



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical - PPGBio
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI - BRASIL



ROBERTO DE SOUZA SILVA

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE GARIMPO NA BACIA DO RIO CASSIPORÉ,
ESTADO DO AMAPÁ, SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES**

Macapá - AP
2013

ROBERTO DE SOUZA SILVA

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE GARIMPO NA BACIA DO RIO CASSIPORÉ,
ESTADO DO AMAPÁ, SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dr.^a Eliane Tie Oba Yoshioka

Macapá - AP
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Silva, Roberto de Souza.

Influência da atividade de garimpo na bacia do Rio Cassiporé, Estado do Amapá, sobre o estresse oxidativo em peixes / Roberto de Souza Silva; orientadora Eliane Tie Oba Yoshioka. Macapá, 2013.

61 p.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Mestrado em Biodiversidade Tropical.

1. Garimpagem – Aspectos ambientais - Amapá. 2. Poluição – Rio Cassiporé (AP). 3. Peixes – Contaminação por metais pesados. 4. Toxicologia ambiental. I. Yoshioka, Eliane Tie Oba. (orient.). II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD (22.ed). 639.313098116

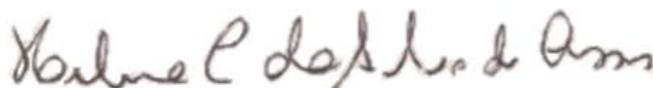
ROBERTO DE SOUZA SILVA

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE GARIMPO NA BACIA DO RIO CASSIPORÉ,
ESTADO DO AMAPÁ, SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES**

Orientadora

Profa Dra Eliane Tie Oba Yoshioka
Embrapa Amapá

Banca Examinadora



Profa Dra Helena Cristina Silva de Assis
Universidade Federal do Paraná

Profa Dra Eleneide Doff Sotta
Embrapa Amapá

À família, com o carinho especial à minha sobrinha e afilhada, cujo sorriso ilumina nossas vidas. E a minha amada noiva por dar sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à querida orientadora e amiga, Dr^a. Eliane Yoshioka, pelo companheirismo, pelos conselhos, pela oportunidade e confiança depositada e por fazer de mim o profissional que sou hoje.

Aos meus pais, José Maria e Maria Joana, aos irmãos, Rodrigo e Daniela, aos cunhados, Dinay e Marcus, pelo apoio incondicional.

À sobrinha e afilhada linda, Yânid, que torna o dia mais alegre.

À mulher que faz com que minhas forças sejam infinitas, Nayana Trindade, te amo!

Aos amigos de longa data pelo apoio, companheirismo e momentos de distração.

Aos amigos adquiridos ao longo do caminho, pelos momentos inesquecíveis, pela força e palavras de incentivo em momentos de fraqueza.

Agradeço também às pessoas que de forma direta ou indireta ajudaram na construção deste trabalho, em especial à Dr^a. Eleneide Sotta, ao Dr. Cesar Santos e à Dr^a. Helena Assis.

Fica o agradecimento às novas amizades feitas no Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFPR, em especial à Msc. Izonete Cristina Guiloski pelo apoio, compreensão, dedicação e paciência na realização das análises bioquímicas, muito deste trabalho se deve a você, obrigado!

Ao CNPq, à Embrapa Amapá e ao Programa de Pós-Graduação de Biodiversidade tropical, aos professores e a todo o corpo técnico.

RESUMO

A extração mineral em larga escala, no Estado do Amapá, teve início em meados do século XX. Este tipo de empreendimento traz consideráveis impactos negativos ao meio ambiente, conseqüentemente com prejuízos diversos aos organismos. Esta dissertação objetivou conhecer a possível influência da atividade de garimpo na condição de saúde de peixes, através de avaliações em três tecidos: hepático (Metalotioneína, MT), cerebral (Lipoperoxidação - LPO, Glutathione S-transferase - GST, Superóxido dismutase - SOD, Catalase - CAT, Glutathione peroxidase - GPx e Glutathione - GSH) e muscular (ACHE); pertencentes à bacia do Rio Cassiporé, em quatro pontos no entorno do Módulo IV da Floresta Estadual do Amapá – FLOTA, em dois períodos (chuvoso e seco) no ano de 2012. Os pontos foram determinados de acordo com o grau de influência do garimpo localizado em Lourenço (Lourenço > Ponte > Vila Velha > Vila Taperebá). Os resultados de MT indicaram alterações em todos os pontos quando foram comparados os períodos, sendo que somente em Vila Velha houve aumento significativo ($p < 0,05$), sendo observada variação significativa entre pontos no mesmo período somente o período chuvoso. LPO apresentou variação significativa em dois pontos (Ponte e Vila Velha) quando feita a comparação entre os períodos; GST apresentou diferença significativa em Lourenço e Vila Taperebá (entre períodos), além de apresentar variação significativa entre pontos no mesmo período; SOD apresentou diferença significativa (entre períodos) em todos os pontos, contudo a atividade dessa enzima foi mínima; CAT não apresentou atividade em nenhum local de coleta em ambos os períodos; GPx e GSH apresentaram diferença significativa em três pontos, a exceção foi Lourenço (entre períodos), entretanto, GSH apresentou diferença entre pontos de coleta no período seco. Com relação a ACHE, os resultados, com exceção do ponto Lourenço, indicam uma possível inibição enzimática. Dos vários fatores que podem afetar a síntese de MT, a maturação gonadal, *a priori*, é a que melhor explica a diferença significativa existente entre os períodos de coleta no ponto Vila Velha. LPO, SOD e CAT apresentaram valores menores em relação a outros estudos, levando-se a acreditar que não houve influência suficiente para a ativação destes parâmetros, principalmente LPO, ou possivelmente houve inativação em decorrência de agentes exógenos. O nível de GSH foi considerado baixo, fator que pode ser explicado pela elevada atividade de GPx, já que esta utiliza a GSH como substrato, mesma estratégia utilizada pela GST e que, possivelmente, por esta razão a GST tenha apresentado atividade reduzida. Conclui-se que os peixes da bacia do Rio Cassiporé podem estar sofrendo estresse oxidativo pela ação de algum agente exógeno, ou mesmo endógeno, como no caso da metalotioneína. De forma a obter maior entendimento sobre os resultados apresentados faz-se necessária a realização de estudos complementares, principalmente com relação ao grau de contaminação da água por metais pesados.

Palavras-chave: defesa antioxidante, estresse oxidativo, mineração.

ABSTRACT

The large-scale mineral extracting in the State of Amapá started in the beginning of the twentieth century. This kind of undertaking brings several negative impacts to the environment, consequently with harm to organisms. This dissertation had as a goal, to find out the influence of this mining activity on fish health, through assessments in three tissues: liver (Metallothionein - MT), brain (Lipid peroxidation - LPO, Glutathione S-transferase - GST, Superoxide dismutase - SOD, Catalase - CAT, Glutathione peroxidase - GPx and Glutathione - GSH) and muscle (Acetylcholinesterase - ACHE); belonging to the River Basin Cassiporé in four points surrounding the Module IV of Amapá State Forest - FLOTA in two seasons (wet and dry) in the year 2012. The points were determined according to the degree of influence of mining situated in Lourenço (Lourenço > Ponte > Vila Velha > Vila Tapereba). Results of MT showed alterations in all sampling locations when seasons were compared, and only in Vila Velha there was a significant increase, being observed significant variation between points in the same period only the rainy season. LPO showed significant variation in two sampling locations (Ponte and Vila Velha) when compared seasons; GST showed significant difference in Lourenço and Vila Tapereba (between seasons), besides showing significant variation among sampling locations in the same season; SOD showed significant difference in all sampling locations, however this enzyme activity was minimal. CAT did not show activity in any sampling locations in both seasons. GPx and GSH showed significant difference in three sampling locations, except for Lourenço (between seasons); yet, GSH showed difference among the sampling locations in the dry season. Regarding ACHE activity, the results show a possible enzyme inhibition, except for Lourenço, carried out in the dry and rainy seasons, respectively. Among the several factors that can affect MT synthesis, gonadal maturation, *a priori*, is the one which best explains the significant difference between the seasonal periods in Vila Velha. LPO, SOD and CAT showed lower values than the ones in other studies, leading to believe there was not enough influence to activate these parameters, mainly LPO, or possibly there has been inactivation due to exogenous agents. The GSH level was considered low, which can be explained by the high GPx activity, since it uses GSH as substrate, the same strategy used by GST, and possibly for this reason GST may have showed reduced activity. In the results obtained from ACHE, apparently there was no influence of abiotic factors concerning to this enzyme activity. It was led to consider its activity was inhibited by some exogenous agent. It was concluded the fish from the Cassiporé River Basin may be suffering oxidative stress, by some exogenous or even endogenous agent, as in the case of metallothionein. Further studies are necessary, mainly concerning the water contamination level by heavy metals.

Keywords: antioxidant defense, oxidative stress, gold mining.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios (\pm desvio padrão) da concentração de metalotioneína ($\mu\text{g.mg}$ de proteína ⁻¹) hepática de peixes, no ano de 2012.....	34
Tabela 2	Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e do peso (g) de peixes coletados para concentração de metalotioneína ($\mu\text{g.mg}$ de proteína ⁻¹) hepática, no ano de 2012.....	35
Tabela 3	Valores médios (\pm desvio padrão) do nível de peroxidação lipídica (LPO em μmol hidroperóxido.mg de proteína ⁻¹), das atividades da glutathione S-transferase (GST em nmol.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), do superóxido dismutase (SOD em U.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), da glutathione peroxidase (GPx em nmol.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), e da concentração de glutathione ([GSH]= $\mu\text{g. mg}$ de proteína ⁻¹) em tecido cerebral, no ano de 2012.....	37
Tabela 4	Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e peso (g) de peixes utilizados para quantificação de peroxidação lipídica (LPO em μmol hidroperóxido.mg de proteína ⁻¹), glutathione S-transferase (GST em nmol.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), superóxido dismutase (SOD em U.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), glutathione peroxidase (GPx em nmol.mg de proteína ⁻¹ .min ⁻¹), glutathione ([GSH]= $\mu\text{g. mg}$ de proteína ⁻¹) em tecido cerebral, no ano de 2012.....	38
Tabela 5	Valores médios (\pm desvio padrão) de acetilcolinesterase (ACHE em nmol. mg de proteína ⁻¹ . min ⁻¹) em tecido muscular, no ano de 2012.....	44
Tabela 6	Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e peso (g) de peixes utilizados para determinação da atividade de ACHE (nmol. mg de proteína ⁻¹ . min ⁻¹) em tecido muscular, no ano de 2012.....	44
Tabela 7	Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T) e pH da água nos locais de coleta dos peixes nos períodos chuvoso e seco em 2012.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização do Módulo IV da Floresta Estadual do Amapá, Estado do Amapá, Brasil.....	26
Figura 2	Pontos de amostragem da ictiofauna em rios presentes no entorno do Módulo IV da Floresta Estadual do Amapá, Estado do Amapá, Brasil.....	27
Figura 3	Encontro entre o igarapé Elic com o Rio Reginá. (a) Final do período chuvoso; (b) Período seco Foto: D. Pandilha (2012).....	28
Figura 4	Ponto de coleta no Rio Cassiporé, próximo à BR-156. (a) Final do período chuvoso; (b) Final do período seco. Foto: D. Pandilha (2012).....	28
Figura 5	Locais de amostragens próximos as Comunidade Vila Velha (a) e Vila Taperebá (b). Foto: R. Silva (2012).....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
	BIOMARCADORES	16
	DEFESAS ANTIOXIDANTES	17
2	HIPÓTESES	23
3	OBJETIVOS	24
	GERAL	24
	ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
	COLETA DAS AMOSTRAS	25
	LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS PONTOS DE COLETA	26
	METODOLOGIA DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	29
	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	29
	PROTEÍNA TOTAL	30
	ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	30
	ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	30
	ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	31
	ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	31
	NÍVEL DE GLUTATIONA (GSH).....	31
	NÍVEL DE LIPOPEROXIDAÇÃO OU PERÓXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)	32
	NÍVEL DE METALOTIONEÍNA (MT)	32
	ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)	33
	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	33
	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	47
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

A extração de recursos naturais é um capítulo importante na história do Brasil, pois esta atividade serviu como subsídio à ocupação territorial, além de ser, durante muito tempo, um dos principais alicerces da economia nacional (FARIAS, 2002). Dessa forma, as explorações madeireiras e minerais serviram como base para a ocupação da Amazônia, uma das últimas fronteiras (SANTOS, 2002).

A primeira experiência na extração de minérios na Amazônia iniciou-se em meados do século XX com a concessão, pelo Governo Federal, para a extração de manganês em Serra do Navio, na região central do então Território Federal do Amapá, pela Indústria e Comércio de Minérios S.A. (Icomi). Após este marco, ocorreram diversos incentivos para a extração de recursos minerais, aliada à política de ocupação da Amazônia, principalmente no período pós 1964.

Em meados da década de 80, houve uma grande valorização do ouro no mercado internacional, e conseqüentemente uma expansão de sua exploração industrial na Amazônia, sendo que no Estado do Amapá teve destaque o embate entre a Mineração Novo Astro (MNA) com garimpeiros que já faziam a lavra desse minério nos garimpos Mutum e Lourenço, no Município de Calçoene (MONTEIRO, 2005a).

Com o encerramento das atividades da MNA, em 1995, esta transferiu os direitos de mineração à recém-criada Cooperativa de Mineração dos Garimpeiros do Lourenço (COOGAL), atuante até hoje na área. Ainda na década de 80, outra empresa, a Mineração Yukio Yoshidome S.A. (MYYSA), atuava em uma área próxima àquela utilizada pela MNA. A MYYSA utilizava, para exploração de ouro, mercúrio sem nenhum controle, e encerrou suas atividades em 1992, deixando um rastro de degradação ambiental (MONTEIRO, 2005b).

Os impactos causados pela mineração no Brasil podem ser classificados da seguinte forma: poluição da água, do ar, sonora e subsidência do terreno. Com relação à poluição aquática, os impactos mais frequentes são a utilização inadequada do mercúrio (Hg) e o aumento da turbidez (FARIAS, 2002).

Lacerda (1997a) apresentou dados referentes à origem do mercúrio presente no meio ambiente. Segundo o autor, o maior responsável pela contaminação ambiental é o garimpo de ouro, seguido pelas fontes industriais e pela emissão por fontes difusas, já esta nas áreas urbanas, principalmente. Segundo o mesmo autor, essas alterações das fontes poluidoras dificultam o seu monitoramento, além de terem conseqüências imprevisíveis.

Há muita dificuldade em estimar a quantidade de Hg liberado na extração de ouro, uma vez que existe atividade mineradora de pequena escala, fazendo com que esta atividade tenha mobilidade. Um grave problema na utilização descontrolada de mercúrio neste tipo de atividade é que cerca de 65 % do Hg utilizado vai pra atmosfera e o restante contamina o solo e a água, principalmente pelo despejo dos rejeitos contaminados (LACERDA, 1997b).

