qual representa a maior concentração de chorume utilizada, em relação ao controle. Similarmente, os espécimes de *C. macropomum*, do grupo à jusante do Lago do Macurany, demonstraram-se bastante sensíveis aos compostos tóxicos presentes nas águas do referido lago. Apesar do curto tempo de exposição, as alterações foram evidenciadas nas primeiras 24h, apresentando um considerável aumento nas concentrações enzimáticas.

A concentração elevada dessas enzimas deve-se, possivelmente, à presença de metais e HPAs nas amostras de chorume, caracterizando assim o efeito sinérgico destes compostos tóxicos para *C. macropomum*. Os resultados do presente trabalho sugerem que o fígado desses peixes está passando por um processo de dano e morte celular (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2003) interferindo, assim, nos processos de detoxificação e mobilização energética realizados por este órgão. Aumentos nas concentrações das enzimas ALT, AST e FA já foram observados para a espécie aqui estudada exposta ao cobre, ao chumbo e a mistura desses metais (OLIVEIRA, 2003) e ao petróleo de Urucu fotomodificado (OLIVEIRA, 2010). Aumentos na atividade de ALT e AST em peixes expostos ao HPA benzo[a]pireno também já foram descritos para *Lepomis macrochirus* (OIKARI e JIMENEZ, 1992) e para *Plattichthys flesus* (BEYER et al., 1996).

Quanto a Che, os estudos já realizados mostraram que há a necessidade de altas concentrações de HPAs para que ocorram variações significativas. Este fato está relacionado com a falta de especificidade dos hidrocarbonetos por essa enzima. Resultados semelhantes foram encontrados em peixes expostos agudamente ao cádmio, onde apenas a exposição a altas concentrações causou inibição na atividade da Che, enquanto a exposição a concentrações subletais não causou mudança de sua atividade (BEAUVAIS et al., 2001).

Porém, os resultados do presente estudo mostram que mesmo em concentrações subletais e agudas, o chorume foi capaz de ocasionar alterações nos níveis de Che em exemplares de *C. macropomum*, assim como a contaminação do Lago do Macurany foi capaz de ocasionar alterações de 50% quando comparadas aos grupos expostos à montante da

lixreira. Esses resultados corroboram os já observados para a mesma espécie aqui estudada exposta a concentração subletal de cobre (OLIVEIRA, 2003).

As alterações nas atividades enzimáticas correspondem aos sistemas de defesa dos organismos contra a ação tóxica dos poluentes, sendo tipicamente considerados como as respostas iniciais à exposição aos contaminantes ambientais. Portanto, a medida da resposta dos marcadores bioquímicos pode ser utilizada como uma ferramenta extremamente sensível de funções celulares alteradas (SCHLENK et al., 2008ab). Fica claro, assim, que os peixes respondem à contaminação ambiental alterando e, ou ajustando suas funções metabólicas (PACHECO e SANTOS, 2002).

5.1.6 Parâmetros Genotóxicos

Substâncias genotóxicas normalmente causam distúrbios celulares que podem levar a modificações na estrutura do DNA, podendo assim causar uma cascata de eventos desestruturantes. A detecção e a quantificação desses eventos podem ser usadas como biomarcadores de exposição e efeito em organismos ambientalmente expostos a substâncias genotóxicas. O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são alguns exemplos de parâmetros genotóxicos utilizados na toxicologia ambiental (SHUGART, 2000).

No ensaio cometa é possível distinguir e quantificar células com diferentes taxas de dano no DNA e, desta forma, a análise do valor médio para cada grupo é importante para entender a magnitude do dano causado pelo xenobionte (VANZELLA et al., 2007). Por meio deste ensaio pode-se detectar danos no DNA de forma mais rápida sem a necessidade de que as células danificadas passem por divisão celular, podendo ser utilizada em estudos que utilizem exposição aguda de organismos aquáticos a xenobióticos como o do presente trabalho.

As alterações na estrutura do DNA, incluindo rupturas e modificações na ordem da sequência de bases no DNA, têm sido associadas com a exposição a um grande número de contaminantes, incluindo os metais e os HPAs (PADRANGI et al., 1995; STEINERT, 1996; STEINERT et al., 1998). As alterações nas cadeias de DNA podem causar mutações críticas e levar a uma cascata de eventos subsequentes como, entre outros a morte celular, as disfunções na replicação e reparação das fitas ou mesmo a um processo descontrolado de divisões celulares o que pode gerar neoplasias nos tecidos (VERNIER, 1996).

