



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**BIOMARCADORES NO BIVALVE *Corbicula fluminea*
E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE DA ÁGUA
DE UMA MICROBACIA URBANA**

Londrina – Paraná
2009

LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**BIOMARCADORES NO BIVALVE *Corbicula fluminea*
E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE DA ÁGUA
DE UMA MICROBACIA URBANA**

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Londrina como
um dos requisitos à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Supervisor de Estágio: Cláudia Bueno dos Reis Martinez

**Londrina – Paraná
2009**

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Prof(a). Dr(a). Marta Marques de Souza

Prof(a). Dr(a). Paulo César Meletti

MSc. Dalita G. S. Morais Cavalcante

Londrina, 13 de Novembro de 2009

Dedico meu trabalho a minha bisavó,
meu exemplo de amor e alegria, que
representa toda minha força e desejo
de fazer alguma diferença neste
mundo. Fica com Deus bisoca!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Londrina e Ao Departamento de Ciências Fisiológicas.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, pela formação e amizade.

Agradeço a minha professora e orientadora Cláudia, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e, principalmente, por acreditar no meu potencial. Isto estimula cada vez mais minha dedicação e vontade de aprender.

À professora Marta, pelos primeiros ensinamentos no laboratório e por me receber tão bem em sua casa.

Ao professor Paulo pelo empréstimo das câmaras.

A todo o pessoal do laboratório, desde quando eu entrei, pela ajuda, risadas, companhia, festinhas, churrascos.

Ao pessoal das coletas: Thi, Carol, Bruna, Kelly, Gabriel, Renata, Rafa, Thaís, espero que não tenha esquecido de ninguém.

Agradeço aos meus pais, pelos valores ensinados e por me proporcionarem uma vida de oportunidades. Os dois são responsáveis por quem sou hoje e espero não decepcioná-los nunca. Muito Obrigada! Amo vocês.

A minha irmã Patrícia, pela amizade e companhia durante toda uma vida. Eu não podia ter ganhado irmã melhor.

A toda minha família.

Ao André pelas grandes aventuras, pela ajuda na hora de encontrar meus pontos de coleta, tirar fotos... Pelas viagens, mergulhos, tombos... Mas principalmente pelo amor e dedicação... Namorado igual a esse, difícil!

Às minhas grandes amigas, Carla, Kátia, Bel, Carol, Keli, Lu e Paula, conhecer vocês foi uma das melhores coisas que aconteceram na minha vida. Muito obrigada por fazer destes últimos cinco anos, anos inesquecíveis.

A turma 53 da Biologia por compartilharem comigo momentos, aulas, trabalhos, mais aulas, provas, viagens, churrascos. Com vocês aprendi a respeitar mais as diferenças.

Agradeço a todo mundo e ao mundo como um todo; o aprendizado está em cada passo, em cada olhar e em cada simples momento.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 URBANIZAÇÃO E POLUIÇÃO AQUÁTICA	1
1.2 BIOMARCADORES	3
1.3 CORBICULA FLUMINEA	6
CAPÍTULO I - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BIVALVE CORBICULA FLUMINEA APÓS A COLETA EM UM LAGO URBANO E DURANTE DEPURAÇÃO	8
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 ANIMAIS	10
3.2 LOCAL DE COLETA	10
3.3 TESTE DE DEPURAÇÃO	12
3.4 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO	13
3.5 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	14
3.5.1 <i>Glutamina-S-transferase (GST)</i>	14
3.5.2 <i>Glutathiona reduzida (GSH)</i>	14
3.5.3 <i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	14
3.5.4 <i>Capacidade antioxidante total (CANT)</i>	15
3.6 MECANISMO DE RESISTÊNCIA A MULTIXENOBIÓTICOS (MXR)	15
3.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS	16
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	16
4. RESULTADOS	16

4.1	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
4.2	MXR.....	19
5.	DISCUSSÃO	19
6.	CONCLUSÕES	22
CAPÍTULO II – BIOMARCADORES NO BIVALVE <i>CORBICULA FLUMINEA</i>: APLICAÇÃO NO ESTUDO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE UMA MICROBACIA URBANA.....		
1.	INTRODUÇÃO	24
1.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	25
1.1.1	<i>Município de Londrina</i>	<i>25</i>
1.1.2	<i>Microbacia Ribeirão Cambé</i>	<i>25</i>
1.2	ÍNDICE DE QUALIDADE DE ÁGUA (IQA) NA MICROBACIA DO RIBEIRÃO CAMBÉ	27
1.3	PARÂMETROS BIOLÓGICOS	28
2.	OBJETIVOS	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS.....	29
3.2	TESTES <i>IN SITU</i>	29
3.3	LOCAIS ESTUDADOS.....	30
3.3.1	<i>Córrego da Mata</i>	<i>31</i>
3.3.2	<i>Montante de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE).....</i>	<i>32</i>
3.3.3	<i>Jusante de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)</i>	<i>33</i>
3.3.4	<i>Córrego dos Periquitos.....</i>	<i>34</i>
3.4	DETERMINAÇÃO DE METAIS NA ÁGUA	36
3.5	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO	36
3.6	BIOMARCADORES DE BIOTRANSFORMAÇÃO	36
3.6.1	<i>7-etoxiresorifina-O-desetilase (EROD).....</i>	<i>36</i>
3.6.2	<i>Glutatina-S-transferase (GST).....</i>	<i>37</i>

3.7	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
3.7.1	<i>Glutathiona reduzida (GSH)</i>	37
3.7.2	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	37
3.7.3	<i>Capacidade antioxidante total (CANT)</i>	37
3.8	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A MULTIXENOBIÓTICOS (MXR)	38
3.9	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS	38
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
4.	RESULTADOS	39
4.1	TESTES <i>IN SITU</i>	39
4.1.1	<i>Parâmetros físico-químicos da água</i>	39
4.1.2	<i>Biomarcadores de biotransformação</i>	41
4.1.3	<i>Parâmetros de estresse oxidativo</i>	43
4.1.4	<i>MXR</i>	46
4.2	CONCENTRAÇÃO DE METAIS NA ÁGUA.....	47
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MUNICÍPIOS DO CENTRO-SUL SEGUNDO TAXA DE URBANIZAÇÃO.....	2
FIGURA 2 - <i>CORBICULA FLUMINEA</i>	7
FIGURA 3 – COLETA DE <i>C.FLUMINEA</i> NO LAGO IGAPÓ III.....	12
FIGURA 4 – AQUÁRIOS DE VIDRO DE 20L, ONDE OS ANIMAIS FORAM MANTIDOS DURANTE O PERÍODO DE DEPURAÇÃO.....	13
FIGURA 5 - <i>CORBICULAFLUMINEA</i> ABERTO.....	13
FIGURA 6 - PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i>	17
FIGURA 7 – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM BRÂNQUIAS DE <i>C.FLUMINEA</i>	18
FIGURA 8 – MECANISMO DE RESISTÊNCIA À MULTIXENOBIÓTICOS (MXR) EM BRÂNQUIAS E GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i>	19
FIGURA 9 – BACIAS HIDROGRÁFICAS DA CIDADE DE LONDRINA. DESTAQUE PARA A MICROBACIA DO RIBEIRÃO CAMBÉ.	26
FIGURA 10 – MAPA DA CIDADE DE LONDRINA COM DESTAQUE PARA A MICROBACIA DO RIBEIRÃO CAMBÉ, OS QUATRO LOCAIS ESCOLHIDOS PARA SEREM ESTUDADOS.	31
FIGURA 11 – LOCALIZAÇÃO DO CÓRREGO DA MATA EM RELAÇÃO AO RIBEIRÃO CAMBÉ.	32
FIGURA 12 - TRECHO À MONTANTE DA ETE SUL.....	32
FIGURA 13 – ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE) DA REGIÃO SUL DE LONDRINA. EM AZUL, OS PONTOS À MONTANTE E JUSANTE DO DESPEJO DA ETE.....	33
FIGURA 14 – TRECHO A JUSANTE DA ETE SUL, COM DESTAQUE PARA A ESPUMA.	34
FIGURA 15 – CÓRREGO DOS PERIQUITOS. TRECHO A APROXIMADAMENTE A 3 KM DO ATERRO CONTROLADO.....	34
FIGURA 16 – ÁREA AGRÍCOLA LOGO AO LADO DA PEQUENA PORÇÃO DE MATA CILIAR DO CÓRREGO DOS PERIQUITOS..	35