A partir do momento em que metais pesados atingem corpos hídricos, estes se movem parcialmente através da correnteza, tendo como principais carreadores os sólidos suspensos e os sedimentos (HAIYAN e STUANES, 2003). No entanto, além da mineração, atividades associadas ao desenvolvimento urbano e industrial podem ocasionar aumento na poluição através da liberação de arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), Hg, zinco (Zn), alumínio (Al), ferro (Fe), níquel (Ni), cromo (Cr), cobre (Cu), estanho (Sn), selênio (Se), prata (Ag) e berílio (Be) (HAMILTON e MEHRLE, 1986; HODSON, 1988).

A ação desses agentes pode afetar processos metabólicos, fazendo com que ocorra um desequilíbrio homeostático no organismo. Um exemplo desse desequilíbrio são mudanças nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando estresse oxidativo que pode ser definido como “...uma situação em que a concentração estável de ERO é temporariamente ou cronicamente aumentada, perturbando o metabolismo e regulação celulares e prejudicando os constituintes celulares” (LUSHCHAK, 2011, pg. 15) e que pode causar morte celular (RAMOS *et al.*, 2000; MARTINEZ, 2006).

A fim de se estudar os possíveis impactos causados por agentes exógenos ao meio ambiente, comumente se utilizam marcadores biológicos, que são considerados ferramentas importantes quando se trata de averiguar a qualidade ambiental por parte dos cientistas (NRC, 1987).

Diversas análises podem ser utilizadas como forma de avaliar o risco ambiental e, principalmente, o nível de contaminação nos peixes. Para tanto, deve ser realizado o uso combinado de biomarcadores em peixes, para que desta forma se tenha uma melhor visão da qualidade ambiental. Dessa forma, as respostas geradas por esses biomarcadores podem ajudar na elucidação de eventos moleculares que ocorrem após exposição dos animais aos xenobióticos químicos. Assim, a importância de tais resultados na avaliação de potenciais perigos e riscos quando ocorre a presença de poluentes tóxicos no meio ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Fontes poluidoras, como por exemplo, os rejeitos originados de atividades mineradoras, contaminam os cursos d'água e, conseqüentemente, os animais que porventura tenham contato com esta fonte. Logo, a verificação da condição de saúde dos animais, no caso

deste estudo a ictiofauna, apresenta relevância biológica e ecológica, podendo alcançar a esfera da saúde pública. Pesquisadores, como Akagi *et al.* (1995) também demonstram essa preocupação tanto com pessoas que trabalham com a atividade mineradora, como os aquelas que vivem a jusante deste tipo de empreendimento.

Os peixes podem ser facilmente contaminados pela forma orgânica do Hg (metilmercúrio - MeHg) (CLARKSON, 1990; CAUSSY *et al.*, 2003; CLARKSON *et al.*, 2003), fato que pode ser considerado preocupante, visto que estão entre as principais fontes de alimento de ribeirinhos que residem ao longo dos corpos hídricos que compõem a bacia amazônica. Esta relação entre consumo de pescado e aumento da contaminação por Hg foi observado por Airey (1983), ao relacionar fatores como grau de exposição, idade e sexo, assim como estudos realizados em populações ribeirinhas do Rio Madeira (Padovani *et al.*, 1995), no Rio Tapajós e próximo a um garimpo em um lago no centro do Estado do Amapá (Akagi *et al.*, 1995; Pinheiro *et al.*, 2000).

A ecotoxicologia foi inicialmente conceituada como “...um ramo da toxicologia preocupado com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos aos constituintes do ecossistema, animais (incluindo o homem), vegetais e microbianas, em um contexto integral.” (TRUHAUT, 1977, p. 152). Ou seja, o estudo ecotoxicológicos baseia-se nos efeitos dos componentes tóxicos existentes no ambiente atuando sobre os ecossistemas e seus componentes não-humanos (FERNICOLA *et al.*, 2003).

Exemplo de agentes tóxicos, os metais pesados podem estar disponíveis no meio ambiente através de dois processos: natural ou antrópico (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006). Características como hidrossolubilidade, rápida absorção por organismos aquáticos e forte ligação com grupos sulfidril (causa de mudanças estruturais nas atividades enzimáticas), faz com que os metais sejam importantes causas de poluição ambiental (HODSON, 1988).

A contaminação ecossistêmica pode variar desde a perda total da biota a consequências mais sutis como alterações na reprodução, crescimento e mortalidade de uma população. Em organismos aquáticos esta contaminação ocorre por íons livres, metais em sua forma orgânica ou por ânions inorgânicos através do processo respiratório ou pela cadeia trófica. A presença de metais liberados a longo prazo em pequenas quantidades também pode causar grandes impactos ao meio ambiente, por isso a estimativa de concentrações mínimas permitiriam o crescimento e a reprodução, que juntos permitiriam uma sobrevivência a longo prazo, contribuindo para a proteção da biota, em especial a aquática (HODSON, 1988).

Tem-se sugerido que a MT desempenha a importante tarefa na regulação metabólica de elementos traço (BREMNER e BEATTIE, 1990; GAGNÉ *et al.*, 1990). Sendo que há certa hierarquia nas ligações entre MT e os metais, além de que sua síntese dependerá do tipo de instigador e de qual gene é ativado (BREMNER e BEATTIE, 1990).

Conforme o fator que está sendo analisado, este pode afetar de diferentes maneiras o nível de MT, pois hormônios como os glicocorticoides e os peptídicos tendem a induzir a síntese desta proteína, enquanto fatores como temperatura e o status nutricional afetam sua ligação com os metais. Em decorrência de fatores como a quantidade de informação disponível e a variedade de métodos utilizados na quantificação de MT, esta proteína apresenta um forte potencial como biomarcadora na avaliação de risco ambiental por metais tóxicos. Entretanto, devido à falta de compreensão acerca de sua função biológica, não é possível estabelecer uma ligação entre mudanças do seu nível e características prejudiciais a célula (VAN DER OOST *et al.* 2003).

Bremner e Beattie (1990) levantam a hipótese de que a ação de desintoxicação da MT pode não ser sua função principal, uma vez que, evolutivamente, sua função estivesse ligada ao metabolismo de elementos essenciais ao invés dos não essenciais. Todavia, tem-se demonstrado a importância e a eficácia desta proteína como biomarcador (FIGUEIRA *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que a MT pode ser sintetizada sob influência de diversos agentes, tais como íons metálicos (CHOVANEC *et al.*, 2003), maturação gonadal (POVLSEN *et al.*, 1990), estresse físicos ou inflamatórios (BREMNER e BEATTIE, 1990), ácido L-ascórbico (ONOSAKA *et al.*, 1987), agentes alquilantes (KOTSONIS e KLAASSEN, 1979), substâncias internas que produzem radicais livres (SATO e BREMNER, 1993), além de que pode ser influenciada pela idade, sexo e tipo de tecido (RHEE *et al.*, 2009).

Todavia, deve-se considerar que estudos realizados com animais oriundos de ambiente natural são difíceis de serem avaliados, visto que as condições enfrentadas pelos peixes não serem as mesmas de um estudo em laboratório (ambiente controlado) (LINDE *et al.*, 2001).

Segundo Fry (1971) essa influência ambiental sobre o organismo pode ser diferenciada em cinco categorias: letal, controle, limite, camuflagem e fatores diretivos; a primeira categoria ocorre quando uma identidade ambiental atua destruindo a integração do organismo, sendo que esta destruição deve ser independente da taxa metabólica. Conquanto, os efeitos causados nas populações silvestres são difíceis de ser detectados, uma vez que estes organismos tendem a apresentar tais efeitos após um longo período. Dessa forma, quando tais

efeitos tornam-se visíveis, os processos muitas vezes estão além do ponto de reversão (VAN DER OOST *et al.*, 2003), causando a morte do organismo.

Todavia, muitos animais apresentam a capacidade de reduzir a toxicidade dos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico), através de enzimas e, dessa forma, facilitar sua excreção. Contudo, muitos agentes químicos são resistentes à degradação, fazendo com que ocorra seu acúmulo nos tecidos tornando-os extremamente tóxicos (RANDALL *et al.*, 1996). Além disso, a toxicidade de um determinado composto químico externo pode ser afetada diretamente pelo metabolismo do próprio organismo, podendo ocorrer o processo de desintoxicação (efeito benéfico) ou até mesmo a bioativação do agente (efeito nocivo) (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

No entanto, a simples presença de compostos xenobióticos no meio não pode, de forma isolada, ser um indicador de efeitos prejudiciais. Para isso, relações devem ser estabelecidas em três níveis: grau de exposição externa, níveis internos de contaminação tecidual e efeitos adversos detectados precocemente (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A toxicidade de um metal pesado está em sua biodisponibilidade no meio, ou seja, na quantidade de íons livres que podem se ligar à matéria orgânica (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006). Esta toxicidade pode variar de acordo com a concentração do agente tóxico, no entanto a concentração deste agente no ambiente pode não explicar totalmente a questão de sua toxicidade, uma vez que a quantidade absorvida pelo peixe pode ser modificada pelo mesmo agente tóxico (FRY, 1971).

O Hg é altamente tóxico aos seres vivos, podendo ser facilmente encontrado no meio ambiente, afetando seriamente os animais por prejudicar diversas células, como por exemplo, as renais, os neurônios ou os hepatócitos (FILIPAK NETO, 2007).

Em humanos, a contaminação por metilmercúrio (MeHg) tem como alvo principal as células cerebrais (CLARKSON *et al.*, 2003). Segundo Pickering e Pottinger (1995), exposição a agentes tóxicos desencadeia respostas neuroendócrinas, como por exemplo, a estimulação do sistema simpático-cromafin e do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal.

Um componente importante que age no sistema de defesa do animal é a metalotioneína (MT), encontrada no fígado e em outros tecidos, atuando principalmente como regulador do metabolismo intracelular de Cu e Zn. Essa proteína é rica em cisteína, cuja função é o sequestro de certos metais das famílias IB e IIB (atualmente Grupos 11 e 12 respectivamente), como Cu, Zn, Cd, Hg, impedindo-os de se ligarem a outras proteínas (BRADY, 1982; PICKERING e POTTINGER, 1995).

BIOMARCADORES

Marcadores biológicos, também conhecidos como biomarcadores, são indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras, ou seja, refletem a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, além de indicarem possíveis danos em seu estado inicial, evitando-se que tais efeitos tornem-se irreversíveis (HACON, 2003; MARTINEZ, 2006), sendo divididos em três grupos: os de efeito, de suscetibilidade e de exposição. Os biomarcadores de efeitos são aqueles que podem indicar um componente endógeno, a mensuração da capacidade funcional ou alterações no estado do sistema. Já um marcador biológico de suscetibilidade é um indicador da saúde do sistema, sendo muito sensíveis às exposições por agentes xenobióticos. Por fim, os marcadores de exposição são aqueles que detectam uma substância exógena dentro do sistema, a ligação entre componentes exógenos e endógenos ou qualquer outro evento sistêmico relacionado à exposição (NRC, 1987).

A resolução do CONAMA Nº 357, de 17 de Março de 2005 informa sobre o uso de indicadores ambientais em relação à qualidade dos ambientes aquáticos que pode, quando cabível, ser avaliada por indicadores ambientais, fazendo-se uso de organismos e/ou comunidades aquáticas (BRASIL, 2005).

A fim de avaliar a exposição e os efeitos causados por poluentes ambientais em ecossistemas aquáticos, podem ser citados os seguintes biomarcadores: enzimas fase I, enzimas fase II, parâmetros de estresse oxidativo, proteínas do estresse, metalotioneína parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, neurotóxicos, genotóxicos e, por fim, fisiológicos e morfológicos. Determinadas enzimas são muito utilizadas em pesquisas científicas com função de biomarcadores. Tais enzimas estão associadas à desintoxicação de agentes nocivos e seus metabólitos, ocorrendo com maior frequência no fígado (VAN DER OOST *et al.*, 2003; MARTINEZ, 2006).

Estudos têm apresentado a atuação de biomarcadores como uma boa prática na avaliação ambiental. Tais biomarcadores são divididos em três grupos: os moleculares, os celulares e ao nível de indivíduo. Além disso, tal ferramenta apresenta características importantes, tais como a interação contaminante-organismos vivos e a possibilidade de mensuração de efeitos subletais de xenobióticos (JESUS e CARVALHO, 2008).

Quando se utiliza peixes como fontes de biomarcadores, deve-se levar em consideração que uma variabilidade de respostas fisiológicas básicas é ativada conforme a espécie estudada e a resposta de alguns biomarcadores para agentes tóxicos podem se tornar aparentes, assim como é válido lembrar que certos órgãos são mais suscetíveis que outros, tal

fator também dependerá do tempo de exposição (VAN DER OOST *et al.*, 2003; CAO *et al.*, 2012; SOUID *et al.*, 2013).

No entanto, estudos alertam para o fato de se analisar variáveis não poluentes, uma vez que tais variáveis podem afetar o sistema enzimático, interferindo na resposta dos biomarcadores, principalmente quando as variáveis não são totalmente analisadas ou controladas. São exemplos dessas variáveis: comportamento, sexo, idade, período reprodutivo, estágio de desenvolvimento, densidade populacional, atividade metabólica, dentre outras (NRC, 1987; VAN DER OOST *et al.*, 2003). A fim de se entender melhor, quando são analisados os períodos de pré e pós-exposição a algum agente, podem ocorrer interpretações conflitantes acerca do significado ecológico dos efeitos desta exposição, mas quando são analisados os processos que regulam a população (crescimento, fecundidade, densidade populacional) a aparente inconsistência passa a ser melhor compreendida (POWER e McCARTY, 1997).

Por isso, o uso de biomarcadores para avaliar o risco ambiental necessita de cuidados especiais, uma vez que várias substâncias podem afetar o mesmo biomarcador, além de que as relações entre respostas entre biomarcadores e os efeitos em nível de populações naturais não são bem definidas. É devido a essas limitações que se deve ter cuidado em definir condições de referência (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

DEFESAS ANTIOXIDANTES

Hermes-Lima (2004) expõe que praticamente todas as formas de vida possuem algum sistema de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, e este sistema pode ser dividido em:

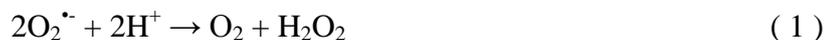
- Defesa primária enzimática ou não enzimática;
- Defesa auxiliar, servindo de base à defesa primária;
- Complexo de proteínas/enzimas metálicas e compostos de baixo peso molecular, que atuam na prevenção ou minimização de metais pesados na geração de radicais livres;
- Sistema e restauração enzimática que repara biomoléculas danificadas por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.

Radicais livres são produzidos de forma natural pelo organismo. No entanto, em certos casos esse equilíbrio pode ser afetado, levando a perturbações no balanço redox, podendo ocasionar alterações químicas em proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, que são

percebidas pelo sistema com a ativação de defesas via *feedback* (SLATER, 1984; LUSHCHAK, 2011). Tais defesas podem ser classificadas em enzimáticas e não enzimáticas, ou ainda como antioxidantes de pouca e elevada massa molecular. São exemplos de enzimas que auxiliam na defesa contra o estresse oxidativo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST) e glutathiona redutase (GR) (WINSTON, 1991; DOYOTE *et al.*, 1997; PARIHAR *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 2000; DEATON e MARLIN, 2003; VINCENT *et al.*, 2007; LUSHCHAK, 2011; ASSIS *et al.*, 2013). Já como exemplos de defesas não enzimáticas, temos a glutathiona (GSH), o ascorbato (Vitamina C), o alfa-tocoferol (Vit. E), o retinol (Vit. A) e o beta-caroteno (WINSTON, 1991; DOYOTTE *et al.*, 1997; DEATON e MARLIN, 2003; RODRIGO *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2000; LUSHCHAK, 2011; ASSIS *et al.*, 2013).