De acordo com Oliveira (2010), estudos realizados com tambaqui expostos ao naftaleno, benzo[a]pireno, petróleo e petróleo fotomodificado demonstraram que esses

compostos são capazes de induzir danos de DNA do sangue periférico (teste cometa). Ainda de acordo com Oliveira (2010), os aumentos observados no índice de danos de DNA corresponderam ao aumento na concentração e no tempo de exposição aos compostos. Resultados semelhantes ao de Oliveira (2010) foram encontrados para os exemplares de *C. macropomum* expostos ao chorume. Neste caso observou-se que quanto maior a concentração de chorume, maior foram os índices de dano celular. Na exposição *in situ* a genotoxicidade também foi comprovada pelos aumentos nos índices de danos de DNA em sangue de juvenis de tambaqui, do grupo exposto à jusante da lixeira, resultados esses que corroboram a contaminação do Lago do Macurany.

Fairbairn et al. (1995) afirmam que as quebras do DNA evidenciadas pelo Ensaio Cometa podem estar relacionadas ao sistema de reparo da própria célula ou da exposição a contaminantes ambientais, porém, a diferença significativa encontrada entre os exemplares de *C. macropomum* provenientes do grupo exposto à jusante da lixeira, corrobora a relação entre a exposição aos resíduos químicos do Lago do Macurany. A avaliação dos danos do DNA por meio do Ensaio Cometa é considerada um método eficaz para o monitoramento dos efeitos de HPAs e metais de transição como comprovado nesse estudo, assim como tem sido eficaz na detecção de danos gerados por HPAs e outros compostos xenobióticos (AAS et al., 2000; AHMAD et al., 2008; MARIA et al., 2002; 2005; OLIVEIRA, 2010; PADRANGI et al., 1995; STEINERT et al., 1998; VANZELLA et al., 2007).

Segundo Sánchez-Gallán et al. (1998), os peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas. Eritrócitos de sangue periférico são comumente usados para a aplicação do Ensaio do Cometa em conjunto com o Teste do MN (AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ, 2001; BELPAEME, et al., 1996; BUSCHINI, et al.; 2004; PACHECO e SANTOS, 1997, 1998; RISSO-de FAVERNEY et al., 2001; RUSSO et al., 2004; SANCHEZ-GALLAN et al., 1999, 2001;). Ainda, de acordo Sanchez-Gallan et al. (1999; 2001), a exposição de peixes a determinados metais induz à formação de micronúcleos e outras anormalidades nos núcleos dos eritrócitos (ANE). Segundo Heddle et al. (1991), os micronúcleos surgem de fragmentos de cromossomos que não são incorporados no núcleo da célula depois da mitose. Entretanto, os mecanismos de formação de ANE não são completamente conhecidos (AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

As Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) têm sido utilizadas, em diversos estudos, para avaliar a genotoxicidade e/ou mutagênicidade de contaminantes a peixes (BARSIENE et al., 2006; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; LEMOS, 2007, 2008; MENEZES, 2005;

OLIVEIRA, 2003, 2010; TELES et al., 2003; VANZELLA et al., 2007). Vanzella et al. (2007) observaram danos genotóxicos e mutagênicos em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (96h) e subcrônica (15 dias) à fração de óleo diesel solúvel em água (DWSF). Domingos (2006) também obteve resultados semelhantes ao observar aumento significativo na porcentagem de anormalidades no núcleo dos eritrócitos do peixe amazônico *Astronotus ocellatus* exposto à concentração subletal de petróleo durante 24, 48, 96 e 192h. Estudos realizados com exemplares de *C. macropomum* demonstraram a metais de transição como o cobre (Oliveira, 2003), de HPAS e de petróleo (Oliveira, 2010), evidenciada pelo aumento observado na frequência de anormalidades nucleares.