FIGURA 17 – VISÃO SUPERIOR DA REGIÃO DO ATERRO CONTROLADO E DO CÓRREGO DOS PERIQUITOS.	35
FIGURA 18 - CÂMARAS DESENVOLVIDAS PARA OS TESTES <i>IN SITU</i>	30
FIGURA 19 - ESQUEMA DE MONTAGEM DE UM TESTE <i>IN SITU</i>	30
FIGURA 20 – CONDUTIVIDADE NOS QUATRO LOCAIS ESTUDADOS DURANTE OS TESTES <i>IN SITU</i>	40
FIGURA 21 – ATIVIDADE DA GST EM BRÂNQUIAS DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	42
FIGURA 22 - ATIVIDADE DA GST EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	43
FIGURA 23 - ATIVIDADE DA EROD EM BRÂNQUIAS DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	41
FIGURA 24 - ATIVIDADE DA EROD EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	42
FIGURA 25 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM BRÂNQUIA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	43
FIGURA 26 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	44
FIGURA 27 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM BRÂNQUIA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	44
FIGURA 28 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	45
FIGURA 29 – TBARS EM BRÂNQUIA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	45

FIGURA 30 - TBARS EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	46
FIGURA 31 - MXR EM BRÂNQUIA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	46
FIGURA 32 - MXR EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>C.FLUMINEA</i> MANTIDOS POR 1 OU 2 SEMANAS <i>IN SITU</i>	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – IQAS MÉDIO, MÁXIMO E MÍNIMO DO LAGO IGAPÓ III CALCULADOS PELO IAP, ATRAVÉS DE DADOS OBTIDOS EM SETE AMOSTRAGENS EM 2007 E 2008.....	11
TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS PARA CÁLCULO DE IQA PELO IAP E VALORES MÉDIOS, MÁXIMOS E MÍNIMOS APRESENTADOS NO LAGO IGAPÓ III.	11
TABELA 3 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (C) CALCULADO PARA SEMANAS X PARÂMETROS, EM BRÂNQUIAS E GLÂNDULAS DIGESTIVAS	19
TABELA 4 – IQAS DOS CINCO LOCAIS ESCOLHIDOS PARA SEREM ESTUDADOS NOS ANOS DE 2007 E 2008.....	31
TABELA 5 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DOS LOCAIS ESTUDADOS, BEM COMO DA REFERÊNCIA.....	40
TABELA 6 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS DISSOLVIDOS ($\mu\text{g/L}$) DETECTADA NOS DIFERENTES LOCAIS DE ESTUDO, SIMULTANEAMENTE AOS TESTES <i>IN SITU</i> . 7.....	47

INTRODUÇÃO

1.1 Urbanização e poluição aquática

A população mundial duplicou desde a década de 60 e apresenta, atualmente, aproximadamente 6,9 bilhões de pessoas (PDDESA/UNT, 2009). O aumento da população acarreta em duas principais causas diretas de poluição, a industrialização e a massiva produção de alimentos (FELLENBERG, 1980), e com isso são geradas, proporcionalmente, maiores quantidades de resíduos, sejam eles domésticos ou industriais.

Da população mundial 50,6% reside em áreas urbanas e no Brasil, dos quase 200 milhões de habitantes, 86,5% da população vive em regiões urbanizadas (PDDESA/UNT, 2009). A Figura 1 mostra a taxa de urbanização dos municípios do Centro-Sul brasileiro, onde a maior parte é muito urbanizada ou apresenta urbanização intermediária (BARCELLOS et al., 2006).

Segundo MOTA (1999) o crescimento urbano, na maioria das vezes, ocorre de maneira desordenada, destruindo recursos de valor ecológico e causando poluição no meio ambiente. Um dos principais recursos afetados por este fato é a água. A água é a substância mais abundante na atmosfera, porém apenas uma pequena parte está disponível para utilização humana. Dos quase 1,4 milhão de km³ de água 97,2% está na forma de água salgada, 2,1 % está na forma de neve ou gelo, 0,001% vapor atmosférico e 0,6% de água doce líquida disponível. Deste somente 1,2% se apresentam na forma de rios e lagos e 98,8% águas subterrâneas, das quais metade é inviável para utilização humana devido à profundidade (> 800 m). No Brasil, a disponibilidade hídrica é de 177.900 m³.s⁻¹, sendo destes 72% apenas na Bacia

Amazônica e 7% na Bacia do Paraná (SETTI, 1994). Estes dados alertam para a necessidade de prevenção à contaminação destes recursos.

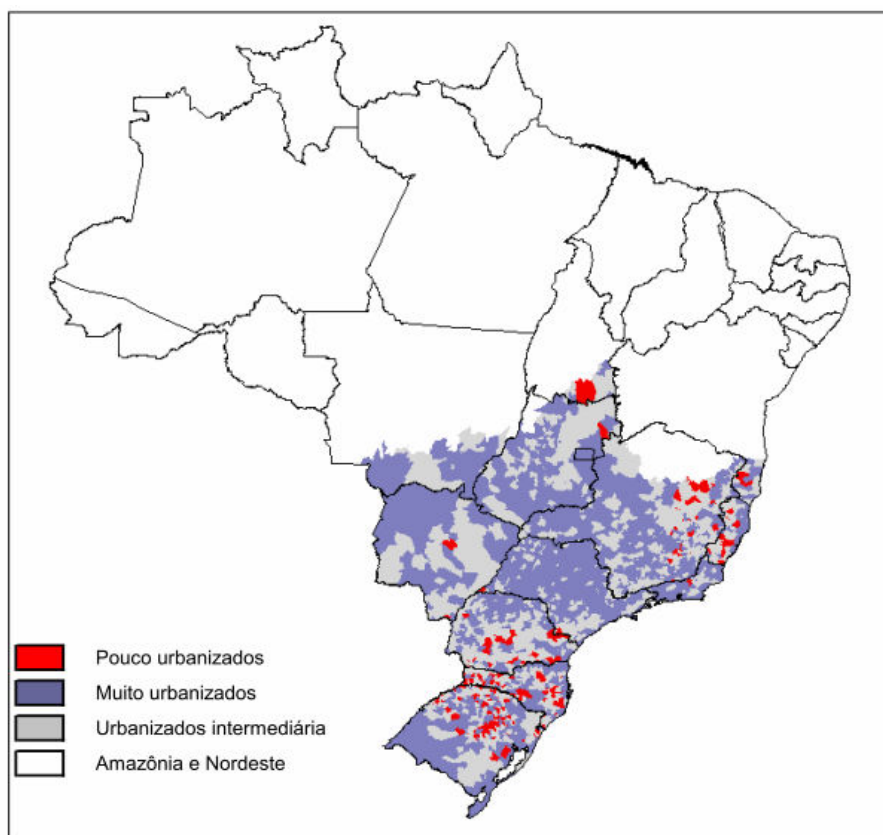


Figura 1 – Municípios do Centro-Sul segundo taxa de urbanização. Fonte: Barcellos et al. (2006) através de dados do IBGE (2000).

Existem basicamente dois tipos de fontes de contaminação das águas urbanas: as não localizadas ou difusas e as localizadas ou pontuais. Dentre as não localizadas estão as águas de escoamento superficial, que tem uma composição bastante variável, dependendo principalmente das características do meio e das atividades desenvolvidas pelo homem na área. Ainda entre as não localizadas estão as águas de infiltração, que podem estar contaminadas por fossas, vazamentos de redes de distribuição de esgoto, resíduos de depósitos de lixo, práticas agrícolas, vazamentos de canalizações e armazenamento de produtos químicos, como combustíveis, cemitérios, entre outros. Dentre as fontes localizadas estão principalmente os lançamentos de esgotos domésticos e industriais (MOTA, 1999).