Esse sistema de defesa, mesmo apresentando um objetivo único (proteção contra o estresse oxidativo), apresenta certa peculiaridade, ou seja, as enzimas apresentam certas funções específicas que podem ser apenas parcialmente substituídas por outra defesa antioxidante. Logo, mesmo ocorrendo compensação por outras enzimas pela falta de uma atividade enzimática, isso não, necessariamente, impede que ocorra estresse oxidativo (BAGNYUKOVA *et al.*, 2005a, b).

A função da enzima SOD é catalisar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), tendo como produto oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [reação (1)]. Com a produção de H_2O_2 , entra em ação a CAT, cuja função é metabolizar aquele composto em água e oxigênio molecular [reação (2)]. Tendo a GSH como co-fator, a GPx catalisa hidroperóxidos orgânicos (L-OOH) e H_2O_2 em H_2O [reações (3) e (4)]. Já a GST catalisa o complexo GSH+xenobiótico produzindo o radical GSH [reação (5)] (RAMOS *et al.*, 2000; HERMES-LIMA, 2004; MARTINEZ, 2006).



O principal objetivo das enzimas antioxidantes, como por exemplo, SOD, CAT, GPx e GR, é a defesa do organismo frente às espécies reativas de oxigênio (ERO), fazendo com que aconteça a desintoxicação dos radicais livres em moléculas não-reativas (VAN DER OOST *et*

al., 2003; MARTINEZ, 2006). Exemplo deste mecanismo de defesa é o estudo realizado por Filipak Neto (2007), no qual o autor observou que hepatócitos de *Hoplias malabaricus* ativaram mecanismos de defesa antioxidantes (CAT e GST) na tentativa do organismo reestabelecer o balanço redox. Todavia, a atividade enzimática parece estar diretamente relacionada com o tipo de tecido analisado (SAMPAIO *et al.*, 2010), além de que dependerá de fatores abióticos como, por exemplo, salinidade e exposição à metais (BAYSOY *et al.*, 2012).

Por se tratar de um sistema complexo e sujeito à influência de diversos fatores externos e internos, um organismo pode reagir de diversas formas. Um exemplo disso são os resultados obtidos por Wilhelm Filho *et al.* (2001) que demonstram uma relação de dependência direta entre SOD, GST, glutatona total e danos histológicos, haja vista que estas enzimas não apresentaram atividade significativa.

Dentre as enzimas que participam do mecanismo de defesa, o aumento da atividade da SOD pode ser avaliado com um potencial causador de estresse oxidativo, visto que este produz H_2O_2 , quando os níveis de outras enzimas (CAT e GPx, principalmente) não encontram-se em níveis considerados normais (VAN DER OOST *et al.*, 2003; OBA, 2006).

Já GPx tem como função a catálise da biotransformação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e concomitantemente a redução de GSH em GSSG, sua forma oxidada, além de atuar na proteção da membrana celular contra peroxidação lipídica (VAN DER OOST *et al.*, 2003; OBA, 2006). A GSH apresenta um papel essencial na desintoxicação, como um mecanismo de resposta a xenobióticos, além de participarem na síntese de proteína e de prostaglandina (VAN DER OOST *et al.* 2003).

De acordo com Oba (2006), mecanismos antioxidantes aparentemente trabalham de forma sinérgica, favorecendo o bem estar do animal frente às condições de estresse oxidativo. No entanto, em ambiente natural não há como suplementar a dieta dos peixes permitindo preparo para ação para situações de desafio que possam ocorrer, dependendo os animais exclusivamente de sua adaptação.

Além das condições apresentadas para uma resposta adaptativa adequada do organismo, aparentemente, o tempo e o nível de poluente ao qual o peixe foi exposto parece determinar o tipo de resposta em relação às enzimas de biotransformação e aos antioxidantes ativados por eles, sendo que tal resposta dependerá das condições funcionais de órgãos e tecidos responsáveis por tais incumbências (WILHELM FILHO *et al.*, 2001).

Além das defesas citadas anteriormente, a atividade enzimática da colinesterase (CHE) também pode ser utilizada na avaliação da saúde de peixes. Esta enzima está presente em

vertebrados e invertebrados, sendo de dois tipos: acetilcolinesterase (ACHE) e butirilcolinesterase (BCHE), presentes nos tecidos cerebral e muscular (MASSOULIÉ e TOUTANT, 1988; STURM *et al.*, 1999; BONACCI *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2011). Esta enzima também está presente na regulação da acetilcolina nas fendas sinápticas (VAN DER OOST *et al.*, 2003), catalisando sua hidrólise em colina e ácido acético.

Estudos têm demonstrado a ação de pesticidas na atividade enzimática da ACHE. As ações destes poluentes, muitas vezes de forma sinérgica, inibem a atividade da ACHE cerebral, podendo afetar o crescimento, sobrevivência, promovendo distúrbios de coordenação, diminuição da velocidade de natação, perda do reflexo de equilíbrio, além de ocasionar anomalias comportamentais, como por exemplo, alterações dos comportamentos alimentar ou reprodutivo e, em altas concentrações, pode ocasionar a morte, mas esse fator dependerá da condição fisiológica do animal (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; KOZLOVSKAYA e MAYER, 1984; PAVLOV *et al.*, 1992; DEMBÉLÉ *et al.*, 2000; BEAUVAIS *et al.*, 2001; DUTTA e ARENDS, 2003; JUNG *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2008). Todavia, a própria acetilcolina em excesso pode causar inibição da atividade da ACHE (MASSOULIÉ e TOUTANT, 1988).

Quando ocorre a inativação desta enzima, por exemplo, pela ação de algum organofosforado ou de um éster carbamato, o nível de acetilcolina permanece alterado, ocorrendo contínuos estímulos no músculo ou nas fibras nervosas, com conseqüente exaustão e tetania (FUKUTO, 1990). Contudo, quando se trata de análises com espécimes provenientes de ambientes naturais, a redução dos níveis de ACHE pode se dar em decorrência à ação de outros agentes neurotóxicos (STURM *et al.*, 1999), uma vez que neste tipo de estudo não há como ter um ambiente controlado.

Pesticidas organofosforados são comumente aplicados em empreendimentos agrícolas. No entanto, quando tais empreendimentos estão próximos de cursos d'água, podem causar sua contaminação e, conseqüentemente, toxicidade aguda ou crônica nos organismos aquáticos (BOONE e CHAMBERS, 1996), no entanto, um fator interessante é que não ocorre especificidade da inibição de CHE por parte dos pesticidas (ASSIS *et al.*, 2011), ou seja, vários agentes exógenos podem interferir na atividade desta enzima.

A ação aguda de produtos organofosforados pode inibir em torno de 70-80% a atividade cerebral ou muscular de CHE ou ACHE em peixes e, dependendo da espécie, inibições acima de 50% podem ocasionar a morte do animal, sendo que peixes aparentam possuir grandes reservas de ACHE, além de que uma mínima quantidade desta enzima possa manter a vida (COPPAGE e MATTHEWS, 1974; KOZLOVSKAYA e MAYER, 1984;

BOONE e CHAMBERS, 1996). Chandrasekara e Pathiratne (2007) sugerem que o comprimento do corpo de *Oreochromis niloticus* deva ser considerado quando se utiliza a atividade de ACHE cerebral como biomarcador, visto que animais maiores apresentaram menor inibição quando comparado com peixes menores expostos a pesticidas.

A ação do metil paration, principal composto ativo de inseticidas, inibe de forma severa a atividade da ACHE no cérebro, ocasionando ausência de estímulos, redução da natação, além de falta parcial de reflexos. No entanto, ACHE não apresenta a mesma importância para os peixes como é para outros animais, como mamíferos (AGUIAR *et al.*, 2004).

A ACHE é de grande importância para a sobrevivência do animal, uma vez que sua atividade está ligada ao posicionamento, evasão e orientação alimentar do peixe (BEAUVAIS *et al.*, 2001; DUTTA e ARENDS, 2003). Inibição severa de ACHE pode ser considerada como um evento que antecede a morte de peixes. Logo, a quantificação da atividade desta enzima pode ser utilizada para avaliar o grau de contaminação no organismo (AGUIAR *et al.*, 2004).

Existem duas formas de se estudar o monitoramento de xenobióticos, *in vivo* ou *in vitro*. A primeira tem como vantagem a sinalização da inibição de CHE após dias ou semanas da exposição, mesmo que a quantidade do agente seja mínima; já a segunda tem como vantagem a precisão da ação do agente exógeno e sua consequente ação inibitória, além de evitar o contato dos pesticidas e complexos desintoxicantes (ASSIS *et al.*, 2011).

Diversos estudos utilizaram o tecido cerebral como parâmetro na avaliação da ação de compostos xenobióticos na atividade enzimática da CHE (BEAUVAIS *et al.*, 2001; DUTTA e ARENDS, 2003; AGUIAR *et al.*, 2004). A utilização de tecido muscular para quantificação da atividade de CHE tem sido proposta por apresentar facilidade na coleta, sensibilidade, além da maior quantidade de material (RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2004).

Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot (2004) chamam atenção quanto ao uso de CHE como biomarcador em estudos de monitoramento, visto que o estudo realizado com quantificação da atividade desta enzima em tecido cerebral, hepático e muscular de *O. niloticus* demonstrou que os dois últimos tecidos apresentam características enzimáticas diferentes entre os peixes teleósteos.

De acordo com Jung *et al.* (2007) no estudo com *Limanda yokohamae*, observou uma possível variação sazonal na inibição de ACHE e BCHE por fungicidas, mas não deixando claro se tais mudanças ocorrem por fatores endógenos ou através de alterações ambientais.

Na Amazônia, muitas famílias utilizam a biota dos rios e seus tributários como fonte de sustento. Isto ocorre nos quatro locais de coleta de peixe do presente estudo. Dessa forma, a avaliação da saúde dos peixes torna-se muito importante por contribuir para uma melhor caracterização dos animais nos locais estudados.

Este estudo teve o intuito de contribuir para uma melhor caracterização dos serviços ambientais prestados na Floresta Estadual do Amapá (FLOTA/AP), somando com outros estudos inseridos no projeto “Estudo da potencial contribuição dos serviços ambientais no módulo 4 da Floresta Estadual do Amapá – FLOTA/AP para o desenvolvimento sustentável local e regional” que tratam, dentre outros assuntos, da questão da provisão, qualidade e valorização da água na bacia do Rio Cassiporé.

2 HIPÓTESES

- Quanto maior a proximidade do ponto amostral com a fonte de contaminação por efluentes da atividade garimpeira, maior será o nível das variáveis bioquímicas da ictiofauna.
- Peixes coletados na estação com menor índice de chuvas tendem a apresentar maior variação bioquímica em decorrência da maior concentração por agentes exógenos.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a condição de saúde da ictiofauna da bacia do Rio Cassiporé, através de biomarcadores bioquímicos.

ESPECÍFICOS

- Determinar o nível das variáveis bioquímicas da ictiofauna presente na bacia do Rio Cassiporé.
- Avaliar a influência sazonal sobre a homeostase dos peixes do Rio Cassiporé.

4 MATERIAL E MÉTODOS

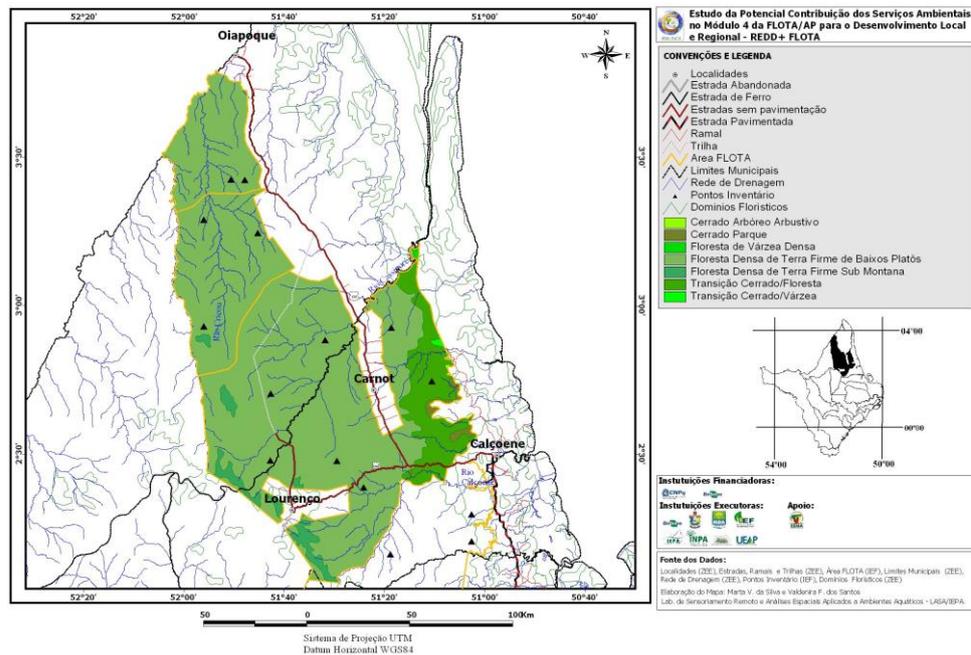
COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas em dois períodos distintos no ano de 2012: uma no final do período chuvoso (Julho), onde o nível das águas dos rios está elevado, e outra no final do período seco (Novembro), onde as águas atingem seu menor nível, em quatro pontos de coleta localizados no entorno do módulo IV da Floresta Estadual do Amapá (Figura 1).

Em cada ponto de amostragem foram utilizados diversos apetrechos para que fosse possível a captura de espécies variadas, assim como a captura de indivíduos de diferentes níveis tróficos. Para isso, caniços, linhas de mão, redes de variadas malhas (35, 40 e 50) de diversos tamanhos (20, 75 e 100 m), além de tarrafas foram utilizados. As redes ficaram aproximadamente 10 h dentro d'água, sendo verificadas a cada 2 h para que não houvesse risco de perda de indivíduos, principalmente, por predação.

Os indivíduos capturados, em todos os pontos amostrais, foram acondicionados em caixa térmica com gelo, sendo pesados e medidos (comprimento total e padrão). Amostras do cérebro, fígado e músculo foram coletadas e devidamente etiquetadas com o local da coleta, nome popular do peixe e o tipo de tecido, acomodados em gelo e transportados até o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá, onde foram armazenadas em freezer a -20 °C, para posterior análise.

Figura 1: Localização do Módulo IV da Floresta Estadual do Amapá, Estado do Amapá, Brasil.