No presente estudo, a genotoxicidade do chorume foi evidenciada pelo aumento de frequência de ANE nos exemplares de *C. macropomum* expostos à concentração subletal de chorume, principalmente, relacionado ao tratamento T2. Esses resultados nos mostram que a genotoxicidade do chorume é dependente de sua concentração, ou seja, quanto maior a concentração, maior será seu índice de genotoxicidade. Na exposição *in situ*, todas as anormalidades nucleares eritrocíticas descritas por Carrasco et al. (1990) também foram observadas, porém, a genotoxicidade das águas contaminadas do lago do Macurany não pôde ser observada no grupo exposto no ponto à jusante por de 24h, pois a ocorrência de ANE não apresentou diferenças significativas nos eritrócitos dos exemplares de *C. macropomum* quando comparados ao grupo exposto à montante da lixeira. Porém, após a exposição de 48h houve um aumento significativo na frequência de ANE, quando comparado ao grupo incubado à montante da lixeira no Lago do Macurany.

A similaridade entre as frequências de ANE observada em juvenis de tambaqui indica que o tempo de exposição avaliado neste estudo (24h) não permitiu a observação de lesões nucleares nos eritrócitos. Isto pode estar relacionado ao tempo necessário para a formação de novos eritrócitos durante a mitose, pois, de acordo com Al-Sabti e Metcalfe (1995), somente após a divisão celular torna-se possível visualizar a formação de micronúcleos. Tal fato justifica também o aumento na frequência de ANE no período experimental de 48h.

Grisolia e Cordeiro (2000) ilustram essa relação e apontam que as maiores induções de micronúcleos observadas em três espécies de peixes tropicais expostos a quatro compostos químicos diferentes (bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracil e mitomicina C) ocorreram após 2 dias e 7 dias. Lemos et al. (2007) afirmam que 14 dias de exposição a efluente petroquímico foi o melhor período para avaliação da formação de micronúcleos nos eritrócitos de *Pimephales promelas*. Acredita-se, portanto, que estudos com períodos

experimentais prolongados irão dinamizar a avaliação do potencial genotóxico da contaminação do referido Lago em análise.

CONCLUSÕES

1) Os resultados levantados neste estudo indicam que o Lago do Macurany está sendo fortemente influenciado pelas atividades antrópicas da região, incluindo as atividades da Lixeira Pública de Parintins, e também pelo lançamento de esgotos domésticos não tratados, despejados nos ecossistemas aquáticos que circundam esta cidade.

2) No chorume da Lixeira pública de Parintins, nas águas adjacentes do Lago Macurany e na água do poço que serve o campus da Universidade foram detectados metais pesados e níveis significativos de HPAs.

3) Os contaminantes presentes no chorume e no Lago do Macurany desencadearam um quadro de estresse nos exemplares de tambaqui testados, fato comprovado pela alteração nos processos bioquímicos e fisiológicos.

4) As três diferentes concentrações de chorume (1:100, 1:000 e 1:10000), utilizadas na exposição subletal ao tambaqui, mostraram-se tóxicas ao *C. macropomum*.

5) A exposição de exemplares de *C. macropomum* às concentrações subletais de chorume causaram distúrbios nos parâmetros respiratórios e iônicos, promoveram hiperglicemia, disfunções hepáticas e neuromusculares e ainda causaram danos genotóxicos. O mesmo foi evidenciado para a exposição ao chorume no Lago do Macurany, no ponto à jusante da lixeira.

6) A utilização de biomarcadores demonstrou ser uma ferramenta eficaz tanto para a avaliação dos efeitos de exposição aguda ao chorume no tambaqui em escala laboratorial, quanto para a exposição *in situ*, com potencial aplicação para peixes da Amazônia.

PERSPECTIVAS

1) Espera-se que estes resultados permitam planejamentos ambientais e projetos de aterros sanitários que levem em conta a questão da toxicidade do chorume em Parintins, servindo para alertar as autoridades responsáveis e como subsídio para engenheiros e urbanistas, de modo a minimizar os riscos e apoiar práticas de equilíbrio ambiental.

2) Por se tratar de um ambiente que recebe efluentes domésticos sem tratamento adequado, torna-se necessário um estudo mais detalhado, com monitoramento contínuo do descarte dos efluentes lançados no Lago do Macurany, com maior número de pontos de coleta e com coletas entre os períodos de sazonalidade.

3) Fazem-se necessários estudos de caracterização dos sedimentos, visando mapeamento das fontes poluidoras no Lago do Macurany. A investigação dos hidrocarbonetos nos sedimentos se justifica pelo fato de que o material de fundo apresenta maior estabilidade físico-química do que a água circundante, indicando um registro histórico devido aos processos de sedimentação e fornecendo índices de referência mais estáveis para monitoramento de aporte de hidrocarbonetos, que geralmente indicam a qualidade média das águas.