Devido aos fatores de contaminação que as águas urbanas sofrem é adequado que estudos de monitoramento sejam feitos nestas áreas. O monitoramento consiste em realizar medidas sistemáticas de diversos parâmetros durante um determinado período de tempo com objetivo de coletar dados suficientes para acessar a qualidade de determinado ambiente. Estes dados incluem observação e análise de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Nos parâmetros biológicos está incluído o uso regular de bioindicadores, ou seja, espécies que apresentam alterações em parâmetros ao nível de organismo que indicam mudanças ambientais ou a qualidade da água (RAND et al., 1995). Estes parâmetros são chamados biomarcadores.

1.2 Biomarcadores

Os biomarcadores são definidos como variações induzidas por xenobióticos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (DEPLEDGE et al., 1995). Eles constituem importantes ferramentas para monitorar o equilíbrio do ecossistema aquático e têm sido empregados em diversos programas de monitoramento em vários países (WALKER, 1996).

Uma das características mais importantes dos biomarcadores moleculares e celulares é que eles têm o potencial de antecipar mudanças em níveis de organização biológica superiores, como populações, comunidades ou ecossistemas. Este aviso antecipado oferecido pelos biomarcadores pode ser usado de uma maneira preventiva, permitindo que estratégias de remediação possam ser desenvolvidas antes que ocorram danos ambientais e ecológicos irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000). Desta forma, devem ser selecionados biomarcadores capazes de indicar se o organismo foi exposto a poluentes (biomarcadores de exposição) e/ou se a magnitude da resposta ao poluente afeta o bem estar do

organismo (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000; MONSERRAT et al., 2007).

As adaptações apresentadas pelos organismos frente à estressores químicos, a fim de manter a homeostase fisiológica e a integridade estrutural e funcional do indivíduo (MANDUZIO et al., 2005), podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição. Biomarcadores de exposição frequentemente utilizados são enzimas de biotransformação, parâmetros relacionados às defesas antioxidantes ou ainda mecanismos de defesa dos organismos contra a acumulação de xenobióticos. Muitas vezes, os mecanismos mencionados não são suficientes e, por isso, a contaminação ambiental pode ser causa de diversos tipos de danos aos organismos, que são considerados biomarcadores de efeito.

Parte-se do conceito de que um animal quando exposto à contaminação, inicia um processo de biotransformação do(s) contaminante(s). O processo tem por objetivo converter um composto lipofílico em um composto mais solúvel em água, que é excretado mais facilmente (VAN DER OOST et al., 2003). A biotransformação ocorre normalmente em duas fases. Na primeira fase ou fase I há participação de uma superfamília de enzimas denominada citocromo P450. A reação básica catalisada é a monooxigenação, onde um oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, presente no xenobiótico. Esta fase geralmente é medida pelo ensaio da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que representa a atividade do citocromo P450 (subfamília CYP1A). Na fase II as enzimas Glutathione S transferase (GST) e UDP Glicuronil transferases (UDPGT) catalisam as reações de conjugação com xenobióticos pela adição de grupamentos mais polares como o tripeptídeo glutathione (GSH) ou o ácido glicurônico, respectivamente (MARTINEZ, 2006). A

enzima GST é extensamente utilizada como biomarcador em estudos com moluscos bivalves (FRANCO et al., 2006, ROCHER et al., 2006, RICHARDSON et al., 2008).

Durante a biotransformação de xenobióticos pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion radical superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio. Estas são átomos ou moléculas eletricamente instáveis, potencialmente reativas com moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos, podendo causar a morte celular (MANDUZIO et al., 2005). Para prevenir danos celulares os organismos aeróbicos apresentam mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, de defesa antioxidante. As principais enzimas que participam deste sistema são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx). Quanto aos antioxidantes não-enzimáticos inclui-se a glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E) (MARTINEZ, 2006).

A GSH é o principal antioxidante não-enzimático. A glutathione está presente nas células principalmente na forma reduzida e um aumento na proporção da forma oxidada (GSSG) indica estresse oxidativo. A GSH exerce várias funções, dentre elas a função antioxidante que protege as células contra ERO, sustenta indiretamente a detoxificação de ERO pela enzima GPx como co-substrato e participa também como co-substrato da enzima de biotransformação GST. Portanto, este composto é um elemento central da defesa antioxidante (HERMES-LIMA, 2004, MANDUZIO et al., 2005).

O sistema de defesa antioxidante trabalha de forma cooperativa e, assim, determinar a capacidade antioxidante total de um tecido pode promover um entendimento melhor da toxicidade causada pelas ERO. Além disso, essa medida pode esclarecer a possível diferença da capacidade antioxidante dos diferentes tecidos

do animal (AMADO et al., 2009). Trabalhos recentes trazem este parâmetro como biomarcador (CRAVO, 2006, MONSERRAT et al., 2007, KALOYIANNI et al., 2009).

O sistema de defesa antioxidante pode não ser suficiente para combater as ERO, sendo assim estabelece-se um desequilíbrio pró-oxidante celular, denominado de estresse oxidativo. Quando a célula encontra-se neste estado podem ocorrer danos celulares e teciduais. A ação das ERO mais estudada é a lipoperoxidação, que ocorre por uma reação em cadeia iniciada, principalmente, pelo radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Os danos causados pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de lipoperoxidação tecidual (WILHELM FILHO, 1996). Como conseqüências deste dano podem-se observar a redução na fluidez de membranas biológicas, inativação de receptores e enzimas de membrana e o aumento da permeabilidade da mesma (MANDUZIO et al., 2005). Um dos produtos finais deste processo é o malonaldeído (MDA), que pode ser mensurado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido (HERMES-LIMA, 2004). Diversos estudos já evidenciaram o aumento do nível de lipoperoxidação em vários tecidos de bivalves expostos a uma variedade de contaminantes (ALMEIDA et al., 2005; FRANCO et al., 2006).

Outro parâmetro que vem sendo bastante usado é o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), que pode ser quantificado através da concentração de Rodamina B. Esta resistência é dada pela presença de proteínas, como as glicoproteínas-P (P-gp), que são ATP-dependentes e transportam uma variedade de compostos através da membrana celular. (KURELEC et al., 1996).

1.3 *Corbicula fluminea*

Bivalves dulcícolas da espécie *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia, Corbiculidae) (Figura 2) são considerados adequados para o monitoramento

ecotoxicológico por serem animais bentônicos sedentários, possuem capacidade de filtrar grandes volumes de água, acumulando uma ampla gama de contaminantes (NARBONNE et al., 1999), assim podendo refletir os efeitos de poluentes presentes no ambiente (RIGONATO; MANTOVANI; JORDÃO, 2005).

C.fluminea é uma espécie invasora, nativa do sudeste asiático, que foi introduzida no Brasil, acidentalmente, na década de 70 no Rio Grande do Sul. Já foi identificada também em estados como Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (INSTITUTO HÓRUS, 2009).



Figura 2 - *Corbicula fluminea*.

CAPÍTULO I - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BIVALVE *Corbicula fluminea* APÓS A COLETA EM UM LAGO URBANO E DURANTE DEPURAÇÃO

RESUMO

O monitoramento de águas superficiais urbanas pode ser feito através do estudo de biomarcadores. Estes são parâmetros determináveis em sistemas biológicos, cujas alterações são induzidas por xenobióticos e indicam a presença de contaminantes no ambiente. A utilização de biomarcadores para estudo de locais impactados exige uma amostragem controle, que consiste, teoricamente, em um local livre de contaminação, muitas vezes ausente em microbacias urbanas. No presente trabalho, a depuração em laboratório foi estudada como possível alternativa ao grupo controle. Bivalves *C. fluminea* foram coletados num lago urbano e aclimatados por no máximo quatro semanas. Os biomarcadores glutathione S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), lipoperoxidação (TBARS), capacidade antioxidante total (CANT) e atividade do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) foram avaliados nos animais recém-coletados e a cada semana de depuração em brânquias e glândulas digestivas dos bivalves. Houve diminuição em todos os parâmetros na glândula digestiva, porém poucas alterações foram observadas nas brânquias. Os resultados indicam que os animais coletados no lago urbano estavam com suas defesas ativadas e estresse oxidativo estabelecido e a depuração promoveu redução desta condição. Sendo assim, acredita-se que animais mantidos em condições de laboratório podem representar um bom grupo controle.