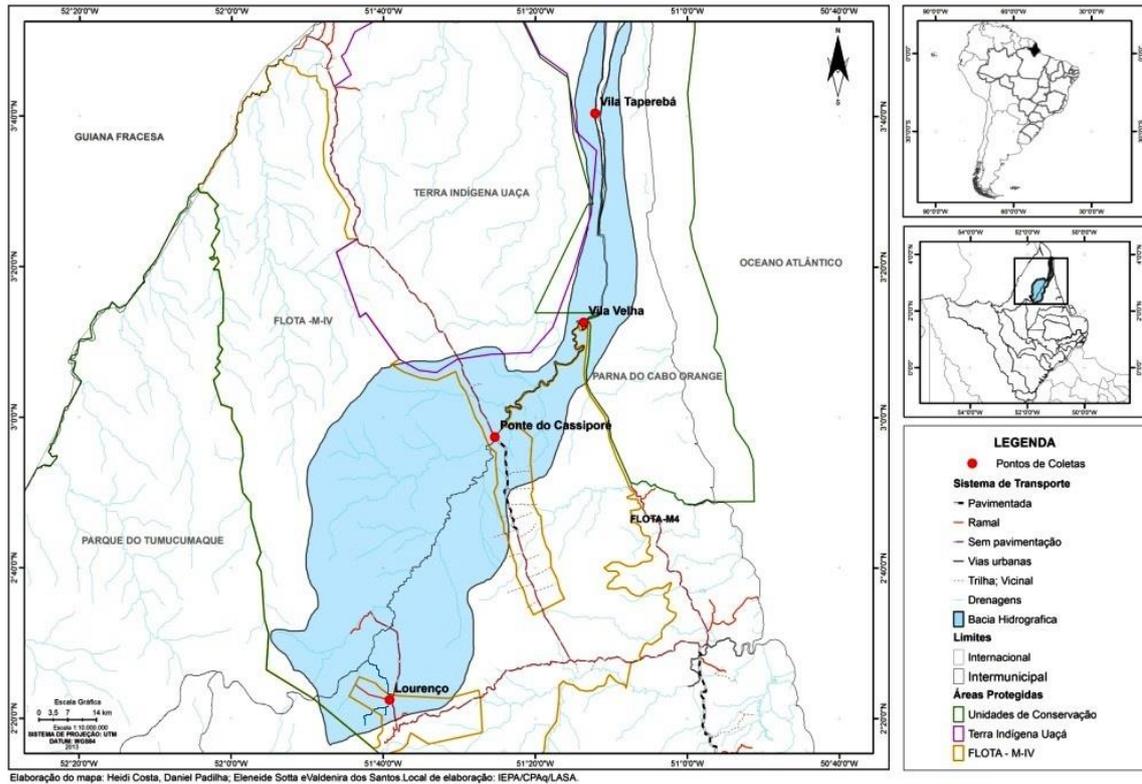


Fonte: Cedido por Marta V. da Silva e Valdenira F. dos Santos. Lab. de Sensoramento Remoto e Análises Espaciais Aplicadas a Ambientes Aquáticos – LASA/IEPA (2012).

LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS PONTOS DE COLETA

Os quatro pontos de coleta foram definidos a fim de se avaliar a variação do possível impacto causado pela liberação de efluentes de atividade mineradora lançados diretamente na malha hidrográfica (Figura 2).

Figura 2: Pontos de amostragem da ictiofauna em rios presentes no entorno do Módulo IV da Floresta Estadual do Amapá, Estado do Amapá, Brasil.



Fonte: Heidi Costa, Daniel Pandilha, Eleneide Sotta e Valdenira dos Santos. IEPA/CPAq/LASA (2013).

O primeiro ponto, denominado “Lourenço”, está situado no encontro entre o igarapé Elic com o Rio Reginá (Figura 3). Este recebe a maior quantidade de rejeitos lançados pela atividade garimpeira. Este rio apresenta porte médio, com largura de aproximadamente 20 m. É notável uma grande quantidade de sólidos suspensos na coluna d’água, fazendo com que ocorra assoreamento, com formação de pequenas praias no meio do rio e em seu leito.

Figura 3: Encontro entre o igarapé Elic com o Rio Reginá. (a) Final do período chuvoso; (b) Período seco.



Foto: D. Pandilha (2012).

O segundo ponto, denominado “Ponte” (Figura 4) está localizado às proximidades da ponte que atravessa o Rio Cassiporé (Km 470 da BR-156). Este ponto amostral possui, aproximadamente, 60 m de largura e pouca quantidade de sólidos suspensos na coluna d’água.

Figura 4: Ponto de coleta no Rio Cassiporé, próximo à BR-156. (a) Final do período chuvoso; (b) Final do período seco.

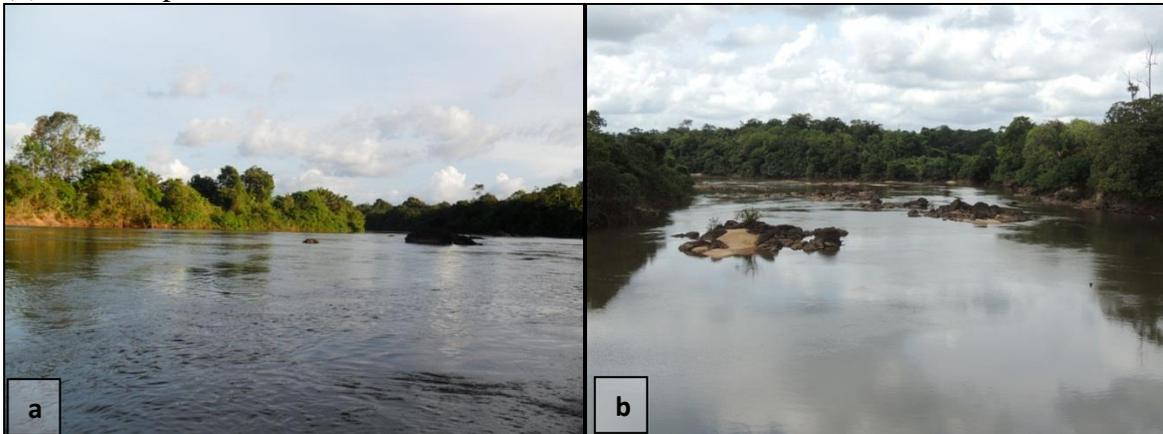


Foto: D. Pandilha (2012).

O terceiro ponto (Figura 5a) foi denominado “Vila Velha”, devido à proximidade com a comunidade de mesmo nome. Nesta localidade pode ser observada a ação do ciclo das marés (cheia e vazante).

O quarto ponto de coleta (Figura 5b) foi denominado “Vila Taperebá”, devido à proximidade com a comunidade de mesmo nome, localizado na foz do Rio Cassiporé, em uma área que está dentro dos limites do Parque Nacional do Cabo Orange. Esta área está

sobre ação direta do ciclo das marés, ocorrendo, inclusive, o fenômeno da pororoca. Estas características influenciam na quantidade de sólidos suspensos na água.

Figura 5: Locais de amostragens próximos as Comunidade Vila Velha (a) e Vila Taperebá (b).

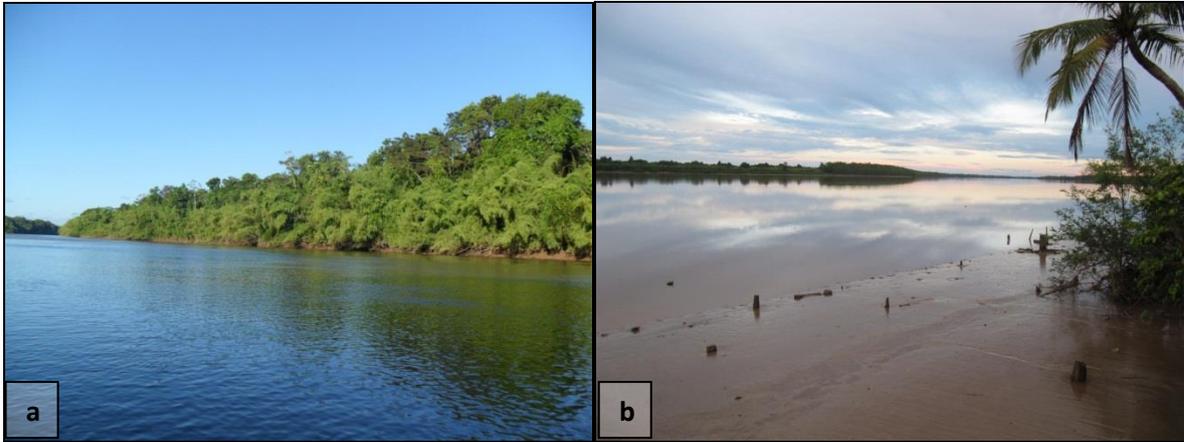


Foto: R. Silva (2012).

METODOLOGIA DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental, no Departamento de Farmacologia (Centro Politécnico), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.

PREPARO DAS AMOSTRAS PARA BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Para a quantificação da MT foram utilizados fígados de 66 peixes (15 espécies) coletados, dos quais 30 e 36 foram capturados nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. Na quantificação das atividades enzimáticas (GST, SOD, CAT, GPx) e o nível de LPO e GSH, foram utilizados cérebros de, aproximadamente, 85 peixes (20 espécies) coletados, dos quais 38 e 47 foram capturados nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. A lista das espécies capturadas está presente no Anexo I.

A determinação da atividade de ACHE foi realizada em tecido muscular de 104 peixes (21 espécies) coletados nos quatro pontos de coleta definidos, dos quais 40 e 64 foram capturados nos períodos chuvoso e seco, respectivamente.

As amostras de tecidos foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (em pH 7,0 para tecidos cerebral e hepático; em pH 7,5 para tecido muscular) e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4 °C, sendo o tecido muscular a 10.000 g por 20

min., e os tecidos hepático e cerebral a 15.000 g por 30 min., com obtenção do sobrenadante. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação da concentração de proteína total, de LPO e de GSH e das atividades das enzimas do estresse oxidativo como SOD, CAT, GST e GPx. Tais alíquotas foram, então, congeladas a -80 °C até o momento das análises, sendo realizada a análise de cada amostra em triplicata.

PROTEÍNA TOTAL

Em todas as amostras (cérebro, fígado e músculo) o nível de suas proteínas foi quantificado, seguindo a metodologia proposta por Bradford (1976), sendo 10 µL do sobrenadante adicionados a 250 µL de Comassie blue (reagente de Bradford) em microplaca, sendo após dois minutos realizada a leitura de absorbância a 620 nm.

ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

As análises desta enzima foram realizadas de acordo com Crouch *et al.* (1981). O sobrenadante foi descongelado, sendo adicionado etanol (resfriado a -20 °C), de forma que a amostra contivesse 20% de etanol.

Foram adicionados 20 µL da amostra na microplaca, posteriormente 70 µL de NBT (cloreto de azul de nitrotetrazólio) (MM = 817,64 g.mol⁻¹), EDTA (MM = 336,21 g.mol⁻¹) finalizando com 110 µL de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) e hidroxilamina (67 mM) foram adicionados para iniciar a reação. A leitura deu-se a 560 nm em espectrofotômetro durante 30 min., com intervalos de 5 min. entre cada leitura. A atividade de SOD é expressa em U.mg de proteína⁻¹.min⁻¹.

ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

As análises desta enzima foram realizadas de acordo com Aebi (1984). Em 10 µL de amostra foram adicionados 990 µL de meio de reação (2,5 mL de Tampão Tris-base (NH₂C(CH₂OH)₃ (hidroximetilaminometano, MM 121,14, 0,4 M, pH 8,9)); 47,4 mL de água deionizada; para 20 mM - 114 µL H₂O₂ 30%) em cubeta de quartzo e misturados por inversão. Em seguida as leituras de absorbância foram realizadas a 240 nm por 1 min. A atividade da enzima é expressa em m mol.mg prot⁻¹.min⁻¹.

ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

Esta análise foi realizada de acordo com Keen *et al.* (1976), com modificações. Soluções de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5), solução de GSH (MM = 307,3 g.mol⁻¹; homogeneizar 20 mM em tampão fosfato) e solução de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, MM = 202,55 g.mol⁻¹) foram utilizadas como meio de reação. Inicialmente foram adicionadas 20 µL de amostra em microplaca e mais 180 µL de meio de reação, sendo realizada a leitura de absorbância a 340 nm durante 2 min., a cada 12 s. A atividade da enzima está expressa em nmol.mg de proteína⁻¹.

ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Em tubos de ensaio, a 10 µL da amostra foram acrescentados 130 µL de meio de reação, aguardando 2 min. O meio de reação é composto por duas soluções, a solução 1 contendo: tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0; azida sódica (a 3,07692 mM (para inibir a atividade da catalase; [final] = 2 mM); NADPH a 0,307692 mM ([final] = 0,2 mM); GSH a 3,07692 mM ([final] = 2 mM); Glutationa Redutase (GR) a 1,5384 U/mL ([final] = 1 U/mL); e solução 2 contendo: Solução de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ a 5 mM ([final] = 1,5 mM) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0.

Acrescentou-se 60 µL de solução com peróxido de hidrogênio em cada amostra, realizando-se a leitura de absorbância a 340 nm durante 2 min., com intervalos de 10 s entre cada leitura. A atividade da enzima é expressa em nmol.mg de proteína⁻¹.

NÍVEL DE GLUTATIONA (GSH)

Metodologia baseada em Sedlak e Lindsay (1968). Após o descongelamento da amostra, procedeu-se sua centrifugação (10 min. a 10.000 g em 4°C) com tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5), sendo retirado 200 µL do sobrenadante e adicionado 50 µL de ácido tricloroacético (TCA 50%), agitado em vórtex e centrifugado novamente por 10 min. a 10.000 g em 4°C. Pipetou-se 50 µL do sobrenadante, acrescentando-se 230 µL de tampão Tris-base e, em seguida, adicionado 20 µL de DTNB (2,5 mM). A leitura foi realizada após 1 min. a 405 nm. O resultado é expresso em µg GSH.mg de proteína⁻¹.

NÍVEL DE LIPOPEROXIDAÇÃO OU PERÓXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

Análise seguindo a metodologia de FOX (Ferrous Oxidation by Xylenol Orange Method) (JIANG *et al.*, 1991, 1992). Para o preparo do meio de reação foram adicionados na seguinte ordem: 47,87 mL de metanol PA, 0,0038 g de xilenol orange em 0,5 mL de água destilada, 125 µL de H₂SO₄ (98%), 0,0441 g de BHT (butil hidroxitolueno) em 1 mL de metanol PA e 0,0049 g de FeSO₄NH₄ em 0,5 mL de água. Cada amostra foi homogeneizada na proporção de 1:10 em metanol, sendo centrifugada a 10.000 g por 30 min., a 4°C. Retirou-se 30 µL do sobrenadante adicionando-se 270 µL do meio de reação. Após 30 min., realizou-se uma nova leitura a 560 nm. A concentração de LPO está expressa em µmol.µg de hidroperóxido⁻¹.

NÍVEL DE METALOTIONEÍNA (MT)

Nas amostras de fígado foi quantificada a metalotioneína, de acordo com Viarengo *et al.* (1997, com modificações). As amostras foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,6) com 500 mM de sacarose resfriado a -20°C e centrifugadas a 15.000 g por 30 min., 4°C.