4) Sugere-se que sejam realizadas investigações adicionais sobre os efeitos em longo prazo da exposição ao chorume, bem como de diferentes vias de contaminação (isto é, pela água e alimentação), pois poderão fornecer informações complementares e um conjunto de dados mais robusto para o monitoramento ambiental na Amazônia, principalmente para o município de Parintins.

5) A realização de estudos para a determinação e utilização de biomarcadores de exposição e de efeito de contaminantes ambientais nas fases iniciais da vida dos peixes é de grande valia uma vez que os indivíduos mais jovens apresentam maior sensibilidade aos poluentes.

6) Tendo em vista a enorme importância da biota aquática na Amazônia, é de extrema importância que mais estudos sejam realizados visando o biomonitoramento de áreas

impactadas pelo chorume, para tanto sugere-se que seja utilizado o protocolo usado neste trabalho, tendo em vista as respostas dos biomarcadores testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, E. et al. PAH metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquat. Toxicol.**, v. 51, p. 241–58, 2000.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. São Paulo, 2004.

ADAMS, S.M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.) **Biomarkers of Environ. Contam.**, Boca Raton: Lewis Publishers, 1990.

AHMAD, I. et al. Modulatory role of copper on β -naphthoflavone-induced DNA damage in European eel (*Anguilla Anguilla* L.). **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 71, p. 886-12, 2008.

ALKINDI, A.Y.A. et al. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **J. Fish Biol.**, v. 49, p. 1291-305, 1996.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. In: Val, A. L. & Honczarynk, A. (Eds.). **Criando Peixes na Amazônia**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 45-59, 1995.

ALPUCHE-GUAL L.; GOLD-BOUCHOT, G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 71, p. 787-97, 2008.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, 1995.

ARAÚJO-LIMA, C.A.; GOULDING, M. **Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Sociedade Civil Mamirauá. Tefé, Amazonas. Brasília: CNPQ-Ministério da Ciência e Tecnologia, 1998.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: as assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 467, p. 177–86, 2000.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 49, p. 221-5, 2001.

AZEVEDO FILHO, J. D. M.; LIMA, C. D. **Degradação ambiental do Lago do Macurany (Parintins-Am): por uma política de recuperação a partir da educação ambiental.** 61 Reunião Anual da SBPC. Manaus, 2009.

BARSIENE, J. et al. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquat. Toxicol.**, v. 78, p. 99-104, 2006.

BEAUVAIS, S.L. et al. Cholinergic and Behavioral Neurotoxicity of Carbaryl and Cadmium to Larval Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 49, p 84-90, 2001.

BELPAEME, K. et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo truttafario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay, **Mutagenesis**, v. 11, p. 485–92, 1996.

BEYER, J. et al. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Søfrjorden. **Norway Aquat. Toxicol.**, v. 36, p.75 – 98, 1996.

BOON J.P. et al. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). **Sci. Total Environ.**, v. 114, p 113-33, 1992.

BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com daphnia magna: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

BUSCHINI, A. et al. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutat. Res.**, v. 557, p. 119 – 29, 2004.

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

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. Toxicol. Phar.**, v. 21, p. 61 – 9, 2006.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, n.47, p. 2123-36, 1990.

CARVALHO, C.S., FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251, p. 109-17, 2006

CAVALCANTE, A.L.M. **Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis nilotic*) Monitoramento Ambiental do Chumbo.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências: Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, 2009.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.**, v 74, p. 264–71, 2005.

CERQUEIRA, C.C.C; FERNANDES, M.N. Gill fish recovery after Cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 52, p. 83-91, 2002.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2ed. Porto Alegre: Artes médicas, 1996.

CHILTON, J.; CHILTON, K.. A Critique of risk modeling and risk assessment of municipal landfills based on U.S. Environmental Protection Agency techniques. **Waste Manage. Res.**, n. 10, p. 505-16, 1992.

CHRISTENSEN, T.H. et al. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Appl. Geochem.**, n. 16, p. 659–718, 2001.

CHU, L.M.; CHEUNG, K.C.; WONG, M.H. Variations in the chemical properties of landfill leachate. **Environ. Manage.**, v.1, n.18, 105–12, 1994.