Palavras-chave: *C. fluminea*, biomarcadores, depuração, lago urbano.

1. INTRODUÇÃO

O uso de biomarcadores exige que os animais bioindicadores expostos à determinada contaminação sejam comparados com animais controle. Em trabalhos de campo usualmente são escolhidos locais de referência, que, teoricamente, são livres de fontes de contaminação. Porém, o acesso a locais com estas características pode ser muito restrito ou em alguns casos ausente. Este fato leva a necessidade do estudo de alternativas consistentes que possam substituir um local de referência.

Parâmetros físico-químicos da água, tais como condutividade, oxigenação, pH e temperatura podem influenciar nas respostas de biomarcadores, como no trabalho de Vidal et al. (2002) no qual a quantidade de lipoperoxidação e atividade de enzimas envolvidas com as defesas de *C.fluminea* estavam alteradas em diferentes condições dos parâmetros físico-químicos. Em laboratório, estas condições podem ser controladas e propiciam um ambiente de água limpa, disponibilidade de oxigênio, pH, temperatura e condutividade estável. Sendo assim, pode-se considerar uma situação adequada para aclimação e depuração.

A transferência de animais, residentes em local poluído, para condições de laboratório, já foi evidenciada como promotora da recuperação destes animais quanto a parâmetros de estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2007). Esta recuperação mostra que os animais residentes em local poluído apresentavam alterações quanto aos parâmetros avaliados e, com isso, o grupo de animais aclimatados poderia ser utilizado de forma comparativa. Por exemplo, lambaris coletados em um ribeirão urbano e devidamente aclimatados já foram utilizados como grupo controle (SANTANA, 2004).

A comparação entre o grupo de animais recém-coletados e o grupo de animais aclimatados em laboratório torna-se mais interessante do ponto de vista de que os dois grupos constituem uma mesma população natural. Este fator minimiza as diferenças genéticas apresentadas entre os organismos da mesma espécie (REGOLI et al., 1995).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se é possível utilizar os animais aclimatados como um grupo de referência.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a atividade da enzima Glutathione S-Transferase, concentração de glutathione reduzida, lipoperoxidação, capacidade antioxidante total e atividade do mecanismo de resistência à multixenobióticos em bivalves dulcícolas, da espécie *C. fluminea*, recém-coletados em um lago urbano;

Avaliar o comportamento destes parâmetros no decorrer de quatro semanas de depuração;

Verificar se quatro semanas é um período suficiente para que níveis basais dos parâmetros sejam observados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram coletados espécimes de *C. fluminea* (n = 60), com peso médio de $6,84 \pm 1,34$ g e comprimento e largura de $2,96 \pm 0,21$ x $2,57 \pm 0,18$ cm, respectivamente (Média \pm DP).

3.2 Local de coleta

C. fluminea foram coletados no lago Igapó III (Figura 3). Este lago localizado no município de Londrina, PR, foi construído no ano de 1957 juntamente com outros três lagos, que estão inseridos na microbacia do ribeirão Cambé. Trata-se

de uma área de recreação e turismo, onde ocorre freqüentemente a pesca e contato primário com a água.

O lago sofre interferência antrópica, principalmente pelo assoreamento e carreamento de contaminantes através de águas pluviais. Além disso, já foi constatada a presença de esgotos clandestinos que liberam seu conteúdo nas águas deste local.

O Instituto Ambiental do Paraná - IAP classificou a água deste Local como regular (TI Solution – GeoAmbiental, 2009), tendo o mesmo IQA (Índice de Qualidade de Água) médio apresentado na **Tabela 1**. Os parâmetros avaliados estão listados na Tabela 2, na qual são apresentados valores médios, máximos e mínimos observados pelo IAP durante o período de estudo.

Tabela 1 – IQAs médio do Lago Igapó III calculados pelo IAP, através de dados obtidos em sete amostragens em 2007 e 2008. Os valores entre parênteses equivalem a faixa de variação encontrada nas amostragens.

Local	IQA médio
Lago Igapó III	43,42 (28,74 – 69,38)

Tabela 2 – Parâmetros avaliados para cálculo de IQA pelo IAP e valores médios, máximos e mínimos apresentados no Lago Igapó III.

Parâmetros	Média ± DP	Máximo	Mínimo
Oxigênio dissolvido (OD)	6,24 ± 2,78	9,28	2,44 mg/L
Temperatura	23,03 ± 2,71	24,7	19,9 °C
Coliformes fecais	513157 ± 778256	1700000	1100 NPM
pH	7,13 ± 0,36	7,80	6,90
Fósforo total	0,08 ± 0,03	0,13	0,047 mg/L
Sólidos dissolvidos totais	106 ± 38	184	68 mg/L
Turbidez	21,46 ± 26,21	78,20	3,00 N.T.U.
Nitrogênio total	0,60 ± 0,23	0,85	0,24 mg/L
DBO	4,43 ± 0,79	5,00	3,00 mg O ₂ /L



Figura 3 – Coleta de *C.fluminea* no Lago Igapó III.

3.3 Teste de depuração

Depois de coletados os bivalves foram transportados para o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina em recipientes plásticos com um volume de água do próprio lago. No laboratório foi sacrificado, de imediato, um grupo de animais para as análises de biomarcadores. Este grupo foi denominado 'Semana 0'.

Os animais restantes foram mantidos em aquários de vidro de 20L (Figura 4), contendo 10L de água e uma camada de cascalho de aproximadamente 2 cm de espessura. A água dos aquários estava desclorada e aerada com condições controladas de temperatura. Houve renovação completa desta água a cada sete dias e foi oferecida aos animais ração para peixe extrusada de duas a três vezes por semana aos animais.

A cada semana mais um grupo de *C.fluminea* foi sacrificado e amostrado, até completar a quarta semana. Com isso, foram formados cinco grupos: 'Semana 0', 'Semana 1', 'Semana 2', 'Semana 3' e 'Semana 4'.

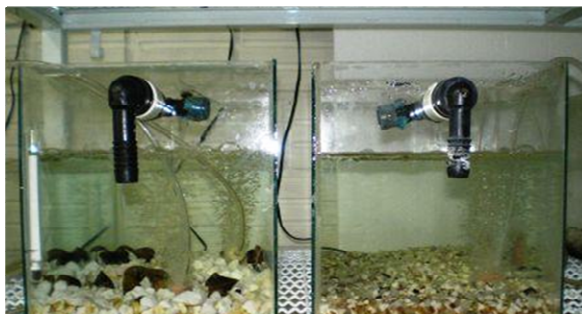


Figura 4 – Aquários de vidro de 20L, onde os animais foram mantidos durante o período de depuração.

3.4 Obtenção de amostras e armazenamento

Os animais foram sacrificados através do rompimento do músculo adutor anterior. As brânquias e glândulas digestivas (Figura 5) foram removidas com auxílio de pinça e tesoura, sendo que estes órgãos foram utilizados para diferentes análises. É importante esclarecer que a glândula digestiva não é facilmente diferenciada de tecidos adjacentes a ela, e por isso a denominação de glândula digestiva utilizada no presente trabalho refere-se ao tecido glandular adicionado de tecidos adjacentes.

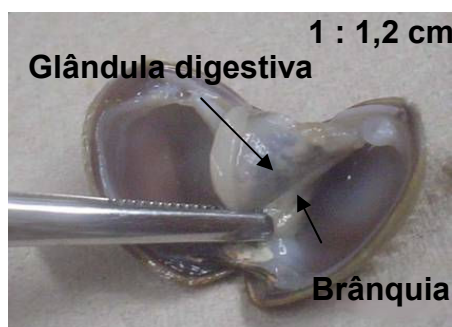


Figura 5 - *C.fluminea* aberto. As setas indicam a localização de uma brânquia do animal e a glândula digestiva, que fica localizada internamente ao manto.