Ao retirar o sobrenadante, adicionou-se 342 µL de solução contendo 18,6 mL de etanol absoluto e 1,4 mL de clorofórmio. Centrifugou-se a 6.000 g por 10 min. a 4°C. Ao término da segunda centrifugação, transferiu-se 490 µL do sobrenadante para um microtubo contendo 1500 µL da solução de 78,26 mL de etanol absoluto e 1,74 mL de HCl concentrado (~37%) e agitou-se para homogeneizar. Esta mistura foi mantida em -20°C por 1 hora, sendo centrifugada a 6.000 g por 10 min. a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado é misturado a 1.000 µL da solução contendo 47,85 mL de etanol absoluto, 0,55 mL de clorofórmio e 6,6 mL de tampão Tris-HCl a 20 mM e agitada para homogeneizar e novamente centrifugada a 6.000 g por 10 min a 0-4 °C, descartando-se novamente o sobrenadante e adicionando-se 50 µL de solução de EDTA sódico (EDTA a 4 mM + HCl a 1 M), agitando para homogeneizar a amostra, adicionando-se 1.000 µL de solução de Ellman (tampão fosfato de sódio + NaCl + DTNB + tampão fosfato-NaCl) para novamente ser centrifugado a 3.000 g por 5 min.

Posteriormente, adicionou-se 200 µL do sobrenadante em microplacas e fez-se a leitura da absorbância a 412 nm. Os resultados estão apresentados em µg.mg de proteína⁻¹.

ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

Na amostra de músculo foi quantificada a atividade da acetilcolinesterase baseado em Ellman *et al.* (1961) com modificações.

Na microplaca, inicialmente foram adicionados 50 µL de cada amostra. Em seguida, 200 µL de DTNB (0,75 mM) e finalizou-se com a adição de 50 µL de acetilcolina (MM = 289,18 g.mol⁻¹), sendo medida a absorbância a 405 nm durante 4 min., com intervalos de 30 s entre cada leitura. Os resultados são apresentados em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados por medição do pH e do oxigênio dissolvido em conjunto com a temperatura da água, em cada ponto amostral, realizado com o auxílio de aparelhos digitais apropriados para cada finalidade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo o resultado considerado normal ($p > 0,05$), aplicou-se teste paramétrico ANOVA one way; caso contrário ($p < 0,05$) aplicou-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; estes testes foram aplicados para saber quais grupos eram diferentes entre si (períodos chuvoso e seco e entre pontos de coleta), com utilização do Teste de Tukey ou Método de Dunn na comparação das médias após teste paramétrico ou não paramétrico respectivamente. Para os testes, o nível de significância foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fígado é um dos principais órgãos acumuladores de xenobióticos, uma vez que este órgão está envolvido em diversos processos de desintoxicação, no qual ocorre a transformação do composto em metabólitos hidrofílicos para que ocorra sua excreção (BRADY, 1982; CHOVANEC *et al.*, 2003), apresentando-se grande importância na exposição subaguda aos metais, através de análises de MT presente neste órgão (OVERNELL *et al.*, 1987).

No entanto, diversos fatores tais como idade, nutrição, estresse ambiental e a própria variação normal podem afetar os níveis de MT hepático (HIDALGO *et al.*, 1988), sendo válido lembrar que o fígado pode se tornar vulnerável frente à produção em excesso de radicais livres (CAO *et al.*, 2012).

Metais, como por exemplo, Cd, Hg, Zn e Cu, podem induzir a produção de tioneína com consequente formação de metalotioneína (HAMILTON e MEHRLE, 1986; HIDALGO *et al.*, 1988; CHOVANEC *et al.*, 2003). Diversos estudos tem demonstrado a importância da MT como indicadora de condições agudas e/ou crônicas enfrentadas pelos peixes, contudo deve-se ter cautela nas interpretações dos dados (HAMILTON e MEHRLE, 1986), uma vez que a relação causa-efeito proporcionado por xenobióticos é complexa.

Os resultados relacionados à MT nos pontos de coleta nos dois períodos estão presentes na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios (\pm desvio padrão) da concentração de metalotioneína ($\mu\text{g.mg}$ de proteína⁻¹) hepática, no ano de 2012.

Análise	Localidade	Período		Nº de peixes	Nº de espécies
		Chuvoso	Seco		
MT	Lourenço	60,09 (\pm 30,52) ^a	161,26 (\pm 127,79) ^a	6	4
	Ponte	275,02 (\pm 369,92) ^{ac}	368,66 (\pm 270,59) ^a	24	6
	Vila Velha	369,32 (\pm 217,14) ^{bc}	930,81 (\pm 806,46) ^{*a}	22	5
	Vila Taperebá	277,77 (\pm 80,02) ^{bc}	344,57 (\pm 144,02) ^a	14	4

* Indica diferença significativa entre períodos (chuvoso e seco) no mesmo ponto de coleta ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 2 contém os resultados obtidos com relação aos dados biométricos dos peixes capturados no presente estudo.

Tabela 2 - Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e do peso (g) de peixes coletados para concentração de metalotioneína ($\mu\text{g.mg}$ de proteína⁻¹) hepática, no ano de 2012.

Análise	Localidade	Chuvoso		Seco	
		Cp	Peso	Cp	Peso
MT	Lourenço	8,25 (\pm 0,70)	19,65 (\pm 7,79)	8,00 (\pm 0,70)	17,25 (\pm 7,84)
	Ponte	13,68 (\pm 2,52)	51,58 (\pm 20,39)	15,35 (\pm 5,47)	114,30 (\pm 131,96)
	Vila Velha	18,04 (\pm 8,09)	280,60 (\pm 252,46)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	33,43 (\pm 13,07)	921,23 (\pm 1170,06)	43,41 (\pm 5,36)	1348,41 (\pm 514,72)

No presente estudo, o ponto Lourenço não apresentou variação estatística significativa entre períodos, apesar de que no período seco havia indícios de realização de prospecção próxima ao local de coleta dos peixes, o que poderia explicar o aumento dos níveis de MT em peixes coletados nesse período, além de que a diminuição do nível d'água poder contribuir para este resultado.

A relação significativa entre os pontos Lourenço x Vila Velha e Lourenço x Vila Taperebá no período chuvoso está relacionada com o baixo nível de MT quantificado nos peixes de Lourenço (75% apresentaram MT < 50 $\mu\text{g.mg}$ de proteína⁻¹) em relação aos outros dois pontos (75% e 87% de peixes com MT > 230 $\mu\text{g.mg}$ de proteína⁻¹, respectivamente). Fatores que possibilitem o melhor entendimento acerca do motivo dessa disparidade entre esses pontos de coleta devem ser avaliados em estudos futuros.

Hyllner *et al.* (1989), em experimento com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram aumento dos níveis de MT em hepatócitos expostos a Zn em ambientes cuja temperatura foi aumentada (6 °C para 9 °C). As populações desta espécie de truta apresentam ampla distribuição no mundo, mas são caracterizadas por pertencerem a regiões de água fria (MACCRIMMON, 1971; GHOMI *et al.*, 2012; RÄSÄNEN *et al.*, 2012).

Neste trabalho, por se tratar de espécies tropicais, o fator temperatura, aparentemente, não teve muita influência sobre a síntese de MT, apesar da única variação significativa, desta proteína, entre períodos (Vila Velha) ser semelhante da observada por Hyllner *et al.* (1989). Em experimentos realizados com ratos, fatores estressantes, dentre eles a temperatura, apresentaram maior influência na ligação entre MT e Zn no fígado, sendo que o tratamento de estresse por frio foi mais atuante quando comparado com o tratamento com calor (OH *et al.*, 1978).

Outro fator que pode influenciar o aumento da síntese de MT no fígado é a reprodução, uma vez que a síntese de vitelogenina, que é produzida no fígado, poderia induzir

a síntese de várias outras substâncias, incluindo proteínas, no caso a metalotioneína (OVERNELL *et al.* 1987; POVLSEN *et al.*, 1990; RIGGIO *et al.*, 2003). De acordo com Riggio *et al.* (2003), tal característica se deve ao fato de que metais essenciais (Zn e Cu) são carregados por MT com a finalidade de atuar no desenvolvimento dos oócitos. No entanto, a contaminação de peixes, principalmente fêmeas, por metais pode ser prejudicial ao crescimento vitelogênico no ovário, uma vez que poderá haver sobrecarga metabólica hepática com a síntese de MT em conjunto com a vitelogênese (POVLSEN *et al.*, 1990). No presente estudo, do total de peixes coletados em Vila Velha no período seco, 20% das fêmeas estavam em estágio de maturação gonadal B, 40% em estágio C e 10% em estágio D. Segundo Vazzoler (1996) o estágio de maturidade gonadal é dividida em quatro classes: A (imaturo), B (em maturação), C (maduro) e D (desovado). Dessa forma, com base nos dados obtidos pode-se considerar que o fator reprodução pode ter influenciado os valores de MT. Todavia, a fim de corroborar tais resultados, são necessários estudos complementares relacionados ao grau de contaminação de metais na água.

A síntese de MT, também, pode estar associada com fatores comumente utilizados como indicadores de estresse, uma vez que exposição de hepatócitos ao principal esteróide indicador de stress (cortisol) resultou em aumento dos níveis desta proteína (OH *et al.*, 1978; HIDALGO *et al.*, 1988; HYLLNER *et al.*, 1989). Além disso, fatores bióticos ou abióticos, assim como fatores endógenos ou exógenos, podem influenciar na regulação de MT (HYLLNER *et al.*, 1989). Todavia, de acordo com Brady (1982), os metais possuem maior capacidade na indução de MT se comparado com glicocorticoides.

É necessário cautela ao se utilizar a MT como biomarcador, já que em populações naturais, essa proteína pode ser rapidamente induzida por vários fatores, tais como: variação sazonal, temperatura da água, tecido, hormônios, estresse, citocinas, dentre outras (KNAPEN *et al.*, 2007; SHARIATI e SHARIATI, 2011).

Os resultados obtidos de LPO, GST, SOD, GPx e GSH são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios (\pm desvio padrão) de peroxidação lipídica (LPO em μmol hidroperóxido.mg de proteína⁻¹), das atividades da glutatona S-transferase (GST em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), do superóxido dismutase (SOD em U.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), da glutatona peroxidase (GPx em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), e da concentração de glutatona ([GSH]= μg . mg de proteína⁻¹) em tecido cerebral, no ano de 2012.

Análises	Localidade	Período		Nº de Peixes	Nº de Espécies
		Chuvoso	Seco		
LPO	Lourenço	-	-	-	-
	Ponte	1,88 (\pm 1,48) ^a	3,40 (\pm 0,76) ^{*a}	17	6
	Vila Velha	1,83 (\pm 0,82) ^a	4,80 (\pm 3,26) ^{*a}	22	5
	Vila Taperebá	2,45 (\pm 2,38) ^a	4,22 (\pm 0,97) ^a	12	3
GST	Lourenço	82,75 (\pm 39,02) ^a	36,59 (\pm 11,75) ^{*a}	15	6
	Ponte	29,40 (\pm 12,32) ^{ac}	20,21 (\pm 9,40) ^{ac}	26	6
	Vila Velha	40,06 (\pm 34,77) ^{ac}	23,09 (\pm 13,53) ^{ac}	22	5
	Vila Taperebá	25,39 (\pm 17,52) ^{bc}	11,37 (\pm 3,27) ^{*bc}	13	4
SOD	Lourenço	8,63 (\pm 2,13) ^a	1,50 (\pm 0,98) ^{*a}	16	7
	Ponte	7,45 (\pm 2,24) ^a	2,55 (\pm 1,60) ^{*a}	26	6
	Vila Velha	8,86 (\pm 3,84) ^a	2,48 (\pm 0,93) ^{*a}	22	5
	Vila Taperebá	7,93 (\pm 1,54) ^a	2,04 (\pm 1,67) ^{*a}	13	4
GPx	Lourenço	645,46 (\pm 255,73) ^a	859,40 (\pm 194,80) ^a	20	7
	Ponte	596,90 (\pm 123,29) ^a	1232,61 (\pm 528,21) ^{*a}	27	6
	Vila Velha	610,25 (\pm 144,38) ^a	906,15 (\pm 262,56) ^{*a}	22	5
	Vila Taperebá	486,63 (\pm 59,70) ^a	1004,40 (\pm 204,79) ^{*a}	14	4
GSH	Lourenço	8,86 (\pm 3,04) ^a	1,35 (\pm 0,25) ^a	11	6
	Ponte	7,69 (\pm 1,60) ^a	2,13 (\pm 0,41) ^{*ab}	27	6
	Vila Velha	11,27 (\pm 4,49) ^a	2,57 (\pm 0,97) ^{*ab}	22	5
	Vila Taperebá	8,51 (\pm 2,24) ^a	3,14 (\pm 1,08) ^{*bc}	13	4

* Indica diferença significativa entre períodos (chuvoso e seco) no mesmo ponto de coleta ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 4 contém os resultados obtidos com relação aos dados biométricos dos peixes capturados no presente estudo.

Tabela 4 - Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e do peso (g) de peixes coletados para quantificação de peroxidação lipídica (LPO em μmol hidroperóxido.mg de proteína⁻¹), glutatona S-transferase (GST em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), superóxido dismutase (SOD em U.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), glutatona peroxidase (GPx em nmol.mg de proteína⁻¹.min⁻¹), glutatona ([GSH]= ug. mg de proteína⁻¹) em tecido cerebral, no ano de 2012.

Análises	Localidade	Chuvoso		Seco	
		Cp	Peso	Cp	Peso
LPO	Lourenço	-	-	-	-
	Ponte	15,65 (\pm 1,34)	41,52 (\pm 12,71)	16,76 (\pm 5,69)	143,14 (\pm 146,01)
	Vila Velha	19,20 (\pm 9,31)	312,02 (\pm 288,05)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	38,10 (\pm 14,92)	1395,32 (\pm 1278,35)	47,07 (\pm 10,83)	1652,32 (\pm 931,30)
GST	Lourenço	9,58 (\pm 1,06)	27,37 (\pm 9,01)	9,95 (\pm 0,75)	24,85 (\pm 7,07)
	Ponte	14,15 (\pm 2,09)	53,14 (\pm 18,52)	15,06 (\pm 5,46)	109,57 (\pm 129,89)
	Vila Velha	19,20 (\pm 9,31)	312,02 (\pm 288,05)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	34,42 (\pm 13,79)	1008,20 (\pm 1235,57)	48,50 (\pm 11,12)	1798,98 (\pm 927,43)
SOD	Lourenço	9,48 (\pm 1,19)	26,74 (\pm 10,19)	9,63 (\pm 0,90)	22,13 (\pm 8,87)
	Ponte	14,51 (\pm 2,04)	52,01 (\pm 20,03)	14,77 (\pm 5,47)	105,33 (\pm 127,84)
	Vila Velha	19,20 (\pm 9,31)	312,02 (\pm 288,05)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	36,41 (\pm 13,97)	1171,93 (\pm 1267,58)	47,07 (\pm 10,83)	1652,32 (\pm 931,30)
GPx	Lourenço	9,35 (\pm 1,10)	25,21 (\pm 9,45)	9,64 (\pm 0,89)	22,53 (\pm 8,79)
	Ponte	13,94 (\pm 2,40)	49,17 (\pm 19,22)	14,77 (\pm 5,47)	105,33 (\pm 127,84)
	Vila Velha	19,20 (\pm 9,31)	312,02 (\pm 288,05)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	34,42 (\pm 13,79)	1008,20 (\pm 1235,57)	47,07 (\pm 10,83)	1652,32 (\pm 931,30)
GSH	Lourenço	9,22 (\pm 1,18)	24,24 (\pm 10,20)	10,25 (\pm 0,35)	24,90 (\pm 4,80)
	Ponte	13,70 (\pm 2,33)	51,03 (\pm 18,15)	14,78 (\pm 5,62)	109,08 (\pm 130,21)
	Vila Velha	19,20 (\pm 9,31)	312,02 (\pm 288,05)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	36,41 (\pm 13,97)	1171,93 (\pm 1267,58)	47,07 (\pm 10,83)	1652,32 (\pm 931,30)

A peroxidação lipídica provoca intensas mudanças estruturais e funcionais em membranas, muitas vezes causadas por metais de transição, que dependerão da natureza e concentração do oxidante e que, ocasionalmente, podem causar morte celular (SLATER, 1984; RAMOS *et al.*, 2000; BERNTSSEN *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). O cérebro, por apresentar grande quantidade de ácido graxo, apresenta-se como principal alvo da ação de LPO (MIEIRO *et al.*, 2011).