CRAFFORD, D.; AVENANT-OLDEWAGE, A. Bioaccumulation of non-essential trace metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (sharptooth catfish) from the Vaal River system: strontium, aluminium, lead and nickel. **Water SA (Online)**, v. 36, n. 5, p.621-40, 2010.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução nº 357/2005. <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 05/12/2011.

CPRM- Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais- Serviço Geológico do Brasil. **Avaliação da qualidade das águas subterrâneas da cidade de Parintins – Am.** Manaus, 2005.

DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Chronic toxic effects of quinalphos on some biochemical parameters in *Labeo rohita* (Ham.). **Toxicol. Lett.**, v. 114, p. 11-8, 2000.

DELLALI, M. et al. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussates* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. **Comparative Biochem. Pysiol.**, v. 130, p. 227-35. 2001.

DOMINGOS, F. C. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná, 2006.

EL-DEMERDASH, F.M.; ELAGAMY, E.L. Biological effects in *Tilapia nilotica* fish as indicators of pollution by cadmium and mercury. **Inter. J. Environ. Health Resear.**, n. 9, p. 173-86, 1999.

ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutat. Res.**, v. 470, p. 39-51, 2000.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiol.** v. 85, p. 97-177, 2005.

FAIRBAIRN, D.W; OLIVE, P.L; ONEILL; K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.**, v. 339, p. 37–59, 1995.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol. Lett.**, v. 140, p. 353- 65, 2003.

FONTAINHAS-FERNANDES, A. et al. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v. 51, p. 1057-63, 2008.

GILMOUR, K.M. Gas exchange. In: Evans, D.H (Ed). **The physiology of fishes.** CRC Press LLC. p. 101-127, 1998.

GRAVATO, C.; SANTOS, M.A. Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of β -naphthoflavone water-exposed sea bass. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 52, p. 62-8, 2002.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 235-39, 2000.

HAVELKOVA, M. et al. Biomarkers of Contaminant Exposure in Chub (*Leuciscus cephalus* L.) – Biomonitoring of Major Rivers in the Czech Republic. **Sensor**, n. 7, p. 2599-611, 2008.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2.ed. CRC Press, Lewis publishers, 1995.

HEDDLE, J.A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 18, p. 277-91, 1991.

HINTON, D. E. et al. Liver Toxicity. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds.). **The Toxicol. of Fishes**. 2008.

HOCHACHKA, P.W. SOMERO, G. N. Biochemical adaptations. **Princeton University Press, Princeton**. p. 537, 1984.

HOOK, S.; 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. **Aquat. Toxicol.**, v. 66, p. 1-14, 2004.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - (22/04/2011 - Parintins/AM). Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/acidentes-ambientais-abril-2011/empresa-e-multada-por-poluicao-e-morte-no-lago-do-macurany-parintins/am.pdf>> Acesso em: 28 Jan. 2012.

ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. **Biologia pesqueira do tambaqui, *Colossoma macropomum*, no Baixo Amazonas**. In: Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: biologia e

estatística pesqueira. Brasília: Edições IBAMA, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 2000.

JAGER, T. et al. Novel view on predicting acute toxicity: Decomposing toxicity data in species vulnerability and chemical potency. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 67, p. 311-22, 2007.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ. Toxicol.**, n. 18. p. 260-67, 2003.

JONSSON, C.M; CASTRO, V.L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde ambiente. EMBRAPA, 2005. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson_Castro_biomarcadoresID - U4Vhi5C93K.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson_Castro_biomarcadoresID-U4Vhi5C93K.pdf)> Acesso em 15 Mar. 2012.

KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. **Standartization of hemoglobinometry**. In: Boroviczény C.G. (Ed). Erythrocytometric methods and their standartization. Bibl. Haematol., p. 68-72, 1964.

KARAN, V. et al. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 40, p. 49-55, 1998.

KJELDTSEN, P., CHRISTOPHERSEN, M. Composition of leachate from old landfills in Denmark. **Waste Manage.** v. 19, p. 249–56, 2001.

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

LEMOS, C. T. et al. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Sci. total environ.**, v. 406, n. 1-2, p 337-43, nov 2008.

LEMOS, C.T. et al. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotox. Environ Safe.**, n. 66, p. 391–401, 2007.