A fração que foi utilizada para determinação da enzima glutathione S-transferase, da glutathione reduzida e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico sofreu homogeneização (homogeneizador TECNAL TE-103, Brasil) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0, com posterior centrifugação a 8870 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-80°C). As análises da capacidade

antioxidante total e da atividade de proteínas resistentes à multixenobióticos (MXR) foram feitas de imediato, após o sacrifício dos animais. Seis animais foram utilizados exclusivamente para MXR, enquanto os outros seis usados para as demais análises.

3.5 Biomarcadores de estresse oxidativo

3.5.1 Glutamina-S-transferase (GST)

A GST foi determinada através do método descrito por Keen et al. (1976). A atividade desta enzima foi medida em espectrofotômetro (Biochrom LIBRA S32), no comprimento de onda 340 nm. Na reação ocorre a complexação da glutatona reduzida com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi expressa por mg.mL^{-1} de proteína nas amostras.

3.5.2 Glutaciona reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi determinada pela reação da glutaciona reduzida com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), num meio contendo NADPH e Glutaciona Redutase (GR), a 412 nm, pelo método de Baker et al. (1990). A concentração de GSH foi expressa por mg.mL^{-1} de proteína nas amostras.

3.5.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com Federici (2007) foi utilizado como medida indireta de lipoperoxidação, o qual mede a quantidade de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, pela leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm). A concentração de TBARS foi expressa por mg.mL^{-1} de proteína nas amostras.

3.5.4 Capacidade antioxidante total (CANT)

A capacidade antioxidante total foi medida através do método proposto por Amado et al. (2009). Os tecidos foram homogeneizados (1:4 – m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) com EDTA 2 mM e Mg^{2+} 5 mM e centrifugados a 8870 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi diluído para concentração de 1 $mg \cdot mL^{-1}$ de proteína na microplaca. O método baseia-se na detecção de ERO por fluorescência (ex/em:485/520 nm) utilizando 2'7'-diclorofluorescina diacetato ($H_2DCF-DA$) como substrato. Radicais peroxil são gerados pela decomposição a 35°C de 2,2'-azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP), sendo que a mesma amostra é submetida à presença e ausência de ABAP. A leitura de fluorescência emitida pela reação entre as ERO e o $H_2DCF-DA$ foi feita por um fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer), monitorada durante 30 minutos (uma leitura a cada 5 minutos). A capacidade antioxidante total foi calculada pela diferença entre as áreas dos gráficos obtidos das leituras de unidade de fluorescência com presença e ausência de ABAP.

3.6 Mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR)

O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) foi avaliado a partir do ensaio de acumulação do fluorescente Rodamina B (substrato de P-gp) de acordo com Kurelec et al. (2000). Os animais foram mantidos *in vivo* em uma solução contendo 2,5 μM do fluorescente Rodamina B por um período de 2 horas, sem nenhum artifício que mantivesse suas valvas abertas. Os tecidos foram homogeneizados em água destilada (1:7 – m/v), centrifugados a 985 g por 7 minutos. A fluorescência referente ao acúmulo de rodamina foi medida (ex/em: 544/590 nm) por um fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer), e as concentrações determinadas através de uma curva padrão. Os dados foram expressos por mg de tecido úmido.

3.7 Concentração de proteínas nas amostras

A concentração de proteínas foi determinada pelo Método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com soro albumina bovina (BSA). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm.

3.8 Análises estatísticas

As médias dos dados obtidos nas diferentes semanas de depuração foram comparadas através de análise de variância paramétrica (ANOVA), seguido por um teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey) quando indicado, ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Além disso, foi calculado o Coeficiente de Correlação de Pearson para avaliar a correlação entre o tempo (semanas de depuração) e a variação dos parâmetros. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. A análise estatística foi feita com auxílio do software SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS

Durante o período de depuração, quando os animais foram mantidos em laboratório, não houve mortalidade. Foram medidos os cinco biomarcadores para cada grupo de animais nas brânquias e glândulas digestivas. Não foi possível realizar as análises do MXR para a semana 1.

4.1 Biomarcadores de estresse oxidativo

Nas glândulas digestivas as alterações dos parâmetros de estresse oxidativo foram bastante evidentes (Figura 6) e indicaram que os parâmetros estavam em níveis elevados nos animais recém-coletados (Semana 1). Os resultados

mostraram que em glândula digestiva a atividade da enzima GST é pelo menos três vezes maior do que nas brânquias. Considerando-se todos os valores obtidos, em todas as semanas, o valor médio (média \pm desvio padrão) da atividade da enzima em brânquias é $53,94 \pm 14,88$ e na glândula digestiva $230,16 \pm 77,60$ $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Na 1ª semana de depuração a glândula digestiva apresentou uma diminuição significativa da atividade da GST em relação aos animais recém-coletados (Semana 0), e essa enzima apresentou tendência de decréscimo até a semana 4. O Coeficiente de Correlação de Pearson (C) indicou que houve correlação negativa entre o tempo de depuração e a atividade da GST (Tabela 3).

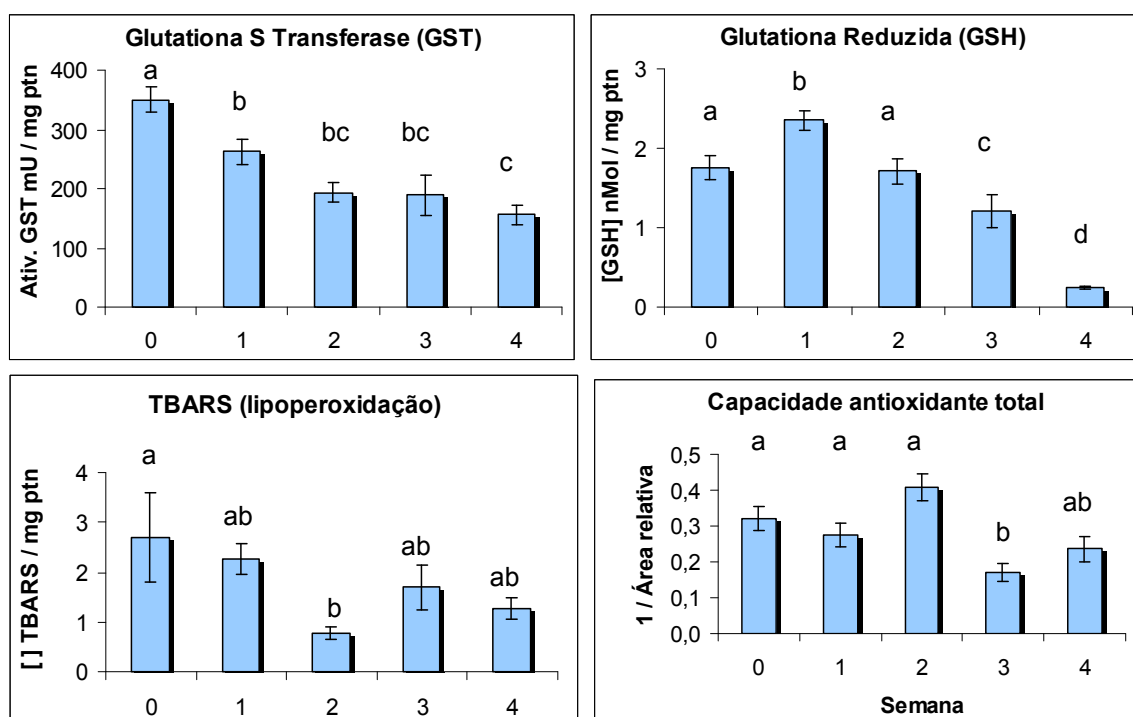


Figura 6 - Parâmetros de estresse oxidativo em glândula digestiva de *C. fluminea* recém-coletados (Semana 0) e aclimatados durante 1, 2, 3 ou 4 semanas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. As barras equivalem a média e as linhas verticais ao EP (n = 6).