As análises de LPO foram realizadas em 51 amostras de tecido cerebral, pertencentes a 13 espécies. Estatisticamente houve significância em dois pontos (Ponte e Vila Velha) quando comparados os períodos chuvoso e seco (Tabela 1).

Ao reagir com um ácido graxo poli-insaturado, LPO realiza complexas reações, que podem envolver a catálise de metais, tendo como produtos: etano, pentano, malonaldeído, materiais fluorescentes e quimioluminescência (SLATER, 1984; RAMOS *et al.*, 2000; HERMES-LIMA, 2004).

A quantidade de LPO pode sofrer variação conforme o tipo de órgão que está sendo avaliado. Estudos têm observado essa característica no fígado, rins, brânquias, coração e intestino (FAROMBI *et al.*, 2007; SOUID *et al.*, 2013). Segundo os autores, o nível de LPO pode ter relação com a absorção de metais (Cd, chumbo - Pb, arsênio - As, Cu e Zn) por estes órgãos além de haver uma relação direta entre acumulação no tecido e o tempo de exposição. Li *et al.* (2010) observaram que, inicialmente, o sistema antioxidante pode atuar na eliminação de ERO's produzidos em *O. mykiss* expostos a carbamazepina, fazendo com que não houvesse aumento de LPO no tecido cerebral.

No presente estudo, os baixos valores de peroxidação lipídica demonstram que os peixes não apresentaram danos celulares significativos em nenhum dos pontos amostrais, ao contrário do esperado. Todavia, Farombi *et al.* (2007) e Souid *et al.* (2013) não fizeram menção aos danos causados por xenobióticos às células cerebrais, talvez pelo fato destas serem pouco afetadas, mas, como pôde ser constatado por Li *et al.* (2010), deve ser considerada a tentativa de manter o equilíbrio oxidativo pelo organismo. No presente estudo, os valores praticamente dobraram do período chuvoso para o seco.

Metais de transição podem causar aumento da LPO quando as defesas do organismo ao balanço redox estão abaixo do normal, ou ainda quando este íon age em uma forma redox ativa em determinada região celular (SLATER, 1984; HERMES-LIMA, 2004). A ação do estresse também leva ao aumento dos valores de LPO (HIDALGO *et al.*, 1988; WILHELM-FILHO *et al.*, 2001; BERNTSEN *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006). Todavia, a ação de vitaminas (C e/ou E) parece agir sobre a peroxidação lipídica hepática, fazendo com que ocorra sua diminuição (HIDALGO *et al.*, 1988).

Ainda, os resultados por Li *et al.* (2011) demonstram que pode haver certa correlação entre os níveis de LPO e a atividade de CAT e GPx, já que quando a atividade destas enzimas foi inibida, os níveis de LPO aumentaram significativamente.

As análises de GST foram realizadas em amostras de tecido cerebral de 76 peixes, pertencentes a 19 espécies, e os resultados mostraram significância nos pontos Lourenço e

Vila Taperebá, quando feita a comparação entre períodos (chuvoso e seco). Quando realizada a comparação entre pontos, houve diferença significativa entre os pontos Lourenço x Vila Taperebá em ambos os períodos.

Os valores encontrados não apresentaram atividade significativa, quando comparados com os obtidos em outros estudos, uma vez que Farombi *et al.* (2007) observaram atividades elevadas de GST em peixes encontrados em ambientes sob influência de poluição, mesmo resultado observado por Monteiro *et al.* (2006), em estudo sobre a influencia de metil paration em *Brycon cephalus*, sendo associado à um mecanismo de defesa do organismo.

A GST utiliza GSH como substrato, da mesma forma que a GPx. Possivelmente essa possa ser a explicação dos peixes apresentarem reduzida atividade de GST, uma vez que a atividade da GPx encontrou-se elevada, fazendo com que não houvesse GSH disponível em quantidade suficiente para a atividade da GST.

A enzima GST é encontrada em todas as formas de vida, e em vários tecidos em peixes, com destaque ao hepático. Os animais apresentam formas homo e heterodímeros de GST ativos no citosol ou núcleo (HERMES-LIMA, 2004; MARTINEZ, 2006). Tal característica pode ser considerada como justificativa a baixa atividade de GST em tecido cerebral.

Outra condição que pode ter afetado a atividade de GST em tecido cerebral, pode ser compreendido através dos resultados obtidos por Bagnyukova *et al.* (2005b), onde a inibição da CAT, pela ação de (amino triazol), pode ocasionar aumento de H₂O₂ com consequente aumento de LPO, fazendo com que ocorra elevação de GST como medida compensatória. No presente estudo, a elevada atividade de GPx em três dos quatro pontos de coleta, com exceção de Lourenço, pode ter compensado a inatividade da CAT, ocasionando no baixo nível de LPO e consequentemente de GST.

Deve-se levar em consideração o que foi observado por Van der Oost *et al.* (2003), uma vez que a utilização de GST como biomarcador em avaliação de risco ambiental deva ser utilizado com prudência, visto que sua alteração somente é observada em uma quantidade limitada de peixes. Além disso, há resultados antagônicos com relação a esta enzima, uma vez que esta pode sofrer inibição ou indução de sua atividade enzimática quando diferentes poluentes são analisados, mesma característica observada na enzima CAT.

Setenta e sete peixes (19 espécies) foram utilizados nas análises de SOD no tecido cerebral, e os resultados obtidos apontam diferença significativa em todos os pontos de coleta ao serem comparados os períodos chuvoso e seco (Tabela 3).

O radical $O_2^{\cdot-}$ tem como característica ser menos reativo que outros radicais, fazendo com que possa se deslocar por grandes distâncias (RAMOS *et al.*, 2000). No presente estudo, são perceptíveis os valores mínimos de SOD, mesmo ocorrendo diferença significativa entre períodos. Tal resultado pode ser compreendido das seguintes formas: (1) não houve presença elevada do radical superóxido; (2) a atividade desta enzima diminuiu no espaço de tempo entre a coleta da amostra e sua posterior análise; (3) sua atividade pode ter sido influenciada pela água levemente ácida; ou (4) a atividade desta enzima depende do tipo de tecido que está sendo analisado (BAGNYUKOVA *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado com *Piaractus mesopotamicus* expostos à água ácida associada ou não com cobre, Sampaio *et al.* (2010) observaram que a atividade do SOD e CAT, presentes no músculo vermelho, foram afetadas, indicando uma sensibilidade destas enzimas às condições impostas.

A CAT está presente em diversos tecidos nos vertebrados, apresentando alta atividade no fígado, rins, tecido adiposo e eritrócitos. No entanto, pode ser inibida por alguns agentes, tais como amino triazol, certos íons metálicos, pH ácido, altas concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo sensíveis também ao cianeto e a azida (HERMES-LIMA, 2004; ATLI *et al.*, 2006; SAMPAIO *et al.*, 2010).

Quanto à ausência de dados referentes à CAT, existem duas explicações: (a) sua atividade é mínima no tecido cerebral, característica observada em mamíferos (HERMES-LIMA, 2004) ou (b) presença de elevado fluxo de radicais superóxidos, que possui a capacidade de inibição da atividade desta enzima (KONO e FRIDOVICH, 1982). De acordo com estes autores, a presença, desde o início da reação, da SOD faz com que não ocorra a inibição da CAT.

Logo, pode-se perceber que estas duas enzimas trabalham de forma sinérgica, uma vez que SOD e a CAT em conjunto com a GPx são as primeiras linhas de defesa frente ao ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio que podem causar peroxidação lipídica (McCORD, 1996; HERMES-LIMA, 2004). Interessantemente, Yu (1994) relatou que baixas concentrações de H_2O_2 são catalisadas pela GPx, sendo que o inverso (elevadas concentrações de H_2O_2) são metabolizadas pela CAT. Esta característica não foi observada no presente estudo, uma vez que a atividade da GPx foi bastante elevada e não houve atividade da CAT nos dois períodos estudados.

Em estudo realizado por Mieiro *et al.*, (2010) sugere uma resposta órgão-específica ao Hg, já que houve diminuição da atividade de SOD e aumento das atividades de GPx encontrados em tecido cerebral e hepático em *Liza aurata*. Tal característica pode ser

considerada como possível resposta às ausências de atividade de SOD e CAT do presente estudo.

Um total de 83 peixes (20 espécies) foram utilizados para a quantificação da atividade da enzima GPx também no tecido cerebral. Os resultados indicam diferença significativa entre períodos em três pontos de coleta: Ponte, Vila Velha e Vila Taperebá (Tabela 4).

O aumento significativo de GPx no período seco pode estar relacionado com os baixos valores de GSH, já que assim como a GST, a GPx depende da presença de GSH para catalisar a redução de H_2O_2 , com produção de água (CHEUNG *et al.*, 2004). De acordo com Oliveira (2010) existem dois garimpos ativos a montante do segundo ponto de coleta (Ponte), cuja atividade (5,4 Kg em 2008), pode ter influenciado no significativo aumento da atividade da GPx nos peixes coletados no local.

A GPx apresenta grande importância como protetora da membrana celular contra a ação da LPO (VAN DER OOST *et al.*, 2003). No presente estudo, quando comparado os dados de LPO e GPx, ambos apresentaram aumento significativo de valores entre os períodos. Assim, pode-se sugerir que mesmo com o aumento da atividade da GPx, esta sozinha não foi hábil em realizar a proteção das membranas celulares.

Órgãos que possuem metabolismo alto, com elevada produção de peróxido de hidrogênio, possuem alta atividade de GPx, sendo o cérebro uma exceção. Peixes, assim como roedores, apresentam alta atividade desta enzima (HERMES-LIMA, 2004), característica observada no presente estudo. Sendo assim, pode-se chegar a dois entendimentos quanto aos resultados obtidos:

O primeiro seria de que os valores encontrados resultam de um ambiente com ausência de estresse oxidativo, uma vez que os valores de SOD foram mínimos e não houve atividade de CAT, e os valores de GPx são considerados normais.

O segundo seria de que houve uma diminuição das atividades da SOD no intervalo de tempo entre a coleta e análise das amostras ou ainda o estresse oxidativo não ocasionou elevada produção $O_2^{\cdot-}$, fazendo com que não houvesse elevada síntese deste antioxidante, mas sim de H_2O_2 . Além disso, pode ter ocorrido a inibição da CAT por algum poluente, fazendo com que houvesse maior produção de GPx nos dois períodos, principalmente no período seco. Essa hipótese é plausível em decorrência dos resultados obtidos de GSH e GST, que apresentaram diminuição de nível e atividade, respectivamente, no período seco, uma vez que a GSH serve como substrato para a atividade de GPx e GST, além disso a ativação de enzimas ligadas à glutatona pode estar relacionada a falta de atividade da CAT (BAGNYUKOVA *et al.*, 2005a, b; MIEIRO *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2013).

Dados relativos à GSH mostram que ao se comparar os períodos de coleta, houve diferença significativa nos pontos Ponte, Vila Velha e Vila Taperebá. E ao se comparar os pontos de coleta em um mesmo período, houve diferença significativa apenas entre Ponte x Vila Taperebá no período seco. Tais resultados foram obtidos através da análise de 73 peixes (19 espécies).

O Hg possui alta afinidade com o grupo tiol, sendo assim, pode se ligar com pequenos polipeptídeos como tiol, como por exemplo, a GSH (GAGNÉ *et al.*, 1990).

Devido à alta afinidade entre Hg e GSH, este metal pode reduzir a quantidade intracelular de GSH causando desequilíbrio entre espécies reativas e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011).

Dados com relação ao nível de GSH e à atividade de GST no período chuvoso parecem estar relacionados. Pesquisadores têm apontado essa relação GSH-GST, onde a GSH serve como base para a atividade da GST, sendo que a elevação do nível de GSH concomitantemente com a atividade da GST representam adaptação e proteção frente ao estresse oxidativo (MONTEIRO *et al.*, 2006; FAROMBI *et al.*, 2007). Observando essa interação no presente estudo, pode-se ver que os peixes coletados no período chuvoso sofreram algum tipo de estresse agudo, uma vez que os valores encontrados no período seco foram menores.

Todavia, a GSH não serve apenas como base para GST e GPx, pois também é considerada um antioxidante não enzimático, atuando sobre radicais centrados em carbono, oxigênio *singlete*, radical hidroxila (OH^{\bullet}) e espécies reativas de nitrogênio (HERMES-LIMA, 2004).

Por fim, vale ressaltar que estudos prévios demonstram que o cérebro apresenta um sistema de defesa antioxidante baixo (MATÉS, 2000; LI *et al.*, 2011), fazendo com que este tenha maior suscetibilidade às ações de agentes exógenos.

Os resultados relacionados à atividade da ACHE nas áreas de estudo em ambos os períodos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios (\pm desvio padrão) de acetilcolinesterase (ACHE nmol. mg de proteína⁻¹. min⁻¹) em tecido muscular, no ano de 2012.

Análise	Localidade	Período		Nº de peixes	Nº de espécies
		Chuvoso	Seco		
ACHE	Lourenço	94,73 (\pm 31,64) ^a	177,76 (\pm 70,98) ^{*a}	38	8
	Ponte	135,28 (\pm 100,19) ^a	85,04 (\pm 54,54) ^b	28	6
	Vila Velha	51,86 (\pm 26,26) ^a	41,72 (\pm 15,29) ^b	23	5
	Vila Taperebá	80,00 (\pm 55,02) ^a	36,61 (\pm 10,27) ^b	15	4

* Indica diferença significativa entre períodos (chuvoso e seco) no mesmo ponto de coleta ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados relacionados aos dados biométricos (comprimento padrão e peso) dos peixes capturados para o presente estudo estão presentes na tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios (\pm desvio padrão) de comprimento padrão (Cp) em centímetro e peso (g) de peixes utilizados para quantificação da atividade de ACHE (nmol. mg de proteína⁻¹. min⁻¹) em tecido muscular, no ano de 2012.