LICHTENFELS, A.J.F.C. et al. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **J. Comp. Path.**, v. 115, p. 47-60, 1996.

LIMA, E.F. **Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais traço em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento**. 2001. Tese (Doutorado em Química). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

LINDE, A.R. et al. Brown trout as biomonitor of heavy metals pollution: effect of age on the reliability of the assessment. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 40, p. 120-25, 1998.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 120, p. 43-9, 1998.

LUEBKE, R.W.; HODSON, P.V.; FAISAL, M.; ROSS, P.S.; Grasman, K.A; ZELIKOFF, A. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. **Fund. Appl Toxicol.**, v. 37, p. 1-15, 1997.

MACO-GARCIA, J. T. **Influência da água de formação da extração de petróleo do Rio Urucu sobre aspectos hematológicos e conteúdo iônico de *Colossoma macropomum* e *Glyptoperichthys joselimaianus***. 1997. Dissertação (Mestrado em Biologia-Ecologia). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, 1997.

MAGALHÃES, D.; FERRAO FILHO, A.. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, América do Norte, 2000. Disponível em: <http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/view/112/38>. Acesso em: 25 Jan. 2012.

MALUF, S.W.; ERDTMANN. Biomonitorização do dano genético em humanos. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P (Eds). **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, n. 61, p. 230-38, 2005.

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 53, p. 86-92, 2002.

MARTIN Jr.; BLACK, M.C. Biomarker Assessment of the Effects of Petroleum Refinery Contamination on Channel Catfish. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 33, p. 81-7, 1996.

MARTINEZ, C. B. R. et al. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Braz. J. Biol.**, v. 64, n. 4, p. 797-807, 2004.

MARTY, G. D. et al. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. **Mar. Environ. Res.**, v. 56, p. 559-84. 2003.

MATSUO, A.Y.O.; VAL, A. L. Aluminium effects in C. M exposed to softwater, calcium, and humic substances at low pH: implications for local aquaculture. **Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Salvador, BA, 2003.**

MATSUO, A.Y.O; OLIVEIRA, N.G.F; VAL, A.L. **Efeito do cálcio e de substâncias húmicas na biodisponibilidade de zinco em tambaqui: balanço iônico, hematologia e alterações enzimáticas.** 7 Reunião Especial da SBPC. Manaus, 2001.

MAZON, A. F. **Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus Scrofa* (Steidachner, 1881).** 1997. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 1997.

MAZON, A.F.et al. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Braz. J. Biol.**, v. 63, p 621-31, 2002.

MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. **Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish.** In: Fish Ecophysiology. Rankin & Jensen (Eds). Chapman & Hall. London. p. 297-321, 1993.

MEADOR, J.P. et al. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 143, p. 79- 165, 1995.

MEDDA, C. et al. Effect of rotenone on activity of some enzymes and their recovery in fresh-water carp fingerlings of Labeo-Rohita. **J. Environ. Biol.**, v.16, p. 55-60, 1995.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; PAULO, J.; TORRES, M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecol. Bras.**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MENEZES, A.C.L. **Toxicidade do cobre no tambaqui *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2005.

MENEZES, A.C.L. **Toxicidade do cobre no tambaqui *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2005.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotrop. Ichthyol.**, n. 8, p. 385- 568, 2010.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 135-47, 1998.

MOURA, M.A.F.; OLIVEIRA, M.I.S.; VAL, A.L. Effects of hypoxia on leukocyts of two amazon fish *Collossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. **Cienc. Biol.**, v. 2, p. 13-22, 1997.

NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology.** 2. ed., Lewis Publishers, EUA, 2003.

NUNES, D. C. L.; FONSECA, A. L. **Avaliação da eficiência da ETE (Estação de Tratamento de Efluente) da indústria Mahlet/Itajubá utilizando bioensaios de**

toxicidade aguda com microcrustáceos. In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2002, Vitória. Livro de Resumos VII Ecotox. Vitória. 2002.

NUSSEY, G., VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). **Comp. Biochem. Phys.**, v. 111, p 359-67, 1995.

OIKARI, A.; JIMENEZ, B. Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activity in sunfish liver by b-naphtoflavone and benzo[a]pyrene. **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 23: p. 89-102, 1992.

OLIVEIRA, C. A. R. et al. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.