Pode-se observar, também nas glândulas digestivas, um aumento da concentração de GSH na Semana 1 que, apresentou uma redução progressiva nas semanas seguintes (Figura 6). Também foi constatada uma correlação negativa

significativa entre o conteúdo de GSH na glândula digestiva e o tempo de depuração, a partir da 1ª semana (Tabela 3).

A concentração de TBARS apresentou tendência à diminuição nos dois tecidos, porém essa tendência não foi significativa. Em glândulas digestivas houve correlação entre a tendência de diminuição da lipoperoxidação e o tempo de depuração, quando retirado os dados da Semana 2 (Tabela 3). A CANT apresentou-se diminuída em glândula digestiva na Semana 4.

Em comparação a glândula digestiva, o tecido branquial não apresentou muitas alterações nas quatro semanas de depuração (Figura 7). Houve uma diminuição de alguns dos parâmetros na semana 1 que se restabelecem nas semanas seguintes.

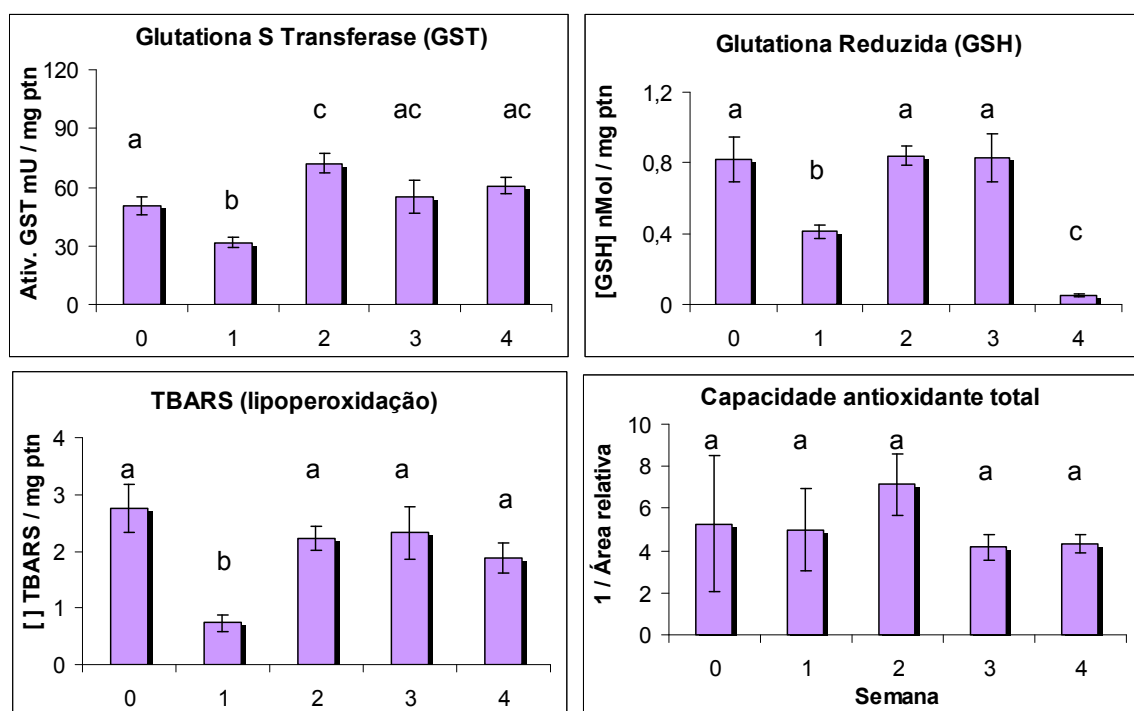


Figura 7 – Parâmetros de estresse oxidativo em brânquias de *C.fluminea* recém-coletados (Semana 0) e aclimatados durante 1, 2, 3 ou 4 semanas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. As barras equivalem a média e as linhas verticais ao EP (n = 6).

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson (C) calculado para Semanas x Parâmetros, em brânquias e glândulas digestivas, considerando-se significância para $P < 0,05$ (*).

	GST	GSH	LPO	CANT
BRÂNQUIA	C = -0,030 P = 0,955	C = -0,502 P = 0,388	C = -0,035 P = 0,955	C = 0,482 P = 0,411
GLÂNDULA DIGESTIVA	C = -0,942 P = 0,016 *	C = -0,990 P = 0,009*	C = -0,996 P = 0,004*	C = 0,544 P = 0,344

4.2 MXR

Os resultados do MXR obtidos para *C.fluminea* nos dois tecidos avaliados estão na Figura 8. Na glândula digestiva houve aumento de acumulação da Rodamina B na Semana 2. Este aumento da acumulação do fluorescente representa um decréscimo do MXR. Nas brânquias, na Semana 4, foi observado aumento do MXR.

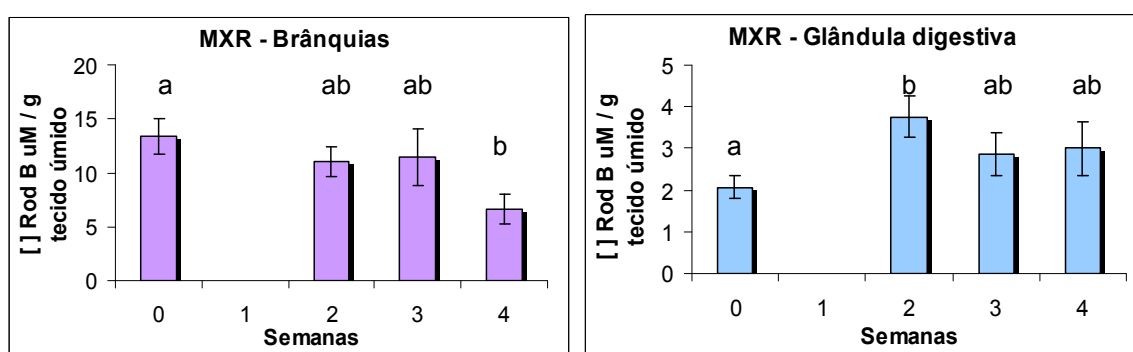


Figura 8 – Mecanismo de resistência à multixenobióticos (MXR) em brânquias (à esquerda) e glândula digestiva (à direita) de *C.fluminea* recém-coletados (Semana 0) e aclimatados durante 1, 2, 3 ou 4 semanas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. As barras equivalem a média e as linhas verticais ao EP (n = 6).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram estudados cinco biomarcadores em bivalve *C.fluminea* coletados num lago urbano e mantidos por um período de quatro semanas em água limpa no laboratório. A análise de biomarcadores bioquímicos é importante devido à necessidade de melhor caracterização das alterações causadas

nos organismos durante exposição a poluentes e no período de recuperação em água limpa (BAUDRIMONT et al., 2002).

Assume-se que os resultados obtidos para cada parâmetro na Semana 0 (grupo de animais recém-coletados) correspondem aos níveis de defesa de *C.fluminea* necessários para que a população sobreviva e se reproduza no local de coleta. Esta defesa pode atingir um nível basal quando ocorre a melhora da qualidade da água, por exemplo, transpondo os animais para uma água limpa em laboratório (PAIN et al., 2007).

No presente trabalho constatou-se que a glândula digestiva foi o tecido que mais apresentou alterações durante o período de depuração em *C.fluminea*. Isto significa que este foi o tecido mais sensível e que mais respondeu às alterações da qualidade da água do lago urbano avaliado, como em bivalves *Unio tumidus* (COSSU et al., 2000).