Análise	Localidade	Chuvoso		Seco	
		Cp	Peso	Cp	Peso
ACHE	Lourenço	9,35 (\pm 1,10)	25,21 (\pm 9,45)	10,09 (\pm 3,61)	15,58 (\pm 8,10)
	Ponte	13,70 (\pm 2,33)	51,03 (\pm 18,15)	14,77 (\pm 5,47)	105,33 (\pm 127,84)
	Vila Velha	19,26 (\pm 8,92)	317,90 (\pm 276,60)	20,13 (\pm 6,21)	201,64 (\pm 218,51)
	Vila Taperebá	33,43 (\pm 13,07)	921,23 (\pm 1170,06)	47,07 (\pm 10,83)	1652,32 (\pm 931,30)

Estudos apontam que os metais podem apresentar características tanto neutra (BEAUVAIS *et al.*, 2001), excitatória (ROMANI *et al.*, 2003) ou ainda inibitória (RABITTO *et al.*, 2005; ALVES COSTA *et al.*, 2007), com relação à atividade enzimática da colinesterase.

A comparação entre as médias da atividade de ACHE (tecido muscular) foi significativa apenas no Lourenço. No entanto, ao se comparar os pontos em um mesmo período, houve diferença significativa entre Lourenço x Ponte, Lourenço x Vila Velha e Lourenço x Vila Taperebá. Os resultados foram baseados nas análises de 104 peixes coletados para o experimento.

A inibição muscular de CHE causada por metil paration e paration em *Gambusia affinis* (peixe-mosquito) mostrou que estes agentes atuam de forma eficaz na atividade desta enzima em apenas 48 horas, com porcentagem de inativação de 90,2% e 95,5%, respectivamente (BOONE e CHAMBERS, 1996). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo mostram que os peixes apresentaram considerável redução da atividade enzimática, com exceção da coleta no ponto Lourenço que apresentou aumento da atividade no período

seco, demonstrando que o fator, que porventura, estivesse inibido tal atividade deixou de ser atuante, resultado não observado para os outros locais de amostragem. Nos outros pontos, houve apenas uma tendência à diminuição da atividade enzimática. Os baixos valores encontrados, principalmente, em Vila Velha e Vila Taperebá pode estar relacionado com a proximidade entre os locais de coleta com pequenas aglomerações humanas, já que ambas as localidades apresentam atividade agrícola de subsistência.

A alcalinidade é um fator que pode influenciar as concentrações de metais no fígado através de uma correlação inversa entre a alcalinidade e concentrações hepáticas de MT ligadas aos metais Cd e Zn (DALLINGER *et al.*, 1997). Sampaio *et al.* (2010) avaliaram *P. mesopotamicus* expostos ao cobre associado ou não a água com pH ácido e, observaram que o fator pH não influenciou a síntese de MT. No presente estudo, valores de pH encontrados indicaram leve acidez ($5,98 < \text{pH} < 7,01$), que *per se* parece não ter estimulado a síntese de MT (Tabela 7).

Tabela 7 – Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T) e pH da água nos locais de coleta dos peixes nos períodos chuvoso e seco em 2012.

Período / Localidade	Parâmetros físico-químicos da água		
	O.D. (mg.L ⁻¹)	T (°C)	pH
Chuvoso			
Lourenço	6,10	27,90	6,21
Ponte	6,30	28,80	6,59
Vila Velha	6,00	29,60	6,74
Vila Taperebá	5,80	30,80	7,01
Seco			
Lourenço	5,70	27,30	5,98
Ponte	6,20	29,60	6,48
Vila Velha	5,90	30,70	6,83
Vila Taperebá	5,80	30,10	7,06

Os organismos vivos são grandemente influenciados pela temperatura, principalmente os ectotérmicos, uma vez que o aumento ou diminuição da temperatura influenciará os processos metabólicos, podendo resultar em estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011).

Há relação entre temperatura, diminuição do oxigênio e estimulação metabólica com o aumento da contaminação por agentes tóxicos em decorrência do aumento da ventilação branquial (CHOVANEK *et al.*, 2003). Exemplo é o estudo realizado por Tu *et al.* (2012) com

camarão-tigre-gigante (*Penaeus monodon*) no qual, observou-se que a altas temperaturas (29 e 34 °C), aparentemente, diminuíram a atividade da GPx, mesma característica observada com a exposição dos camarões ao pesticida deltametrina. Contudo, no presente estudo, o fator temperatura parece não ter influenciado as atividades enzimáticas ou os níveis de GSH ou LPO tendo em vista não terem ocorrido grandes alterações na temperatura entre períodos, característica típica da região de coleta.

Avaliações tóxicas são complexas, em decorrência de efeitos sinérgicos e antagônicos, dificultando a previsão de seus impactos nos ecossistemas, visto que a contaminação pode apresentar característica intermitente, fazendo com que agentes poluidores permaneçam indetectáveis (CHOVANEC *et al.*, 2003), além de fatores abióticos, como por exemplo, temperatura que podem estar associados à elevação ou não de estresse oxidativo no cérebro, baseado em níveis de LPO em *Dicentrarchus labrax* (MIEIRO *et al.*, 2011).

Estudos diversos avaliaram a ação de outros agentes exógenos, além de pesticidas, na atividade da ACHE (ROMANI *et al.*, 2003; RABITTO *et al.*, 2005; ALVES COSTA *et al.*, 2007; PRETTO *et al.*, 2010): no estudo realizado por Romani *et al.* (2003) cujo objetivo foi avaliar a exposição de *Sparus auratus* ao cobre, verificaram que a atividade enzimática de ACHE muscular aumentou significativamente mesmo com baixa concentração de Cu. Já Alves Costa *et al.* (2007) observaram inibição da atividade enzimática no músculo de *Hoplias malabaricus* pela ação de MeHg, mesmo em pequena dose.

Em estudo realizado por Chuiko *et al.* (1997) com o peixe *Rutilus rutilus*, os autores propõe uma interação entre fatores abióticos (mudanças na temperatura da água) e a atividade de ACHE. Todavia, os resultados obtidos neste estudo parecem não indicar influência da temperatura na atividade enzimática da ACHE muscular, tendo em vista que a temperatura, praticamente, manteve-se inalterada mesmo ocorrendo mudança de atividade entre os locais de coleta.

Como o presente estudo não apresenta dados relativos à análise de água quanto à presença de metais pesados, não é possível afirmar se as variações de atividade procedem da interação entre peixes e metais pesados, mas fica claro que outros fatores podem agir sobre a atividade desta enzima, e não somente a ação de pesticidas.

6 CONCLUSÃO

O fator sazonalidade (período chuvoso ou seco) influenciou os resultados obtidos, já que houve alteração positiva nos níveis de MT em todos os quatro locais de coleta de amostras. Neste caso, a sazonalidade em si pode não ter sido a principal causa do aumento nos níveis de MT, pois o único resultado significativo (Vila Velha) foi o que, por ventura, apresentou fêmeas em estado reprodutivo.

Logo, a maturação gonadal parece ser o fator que melhor explica as alterações encontradas os níveis de MT nos peixes coletados no Rio Cassiporé, Estado do Amapá. No entanto, estudos complementares devem ser realizados, principalmente em relação à concentração dos metais na água, para que dessa forma se possa identificar com mais clareza qual o principal fator que pode estar influenciando de forma mais contundente a alteração na síntese dessa proteína, assim como saber com maior clareza o porquê do primeiro ponto (Lourenço) não ter apresentado dados estatísticos significativos, em relação aos demais.

O nível de peroxidação lipídica no tecido cerebral indica que, aparentemente, não há danos celulares significativos. Todavia, outros estudos são necessários, principalmente com relação às análises histopatológicas. Vale ressaltar que estudos têm demonstrado uma hierarquia dos órgãos que sofrem variação na quantidade de LPO, ou seja, há variação conforme o tecido que está sendo analisado.

A glutathione S-transferase cerebral mostrou baixa atividade, visto ser dependente do substrato GSH e o nível deste ter sido baixo, concluindo-se que não houve quantidade suficiente de substrato, de forma a permitir que a GST realizasse sua função.

A atividade da superóxido dismutase foi mínima, levando a acreditar que não houve produção do radical $O_2^{\bullet-}$; houve a inibição das atividades enzimáticas ou ainda a atividade desta enzima diminuiu no espaço de tempo entre a coleta do tecido cerebral e sua posterior análise.

Não foi detectada atividade da catalase nos dois períodos de coleta no tecido cerebral, provavelmente em decorrência da inibição de suas atividades, visto que esta enzima apresenta grande sensibilidade a diversos fatores.

A glutathione peroxidase cerebral indicou alta atividade, fato que pode ser justificado pelo baixo nível encontrado de GSH, uma vez que a GPx, assim como a GST, utiliza este substrato para catalisar a redução de H_2O_2 .

Os valores obtidos de glutathiona foram baixos, indicando que sua função foi o de auxiliar na redução do peróxido de hidrogênio pela GPx. Todavia, estudos recentes abordaram o fato da alta afinidade existente entre o Hg e a GSH, fazendo com que esta esteja em quantidade reduzida no meio intracelular. Faz-se necessário a obtenção de dados de concentração de metais na água nos pontos de coleta para conclusões mais consistentes.

Os parâmetros físico-químicos mostraram valores dentro do ideal, com caracterização da água como levemente ácida, sendo que esta característica pode ter influenciado as atividades de SOD e CAT.

Assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível notar variação entre os valores obtidos em relação aos apresentados por outros estudos. Contudo, deve ser lembrado que esta pesquisa foi realizada com várias espécies, uma vez que o propósito foi ter conhecimento geral quanto à saúde dos peixes que habitam a bacia do Rio Cassiporé. Tal variação dos níveis e atividades enzimáticas e não enzimáticas deve-se em parte aos tipos de tecidos nos quais foram realizadas as análises, visto que diversos autores têm demonstrado variações conforme o tecido analisado, além da existência de diferença das atividades das enzimas em relação à espécie de peixe avaliada.

A atividade enzimática de ACHE muscular obtida entre períodos mostrou baixa atividade com exceção do ponto Lourenço. Pode-se inferir que, neste local, os peixes apresentaram uma possível tentativa de adaptação a algum agente externo. Característica oposta ao observado nos outros locais de coleta, uma vez que a atividade nos outros pontos diminuiu na comparação entre períodos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados, pode-se considerar que há ação de algum agente exógeno que está afetando a homeostase da ictiofauna residente na bacia do Rio Cassiporé, Estado do Amapá. Em certos locais apresentaram resultados mais significativos que outros, fazendo com que fosse descartada a hipótese de que peixes encontrados próximos às fontes poluidoras apresentem relação diretamente proporcional quanto ao estresse oxidativo.

Por outro lado, os dados obtidos mostram que houve maior influência do período seco nos parâmetros bioquímicos analisados, de forma que seja plausível a interferência do período (chuvoso ou seco) nos níveis de LPO, assim como no nível e nas atividades enzimáticas dos antioxidantes.

No entanto, deve ser ressaltado que estudos complementares são necessários para que se obtenha maior consistência dos dados obtidos no presente estudo. Além disso, faz-se necessário o monitoramento dos organismos aquáticos presentes na bacia em estudo, visto que há considerável risco à saúde de tais animais tendo em vista a quantidade e intensidade da atividade mineradora existente na região e, conseqüentemente, trazendo grande risco à saúde pública pela contaminação através do consumo de animais possivelmente contaminados.

8 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984.
- AGUIAR, L. H.; MORAES, G.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; CORRÊA, C. F. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã , *Brycon cephalus*. **Environmental Research**. v. 95, p. 224–230, 2004.
- AIREY, D. Mercury in human hair due to environment and diet: a review. **Environmental health perspectives**. v. 52, p. 303-316, 1983.
- AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F. J. P.; PFEIFFER, W. C.; KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **The Science of the Total Environment**. v. 175, p. 85-95 , 1995.
- ALVES COSTA, J. R. M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 82–88, 2007.
- ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR, L. B. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment**. Intech, Rijeka, Croatia, p. 251-278, 2011.
- ASSIS, H. C. S.; SILVA, C. A.; OBA, E. T.; PAMPLONA, J. H.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RAMSDORF, W.; CESTARI, M. M. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. **Toxicol**. v. 66, p. 25–30, 2013.
- ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 143, p. 218–224, 2006.
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 142, p. 335 – 341, 2005a.
- BAGNYUKOVA, T. V.; VASYLKIV, O. Y.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research**. v. 1052, p. 180-186. 2005b.
- BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**. v. 78, p. 325–331, 2006.
- BARCELLOS, L. G.; SOUZA, S. M. G. de; LUCERO, L. F. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 24 (n. especial), p. 239-245, 1997.

BASTOS, T. X. **O clima da Amazônia brasileira segundo Köppen**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido. n, 87, 4 p., nov. 1982.

BAYSOY, E.; ATLI, G.; GÜRLER, C. Ö.; DOGAN, Z.; EROGLU, A.; KOCALAR, K.; CANLI, M. The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 84, p. 249–253, 2012.

BEAUVAIS, S. L.; JONES, S. B.; PARRIS, J. T.; BREWER, S. K.; LITTLE, E. E. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 49, p. 84-90, 2001.

BERNTSSEN, M. H. G.; AATLAND, A.; HANDY, R. D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicology**. v. 65, p. 55-72, 2003.

BONACCI, S.; CORSI, I.; FOCARDI, S. Cholinesterases in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: Characterization and sensitivity to pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 1481–1488, 2009.

BOONE, J. S.; CHAMBERS, J. E. Time Course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 29, p. 202-207, 1996.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRADY, F. O. The physiological function of metallothionein. **Trends in biochemical sciences**. v. 7, n. 4, p. 143-145, apr. 1982.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, 18 DE MARÇO DE 2005.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. H. Metallothionein and the trace minerals. **Annual review of nutrition**. v. 10, p. 63-83, 1990.

CAO, L.; HUANG, W.; SHAN, X.; YE, Z.; DOU, S. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 33, p. 16-25, 2012.

CAUSSY, D.; GOCHFELD, M.; GURZAU, E.; NEAGU, C.; RUEDEL, H. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 56, p. 45-51, 2003.

CHANDRASEKARA, L. W. H. U.; PATHIRATNE, A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) by chlorpyrifos and carbosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 109-119, 2007.

CHEUNG, C. C. C.; SIU, W. H. L.; RICHARDSON, B. J.; DE LUCA-ABOTT, S. B.; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environmental Pollution**. v. 128, p. 393-403, 2004.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In.: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Eds.). **Bioindicators and biomonitors**. Elsevier Science, Oxford, p. 639-676, 2003.

CHRISTENSEN, G. M.; OLSON, D.; RIEDEL, B. Chemical Effects on the Activity of Eight Enzymes: A Review and a Discussion Relevant to Environmental Monitoring. **Environmental Research**. v. 29, p. 247-255, 1982.

CHUIKO, G. M.; ZHELNIN, Y.; POD'GORNAYA, V. A. Seasonal Fluctuations in Brain Acetylcholinesterase Activity and Soluble Protein Content in Roach (*Rutilus rutilus* L.): A Freshwater Fish from Northwest Russia. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 117C, n. 3, p. 251-257, 1997.

CLARKSON, T. W. Human health risks from methylmercury in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 9, p. 957-961, 1990.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The toxicology of mercury — current exposures and clinical manifestations. **The new england journal of medicine**. v. 349, n. 18, p. 1731-1737, oct. 2003.

COPPAGE, D. L.; MATTHEWS, E. Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 11, n. 5, 1974.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**. v.30, p. 235-41, 1981.