OLIVEIRA, C. P. F.; CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. **Efeito do cobre sobre o tomoatá, *Haplosternum littorale* (Hancock, 1828): respostas enzimáticas e níveis de estresse durante a exposição a concentração subletal.** 7a Reunião Especial da SBPC. Manaus, 2001.

OLIVEIRA, C.P.F., **Biomarcadores moleculares, genotóxicos e enzimáticos de efeitos do petróleo em tambaqui (*Colossoma macropomum*): subsídios para monitoramento ambiental na Amazônia.** 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2010.

OLIVEIRA, C.P.F., **Efeito do cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – AM, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).** 2003. Dissertação de mestrado (Biologia Tropical e Recursos Naturais). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas (INPA/UFAM), Manaus, Amazonas, 2003.

PACHECO, M., SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotox. Environ. Safe.**, v.53, n. 3, p. 331-47. 2002.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 49, p. 64–75, 2001a.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on juvenile eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 38, p. 252-59, 1997.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. **Ecotox. Environ. Safe.**, v.40, p. 71-6, 1998.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Tissue distribution and temperaturedependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environ. Int.**, v. 26, p. 149-55, 2001b.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotox. Environ. Safe.**, n. 53, p. 331–47, 2002.

PANDEY, S. et al. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch:1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. **Archives of Environ. Contamin. Toxicol.**, n. 41, p. 345–52, 2001.

PANDRANGI, R. et al. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 26, p. 345-56, 1995.

PARVEZ, S., SAYEED, I., RAISUDDIN, S. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 65, p. 62–6, 2006.

PEREZ, J.E; GONZALES, D. **Influência del ambiente sobre diversos parâmetros sanguíneos en pices.** In: Resumos do V simpósio latino Americano sobre Oceanografia Biológica. Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 191-92, 1978.

PESSOA, L. O. A.; AZEVEDO FILHO, J. D. M. **O problema do lixo em Parintins (Am) e a inserção da associação dos catadores na coleta seletiva.** 61 Reunião Anual da SBPC. Manaus, 2009.

PHILIPS, P.S.; FREESTONE, N.P.; HALL, R.S. Dealing with leachate. **Chem. Brit.**, v. 30, p. 828-30, 1994.

POMPEU, P. S.; ALVES, C. B. M.; CALLISTO, M. **The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil.** In: Brown, GRAY, L. R. et al. (Ed.). Effects of urbanization on stream ecosystems. American Fisheries Society, Symposium., v. 47, p. 11-22, 2005.

QUINTANEIRO, C. et al. Environmental pollution on natural populations: A biomarkers case study from the Iberain Atlantic Coast. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 52, p. 1406-413. 2006.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: mecanismos e adaptação.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAO, J. V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 143, p. 492-98, 2006.

RAW, I. **Bioquímica: fundamentos para as ciências biomédicas.** In: RAW, I.; FREEDMAN, A. & MENNUCCI, L. (Eds.). São Paulo: McGraW-Hill do Brasil, 1981.

RENOU, S. et al. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. **J. hazard. Mater.**, v. 150, n. 3, p. 468-93, 2008.

RISSE-DE FAVERNEY, C. et al. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. **Aquat. Toxicol.**, v.53, p. 65-76, 2001.

ROCHE, H.; BOGE, G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. **Mar. Environ. Res.**, v. 41, p. 27-43, 1996.

ROGERS, J.T., RICHARDS, J.G., WORD, C.M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v. 64, p. 215-34, 2003.

RUSSO, C. et al. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotox. Environ. Safe.**, n 57. p. 168-74, 2004.

SANCHES-GALLAN, S. et al. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 49, p. 139-43, 2001.

SANCHES-GALLAN, S. et al. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mut. Res.**, v. 412, p. 219-25, 1998.

SANCHES-GALLAN, S.; LINDE, A. R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and european minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 43, p. 301-04, 1999.

SANTOS, M.A.; PACHECO, M. *Anguilla anguilla* L. stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 35, p. 96-100, 1996.

SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed., São Paulo: Santos, 2002.

SCHLENK, D., HANDY, R., STEINERT, S., DEPLEDGE, H., BENSON, W. **Biotransformation in fishes**. In: DI GIULIO, R. T., HINTON, D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL. p.153-234, 2008a.