A atividade da enzima GST em *C.fluminea* é quatro a cinco vezes mais elevada em glândula digestiva em relação às brânquias. Em contraste, no trabalho de Almeida et al. (2005), a atividade da GST no bivalve marinho *Perna perna* é quatro vezes maior em brânquia que em glândula digestiva. Este autor relaciona a maior atividade da GST em brânquias pelo fato de que este tecido está em contato direto com o ambiente e, por isso, espera-se que seja mais ativo na excreção. Esta discrepância pode ocorrer devido ao tecido da glândula digestiva ser muito conectado ao tecido gonadal em *C.fluminea*. As brânquias estão em contato direto com a água e por isso são expostas diretamente a diversos contaminantes e por isso possuem alguma capacidade de detoxificação. Porém, a glândula digestiva de *C.fluminea* é o principal órgão de detoxificação, sendo análogo ao fígado de vertebrados (VIDAL et al., 2002).

A atividade da enzima GST em glândula digestiva diminuiu progressivamente no decorrer das semanas de depuração, o que significa que os animais recém-coletados estavam com a atividade da enzima elevada. O aumento desta pode estar relacionado com a presença de diversos contaminantes em bivalves, como PAHs (hidrocarbonetos poliaromáticos) (GOWLAND et al., 2002), óleo diesel (SILVA et al., 2005), compostos organoclorados (HOARAU et al., 2004) e cobre (CANESI et al., 1999). Os resultados observados de GSH parecem estar relacionados com a redução da GST. Na primeira semana de depuração houve aumento de GSH, que possivelmente deu-se devido à diminuição da GST já neste período, mas depois se manteve a tendência à redução. A GSH, além de agir como uma molécula antioxidante, é substrato da GST. Estes resultados mostram que os mecanismos de defesa estavam ativos em *C.fluminea* e no decorrer das semanas de depuração a menor exigência destes refletiu numa redução destes parâmetros.

Dados de Ferreira et al. (2007) corroboram com os resultados observados no presente trabalho. Os autores citados observaram a capacidade da tainha de recuperar danos oxidativos induzidos pela presença de poluentes. Estes peixes foram coletados num local contaminado por PAHs, PCBs e DDT e posteriormente foram mantidos em laboratório para depuração. Foi observada diminuição no primeiro mês de parâmetros de estresse oxidativo, bem como a lipoperoxidação.

Um estudo realizado por Bergayou et al. (2009) tinha o objetivo de testar a resposta de lipoperoxidação, através do TBARS, como biomarcador em duas espécies de bivalve, *Cerastoderma edule* e *Scrobicularia plana*, residentes do estuário de Oued Souss, em Agadir no Marrocos. Por muito tempo este estuário foi sujeito a uma larga escala de despejos industriais e de esgoto. A partir de novembro de 2002

iniciou-se um projeto de eliminar todas essas fontes de poluição. Foram, então, comparadas as respostas desses animais no período anterior e posterior ao fim deste projeto. O estudo mostrou que posteriormente à eliminação de tais fontes poluidoras, os bivalves apresentavam níveis significativamente mais baixos de lipoperoxidação. Este resultado corrobora com o presente trabalho, onde os níveis de lipoperoxidação apresentaram tendências de diminuição, quando os animais foram mantidos em um meio mais favorável e sem fontes de contaminação.

No presente trabalho o maior acúmulo de Rodamina indicou a redução do MXR em glândula digestiva na Semana 3 do período de depuração. Pain et al. (2007) observaram redução do MXR em bivalves dulcícolas *Dreissena polymorpha* coletados no campo após nove dias de depuração em laboratório. Segundo estes autores, o tempo de depuração para que haja redução do MXR é variável e depende da espécie que está sendo estudada.

6. CONCLUSÕES

A depuração de *C.fluminea* mostrou-se, para este local, ser uma forma satisfatória de obtenção de um grupo de referência. Os parâmetros puderam ser avaliados pela comparação entre os animais recém-coletados e os animais aclimatados. Os biomarcadores GST e GSH, nas glândulas digestivas, foram os parâmetros que apresentaram maiores alterações, indicando que estes estavam bastante elevados nos animais coletados no lago urbano avaliado. Porém, os demais parâmetros também apresentaram diminuições durante o período de depuração neste tecido.

A glândula digestiva foi o tecido mais sensível nos testes feitos. Porém estudos em diferentes locais poderiam apresentar resultados distintos, pois a resposta ao estresse químico depende do tipo e da escala de poluição, da biodisponibilidade

dos poluentes e da rota de entrada do xenobiótico no organismo e, portanto, um tecido não pode ser considerado mais sensível que o outro (COSSU et al., 2000).

É provável que, no tecido branquial, os parâmetros avaliados não estivessem elevados nos animais residentes no lago urbano, de modo que os valores encontrados possam ser considerados basais. Já em glândula digestiva reduções na GST e GSH até a Semana 4, não permitem uma conclusão quanto aos valores basais deste biomarcadores neste tecido. CANT, TBARS e MXR apresentaram alterações na Semana 2 ou 3 e, posteriormente, parece que os valores se mantêm.

Estudos devem ser realizados em outros pontos de coleta para que se estabeleçam padrões de variações entre os biomarcadores estudados em bivalves *C. fluminea*.

CAPÍTULO II – BIOMARCADORES NO BIVALVE *Corbicula fluminea*: APLICAÇÃO NO ESTUDO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE UMA MICROBACIA URBANA.

RESUMO

A contaminação de águas superficiais urbanas pode ocorrer por fontes difusas, através do escoamento superficial ou infiltração, ou pontuais, através do despejo de resíduos industriais ou domésticos. O monitoramento dessas águas geralmente é feito através de parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos e os parâmetros biológicos, como biomarcadores, devem ser estudados para possível complementação dessas análises tradicionais. No presente trabalho, os biomarcadores glutathione S-transferase (GST), etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), glutathione reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade antioxidante total (CANT) e atividade do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), foram analisados em bivalves *C. fluminea* submetidos a testes *in situ* por uma ou duas semanas em quatro locais da microbacia do ribeirão Cambé, Londrina, PR, Brasil. Os quatro locais apresentam Índices de qualidade de água variados e fontes de contaminação distintas. Na estação de tratamento de esgoto (ETE) jusante os animais apresentaram aumento do GST e diminuição da TBARS em dois dias de exposição. No Córrego dos Periquitos ocorreu diminuição da CANT, TBARS e aumento da GSH nos tecidos dos animais estudados. No ETE montante foi observado aumento da EROD, GSH e diminuição do MXR. Os resultados mostraram que os biomarcadores estudados apresentaram alterações mesmo em locais considerados bons e que são ferramentas importantes e que complementam o diagnóstico da qualidade da água.

Palavras-chave: *C. fluminea*, biomarcadores, monitoramento, microbacia urbana.

1. INTRODUÇÃO

As microbacias urbanas recebem diversas fontes de contaminação, difusas e pontuais, relacionadas à presença humana, tais como água de escoamento superficial, de infiltração de resíduos de aterros e lixões, infiltração de vazamentos de postos de combustíveis, despejos de efluentes industriais e domésticos. Isto reflete na complexidade de compostos xenobióticos nas águas superficiais urbanas, que causam alterações nestes ecossistemas. Em conseqüência, é importante que o monitoramento da qualidade dessas águas seja feito e medidas preventivas sejam tomadas.

1.1 Caracterização da área de estudo

1.1.1 Município de Londrina

O município de Londrina está localizado na latitude entre 23°08'47" e 23°55'46" Sul e longitude entre 50°52'23" e 51°19'11" Oeste, ocupa uma área de 1.650,809 Km² e apresenta altitude de 608 metros, aproximadamente (PML, 2009). Londrina é uma cidade nova (75 anos) que teve um crescimento muito grande em pouco tempo. Dados do IBGE mostram que desde 1991, Londrina teve um aumento de mais de 20% da sua população total, sendo que a população urbana cresceu em torno de 1% ao ano enquanto a população rural decaiu.

O clima da região é classificado, segundo Koeppen, como Cfa (h)¹⁴, correspondendo a um clima pluvial quente-temperado, sempre úmido, com precipitação anual acima de 600 mm anuais e o mês mais quente apresenta temperaturas acima de 22°C (MAACK, 2002).