DALLINGER, R.; EGG, M.; KÖCK, G.; HOFER, R. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lake. **Aquatic Toxicology**. v. 38, p. 47-66, 1997.

DE KRUIJF, H. A. M. Extrapolation through hierarchical levels. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100C, n. 1/2, p. 291-299, 1991.

DEATON, C. M.; MARLIN, D. J. Exercise-Associated Oxidative Stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 2, n. 3, p. 278-291, Sept., 2003.

DEMBÉLÉ, K.; HAUBRUGE, E.; GASPARD, C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, p. 49-54, 2000.

DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006.

130 f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2006.

DOYOTTE, A.; COSSU, C.; JACQUIN, M.-C.; BABUT, M.; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**. v. 39, p. 93-110, 1997.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**. v. 91, p. 157–162, 2003.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88-95, 1961.

FARIAS, C. E. G. **Mineração e meio ambiente no Brasil**. Relatório preparado para o CGEE. 39 p., Out, 2002.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 4, n. 2, p. 158-165, 2007.

FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. pp. 221-243. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. (Eds.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. RiMa, São Carlos, p. 245-322, 2003.

FIGUEIRA, E.; BRANCO, D.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; FREITAS, R. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 84, p. 185-190, 2012.

FILIPAK NETO, F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus***. 2007. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2007.

FRY, F. E. J. The Effect of environmental factors on the physiology of fish. **Fish Physiology**. v. 6, 1-98, 1971.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 87, p. 245-254, 1990.

GAGNÉ, F.; MARION, M.; DENIZEAU, F. Metallothionein induction rainbow trout hepatocytes and metal homeostasis in exposed to mercury. *Toxicology letters*. v. 51, p. 99-107, 1990.

GHOMI, M. R.; DEZHABAD, A.; DALIRIE, M. S.; NIKOO, M.; TOUDAR, S.; SOHRABNEJAD, M.; BABAEI, Z. Nutritional properties of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), correlated with body weight. **Archives of Polish Fisheries**. v. 20, p. 275-280, 2012.

HACON, S. S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológicos à saúde humana. pp. 245-322. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. (Eds.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. RiMa, São Carlos, p. 245-322, 2003.

HAIYAN, W. STUANES, A. O. Heavy metal pollution in air-water-soil-plant system of Zhuzhou City, Hunan Province, China. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 147, p. 79-107, 2003.

HAMILTON, S. J.; MEHRLE, P. M. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. **Transactions of the American Fisheries Society**. v. 115, p. 596-609, 1986.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biological and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K. B. (Ed.). **Functional metabolism: regulation and adaptation**. Wiley-Liss, New Jersey. p. 319-368. 2004.

HIDALGO, J.; CAMPMANY, L.; BORRAS, M.; GARVEY, J. S.; ARMARIO, A. Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging. **American journal of physiology – endocrinology and metabolism**. v. 255, p. E518-E524. 1988.

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

HYLLNER, S. J.; ANDERSON, T.; HAUX, C.; OLSSON, P.-E. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Journal of Cellular Physiology**. v. 139, p. 24-28, 1989.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. v.26, p.853-856, 1991.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. v.202, p.384-389, 1992.

JUNG, J-H.; ADDISON, R. F.; SHIM, W. J. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. **Marine Environmental Research**. v. 63, p. 471–478, 2007.

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

KNAPEN, D.; REYNDERS, H.; BERVOETS, L.; VERHEYEN, E.; BLUST, R. Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. **Aquatic Toxicology**. v. 82, p. 163–172, 2007.

- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, n. 10, pp. 5751-5754, May, 1982.
- KOTSONIS, F. N.; KLAASSEN, C. D. Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. **Toxicology and applied pharmacology**. V. 51, p. 19-27, 1979.
- KOZLOVSKAYA, V. I.; MAYER JR, F. L. Brain acetylcholinesterase and backbone collagen in fish intoxicated with organophosphate pesticides. **Journal of Great Lakes Research**. v. 10, n. 3, p. 261-266, 1984.
- KUBITZA, F. Transporte de peixes vivos. Parte 1. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, v. 7, p. 20-26, set./out. 1997.
- LACERDA, L. D. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. **Química Nova**. v. 20, n. 2, 1997a.
- LACERDA, L. D. Global mercury emissions from gold and silver mining. **Water, Air and Soil Pollution**. v. 97, p. 209-221, 1997b.
- LI, H.-Z.; ZLABEK, V.; VELÍŠEK, J.; GRABIC, R.; MACHOVÁ, J.; KOLAŘOVÁ, J.; LI, P.; RANDÁK, T. Antioxidant responses and plasma biochemical characteristics in the freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after acute exposure to the fungicide propiconazole. **Czech Journal of Animal Science**. v. 56, n. 2, p. 61–69, 2011.
- LI, H.-Z.; ZLABEK, V.; VELISEK, J.; GRABIC, R.; MACHOVA, J.; RANDAK, T. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 151, p. 137–141, 2010.
- LINDE, A. R.; SÁNCHEZ-GALÁN, S.; VALLÉS-MOTA, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: european eel and brown trout. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 49, p. 60-63, 2001.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**. v. 101, p. 13-30, 2011.
- MACCRIMMON, H. R. World Distribution of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). **Journal fisheries research board of Canada**. v. 28, n. 5, p. 663-704, 1971.
- MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SILVA DE ASSIS, H.C. Biomarcadores de estresse oxidativo em peixes. In: Arlindo Saran Neto; Wagner dos Santos Mariano; Silvia Fátima P. Sória (Org.). **Tópicos Especiais em Saúde e Produção Animal**. São Carlos, SP, p. 81-106. 2009.
- MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A. T. (Ed). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá-PR, Abrapoa, p. 43-62, 2006.

MASSOULIÉ, J.; TOUTANT, J.-P. Vertebrate Cholinesterases: Structure and Types of Interaction. In: WHITTAKER, V. P. **Handbook of Experimental pharmacology: The Cholinergic Synapse**. v. 86, p. 167-224, 1988.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**. v. 153, p. 83-104, 2000.

McCORD, J. M. Effects of positive iron status at a cellular level. **Nutrition Reviews**. v. 54, n. 3, p. 85-88, March, 1996.

MIEIRO, C. L.; AHMAD, I.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; PACHECO, M. Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. **Ecotoxicology**. v. 19, p.1034–1045, 2010.

MIEIRO, C. L.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; PACHECO, M. Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*) - Bioaccumulation and oxidative stress profiles. **Aquatic Toxicology**. v. 103, p. 233–240, 2011.

MONTEIRO, M. A. Meio século de mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. **Estudos Avançados**. v. 19, n. 53, p. 187-207, 2005a.

MONTEIRO, M. A. Mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. **Novos Cadernos NAEA**. v. 8, n. 1, p. 141-187, jun., 2005b.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 143, p. 141–149, 2006.

MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**. v. 4, n. 1 / 2, p. 83-100, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Biological Markers in Environmental Health Research. **Environmental Health Perspectives**. v. 74, p. 3-9, 1987.

NORRIS, D. O.; DONAHUE, S.; DORES, R. M.; LEE, J. K.; MALDONADO, T. A.; RUTH, T.; WOODLING, J. D. Impaired Adrenocortical Response to Stress by Brown Trout, *Salmo trutta*, Living in Metal-Contaminated Waters of the Eagle River, Colorado. **General and Comparative Endocrinology**. v. 113, n. 1, p. 1–8, jan. 1999.

OBA, E. T. **Efeitos do exercício físico moderado e da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e no metabolismo de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae)**. 2006. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, 2006.

OH, S. H.; DEAGEN, J. T.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v. 234, n. 3, p. E282-E285, 1978.

OLIVEIRA, M. J. **Diagnóstico do Setor Mineral do Estado do Amapá**. Macapá, IEPA, 148 p., 2010.

ONOSAKA, S.; KAWAKAMI, D.; MIN, K-S.; OO-ISHI, K.; TANAKA, K. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. **Toxicology**. v. 43, p. 251-259, 1987.

OVERNELL, J.; MCINTOSH, R.; FLETCHER, T. C. The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa* L., during the breeding season, and the effect of oestradiol injection. **Journal of Fish Biology**. v. 30, p. 539-546, 1987.

PADOVANI, C. R.; FORSBERG, B. R.; PIMENTEL, T. P. Contaminação mercurial em peixes do Rio Madeira: resultados e recomendações para consumo humano. **Acta Amazonica**. v. 25, n. 1/2, p. 127-136, 1995.

PARIHAR, M. S.; JAVERI, T.; HEMNANI, T.; DUBEY, A. K.; PRAKASH, P. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. **Journal of Thermal Biology**. v. 22, n. 2, pp. 151-156, 1997.

PAVLOV, D. D.; CHUIKO, G. M.; GERASSIMOV, Y. V.; TONKOPIY, V. D. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 103C, n. 3, p. 563-568, 1992.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: Hochachka and Mommsen (eds.), **Biochemistry and molecular biology of fishes** (vol. 5). p. 349-379, 1995.

PINHEIRO, M. C. N.; GUIMARÃES, G. A.; NAKASHINI, J.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J. L.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. Avaliação da contaminação mercurial mediante análise do teor de Hg total em amostras de cabelo em comunidades ribeirinhas do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 2, p.181-184, mar-abr, 2000.

POVLSSEN, A. F.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. The effect of cadmium on vitellogenin metabolism in estradiol-induced flounder (*Platichthys flesus* (L.)) males and females. **Aquatic toxicology**. v. 17, p. 253-262, 1990.

POWER, M.; McCARTY, L. S. Fallacies in ecological risk assessment practices. **Environmental science & technology**. v. 31, n. 8, p. 370-375, 1997.

PRETTO, A. P.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase Activity, Lipid Peroxidation, and Bioaccumulation in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to Cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 58, p. 1008–1014, 2010.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 60, p. 147–156, 2005.

RAMOS, G. R.; ALVES, A. L. H.; HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: El-Hani, C. N.; Videira, A. A. P. (Eds). **O que é a vida? para entender a biologia do século XXI**. Editora Relume-Dumará, Rio de Janeiro-RJ, p. 209-231, 2000.

RANDALL, D.J.; BRAUNER, C.J.; THURSTON, R.V.; NEUMAN, J.F. Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. In: **Toxicology of aquatic pollution: Physiological, cellular and molecular approaches**. Society for Experimental Biology, Seminar Series: 57. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-16, 1996.

RÄSÄNEN, K.; ARSIOLA, T.; OIKARI, A. Fast genomic biomarker responses of retene and pyrene in liver of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 89, p. 733-738, 2012.

RHEE, J-S.; RAISUDDIN, S.; HWANG, D-S.; LEE, K-W.; KIM, I-C.; LEE, J-S. Differential expression of metallothionein (MT) gene by trace metals and endocrine-disrupting chemicals in the hermaphroditic mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 72, p. 206– 212, 2009.

RIGGIO, M.; FILOSA, S.; PARISI, E.; SCUDIERO, R. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 135, p.191-196, 2003.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 21, p. 111–127, 2007.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; ARMSTRONG, J.; SCHLENK, D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 69, p.466–471, 2008.

RODRÍGUES-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**. v. 58, p. 505-509 , 2004.

ROMANI, R.; ANTOGNELLI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**. v. 145, p. 321-329, 2003.

SAMPAIO, F. G.; BOIJINK, C. L.; SANTOS, L. R. B.; OBA, E. T.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ecotoxicology**. v. 19, p. 963–976, 2010.

SANTOS, B. A. Recursos Minerais na Amazônia. **Estudos Avançados**. v. 16, n. 45, p. 123-152, 2002.

SATO, M.; BREMNER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 14, p. 325-337, 1993.

- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192-205, 1968.
- SHARIATI, F.; SHARIATI, S. Review on Methods for determination of metallothioneins in aquatic organisms. **Biological Trace Element Research**. v. 141, p. 340-366, 2011.
- SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**. v.222, p. 1-15, 1984.
- SQUID, G.; SOUAYED, N.; YAKTITI, F.; MAAROUFI, K. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 89, p. 1-7, 2013.
- SOUZA, E. B.; CUNHA, A. C. Climatologia de precipitação no Amapá e mecanismos climáticos de grande escala. In: Alan Cavalcanti da Cunha; Everaldo Barreiros de Souza; Helenilza Ferreira Albuquerque Cunha (Org.). **Tempo, clima e recursos hídricos: resultados do Projeto REMETAP no Estado do Amapá**. Macapá, AP, p. 177-195, 2010.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P.-D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. v. 47, p. 389-398, 1999.
- TRU HAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 1, p. 151-173, 1977.
- TU, H. T.; SILVESTRE, F.; MEULDER, B.; THOME, J-P.; PHUONG, N. T.; KESTEMONT, P. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Chemosphere**, v. 86, p.83-91, 2012.
- VAN DER OOST, R; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, 57-149, 2003.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá, EDUEM, 169 p., 1996.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. **Marine Environmental Research**. v. 44, p. 69-84, 1997.
- VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9, p. 813-839, 2007.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v. 77, n. 3, p. 591-625, Jul. 1997.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p. 719-726, 2001.

WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100C, n. 1/2, pp. 173-176, 1991.

YU, B. P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. **Physiological Reviews**. v. 74, n. 1, January, 1994.

ANEXO

Família	Espécies	Nome Vernacular	n
Carnívoro / Piscívoro			
Ariidae	<i>Sciades cf. couma</i> (Valenciennes, 1840)	bagre	9
Sciaenidae	<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840)	pescada branca	4
Serrasalminidae	<i>Serrasalmus cf. spilopleura</i> (Kner, 1858)	piranha amarela	2
Serrasalminidae	<i>Pygocentrus nattereri</i> (Kner, 1858)	piranha vermelha	7
Erythrinidae	<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	traíra pongó	4
Onívoro			
Anostomidae	<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1974)	Piau / aracú	3
Heptapteridae	<i>Pimelodella cf. cristata</i> (Müller e Troschel, 1849)	jandiá	9
Pimelodidae	<i>Pimelodus cf. blochii</i> (Valenciennes, 1840)	mandi	9
Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy e Gaimard, 1824)	jandiá do mangue	2
Cichlidae	<i>Aequidens</i> sp.	acará	1
Characidae	<i>Astyanax</i> sp.	matupiri	2
Characidae	<i>Moenkhausia</i> sp.	matupiri	13
Cichlidae	<i>Guianacara cf. geayi</i> (Pellegrin, 1902)	acará	6
Detritívoro			
Curimatidae	<i>Curimata</i> sp.	branquinha	3
Aspredinidae	<i>Aspredo aspredo</i> (Linnaeus, 1758)	rebeca	2
Curimatidae	<i>Cyphocharax cf. spilurus</i> (Günther, 1864)	piaba	7
Curimatidae	<i>Cyphocharax aff. spilurus</i> (Günther, 1864)	piaba	2
Curimatidae	<i>Cyphocharax cf. gouldingi</i> (Vari, 1992)	piaba	5
Herbívoro			
Serrasalminidae	<i>Myleus</i> sp.	curupeté / pacu	3
Insetívoro			
Sternopygidae	<i>Eigenmannia virescens</i> (Valenciennes, 1840)	ituí navalha	4
Characidae	<i>Bryconops cf. caudomaculatus</i> (Gunther, 1869)	joão duro	7