SCHLENK, D., HANDY, R., STEINERT, S., DEPLEDGE, H., BENSON, W. **Biomarkers**. In: DI GIULIO, R. T., HINTON, D.E. (Eds.). *The Toxicol. of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL. p.683-732, 2008b.

SCHMALZ JR., W.F., HERNANDEZ, A.D., WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, n. 3, p 539-42, 2002.

SCHULZ, U.H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Braz., J. Biol.**, v. 61, p. 1-8, 2001.

SHUGART LR. DNA damage as a biomarker of exposure. **Ecotoxicology**. n. 9, p. 329-40, 2000.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. **Biomonitoramento ambiental**. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P (Eds). *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, A. G.; MARTINEZ, C.B.R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 23, p. 185-92, 2007.

SIMONATO, J.D. **Biomarcadores funcionais e histopatológicos á exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel**. 2006. Dissertação de mestrado (Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SIMPSON, M. G. et al. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 283-87. 2000.

SINSINNO, C. L. S. **Destino dos resíduos sólidos urbanos e industriais no estado do rio de Janeiro: avaliação da toxicidade dos resíduos e suas implicações para o ambiente e para a saúde humana**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências), Fundação Oswaldo Cruz, 2002.

SISINNO, C.L.S. **Resíduos Sólidos e Saúde Pública**. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (org). *Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: Uma Visão Multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

SMITH, W. H. **Principles of Biochemistry**. International Student Edition, p. 874, 1959.

SOFIA, S. H. et al. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiol.**, v. 553, p. 245-254, 2006.

STEHR, C. M. et al. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. **Mar. Environ. Res.**, v. 57, p. 55-74. 2003.

STEINERT, S. A. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Mar. Environ. Res.**, v. 42, p. 253-59, 1996.

STEINERT, S. A. et al. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 65-85, 1998.

STENTIFORD, G. D. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Mar. Environ. Res.**, v. 55, n. 2, p 137-59. 2003.

TAO, S. et al. Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead. **Ecotox., Environ. Safe.**, n. 46, p. 174-180, 2000a.

TAO, S. et al. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotox., Environ. Safe.**, n. 47, p. 59-64, 2000b.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin Odethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and naphthoflavone. **Ecotox., Environ. Safe.**, v. 55, p. 98-107, 2003.

TORTELLI, V. et al. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere**. v. 65, p. 560-66, 2006.

VAL, A. L.; Oxigen-transfer in fish morphological and molecular adjustments. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, p. 1119-27, 1995.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. *In*: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M. (Eds). **Biol trop. fishes**. Manaus- Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1999.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Fishes of the Amazon and their environments. **Physiol. biochem features**. Heidelberg, Springer Verlag, 1995.

VALENTI, W. C. et al. **Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ- Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000.

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

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. **Mutat. Res.**, v. 63, p. 36-43, 2007.

VERNIER, P.; CANOVA, S. Formation of DNA adducts in the gill tissues of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]purene. **Aquat. Toxicol.**, v. 34. p. 119-33, 1996.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 166, p. 281-300, 2007.

WENDELAAR BONGA, S.E The stress response in fish. **Phys. Rev**. v. 77, p 591-625, 1997.

WILHELM FILHO, D. et al. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the Brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture.**, v. 203, p 149-58, 2001.

WILSON, R; E. TAYLOR. The physiological responses of freshwater rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) during acutely lethal copper exposure. **J. Comp. Physiol. B**, v. 163, p. 38-45, 1993a.

WILSON, R.; TAYLOR, E. Differential responses to copper in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to sea water and brackish water. **J. Comp. Physiol. B**, v. 163, p. 239-246, 1993b.

WINKALER, E.U. et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Sci.**, v. 23, n. 2, p. 507-14, 2001.

WIRGIN, I.; WALDMAN, J.R. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. **Mutat. Res.**, v.399, p. 193-219, 1998.

WOOD, C.M. et al. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH in extremely soft water. **Physiol. Zool.**, n. 71, p. 658-70, 1998.

ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia**. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 2 ed. .São Carlos: RIMA, 2008.

ZAR, J. K.. **Biostatistical analysis**. 2ed. New Jersey : Prentice-Hall, 1984.

ZIKIC, R.V. et al. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio Bloch*) exposed to cadmium. **Physiol. Res.**, v. 50, p.105-111, 2001.