1.1.2 Microbacia Ribeirão Cambé

A microbacia estudada no presente trabalho foi a do ribeirão Cambé (Figura 9). Esta atravessa o município de Londrina no sentido oeste-leste entre as coordenadas geográficas 23°16' e 23°22' S e 51°14' e 51°02' O. Apresenta área total de 76 km² e cerca de 27 km de curso principal. A nascente fica no cruzamento entre as rodovias BR-369 e PR-445, que corresponde à área limítrofe entre os municípios de Londrina e Cambé e a foz do ribeirão deságua no ribeirão Três Bocas. A microbacia conta com vinte e seis afluentes (GONÇALVES, 2008).

Alguns trabalhos dividem a microbacia em três compartimentos baseando-se na declividade ou estrutura da paisagem. O primeiro trata-se da região mais a montante que ocupa 33,5% da microbacia. Tem baixa à média declividade e

poucos tributários, apresentando, portanto, uma textura de pouca drenagem. O segundo compartimento corresponde à área onde estão localizados os lagos Igapó e ocupa área de 35% da microbacia. É a região com maior intensidade de ocupação urbana, com baixa a média declividade. O compartimento 3 ocupa 33%, apresenta declividades mais acentuadas e é a região que abrange a área rural da microbacia (GONÇALVES, 2008).

Da área total da microbacia, 50 km² são de drenagem urbana e 15 km do percurso principal está inserido em área urbana (GONÇALVES, 2008). A microbacia do ribeirão Cambé faz parte da bacia do rio Tibagi, estando inserida na região denominada de Baixo Tibagi, que é uma área de intensa produtividade agrícola, forte urbanização e elevada degradação ambiental (STIPP, 2000).

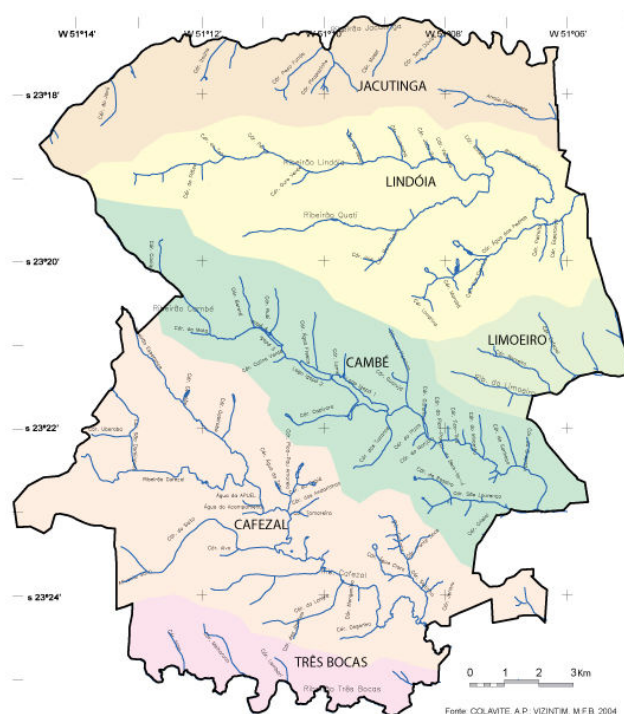


Figura 9 – Bacias hidrográficas da cidade de Londrina. Destaque para a microbacia do ribeirão Cambé, em verde, localizada na região central com maior urbanização. Fonte: AMAP&P (2008).

A microbacia do ribeirão Cambé, devido a sua localização, é um exemplo bastante claro de um local que sofre interferências antrópicas. Na área da microbacia ocorrem 761 estabelecimentos industriais, principalmente na vertente

esquerda do Ribeirão (GONÇALVES, 2008). Já foram evidenciadas presenças de esgotos domésticos clandestinos que desembocam em suas águas. Além disso, o Ribeirão Cambé recebe águas residuais de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) e um de seus afluentes sofre contaminação devido à proximidade com o aterro controlado do município de Londrina.

Yabe e Oliveira (1998) constataram altas concentrações de metais nas águas do Ribeirão Cambé, já na porção mais superior do rio. Ao longo de todo percurso estudado houve a presença sistemática dos elementos chumbo, níquel, cádmio, cromo, e cobre induzidos por fontes cuja origem está na urbanização e industrialização, além de ferro, alumínio, manganês, cálcio e mercúrio como produto, principalmente, do carreamento de partículas através das águas de escoamento superficial. No trabalho de Winkaler et al. (2001) lambaris coletados no ribeirão Cambé apresentaram alterações histopatológicas severas. Apesar disto, este ribeirão é utilizado em atividades recreativas pela população do município. Devido a estes fatos, é importante realizar monitoramento da qualidade da água nesta área.

1.2 Índice de Qualidade de Água (IQA) na Microbacia do Ribeirão Cambé

O IQA é uma espécie de nota que é atribuída à qualidade da água de um determinado local, podendo variar de 0 a 100. O Índice é determinado através da análise de nove parâmetros, físicos, químicos e bacteriológicos: oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes fecais, temperatura, pH, nitrogênio total, fósforo total, sólidos totais e turbidez. A qualidade da água pode ser classificada de acordo com o IQA, nas seguintes categorias: Ótimo $79 > IQA > 100$; Bom $51 > IQA > 79$; Regular $36 > IQA > 51$; Ruim $19 > IQA > 36$ e Péssimo $0 > IQA > 19$.

O IAP – Instituto Ambiental do Paraná coletou em 2007 e 2008 amostras de água de várias bacias dos ribeirões do município de Londrina, incluindo a

do ribeirão Cambé, e determinou valores de IQA para cada ponto avaliado (TI Solution – Geoambiental, 2009).

As últimas análises divulgadas para a microbacia do ribeirão Cambé mostram que o leito principal desta tende a IQAs mais baixos no sentido montante-jusante. No compartimento 1 (mais à montante) da microbacia todos os cinco pontos avaliados apresentaram boa qualidade de água. No compartimento 2 (região dos lagos Igapó) alguns tributários tiveram suas águas classificadas como boas, mas as águas dos lagos foram classificadas como regulares. No compartimento 3 (mais à jusante; área rural) a água volta a ser boa, porém devido a fontes localizadas (Estações de tratamento de esgoto) e não localizadas (depósito controlado de lixo) diretas a água logo passa a ser ruim e deságua no ribeirão Três Bocas.

1.3 Parâmetros biológicos

O IQA considera parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos que representam uma avaliação pontual da qualidade da água e são considerados pouco eficientes para a avaliação das qualidades estética, recreativa e ecológica dos ecossistemas aquáticos (COSTA et al., 2008). A análise de parâmetros biológicos, como os biomarcadores, pode complementar e enriquecer as análises mais tradicionais, já que reflete um período prolongado das condições ambientais. Para que estes possam ser utilizados de forma eficiente, é necessário estudar a relação deles com a qualidade da água determinada por índices de qualidade.

2. OBJETIVOS

Avaliar a eficácia de alguns biomarcadores numa espécie de bivalve dulcícola.

Comparar diferentes pontos da microbacia do ribeirão Cambé, quanto às alterações observadas dos biomarcadores.

Verificar se há relação entre valores de IQA e alterações dos biomarcadores estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Bivalves da espécie *C. fluminea* (n = 140) foram coletados no lago Igapó III e utilizados nos testes *in situ*. Um grupo foi transferido para laboratório e mantido em condições de laboratório, para ser utilizado como referência.

3.2 Testes *in situ*

Os testes *in situ* consistem em testes realizados no próprio local de interesse. No presente estudo, *C. fluminea* foram coletados e transferidos para os locais estudados, onde foram mantidos em câmaras (Figura 10 e 19) desenvolvidas por Meletti e Rocha (2002). Internamente a estas foi adicionado cerca de 8 cm de uma camada de substrato coletado no próprio local, para criar condições adequadas para os animais. Os períodos de teste foram de 1 semana e 2 semanas, formando-se dois grupos a serem avaliados: 'Semana 1' e 'Semana 2'. No ponto ETE jusante foi possível realizar um teste de apenas 2 dias.

No início dos testes e durante as coletas dos animais das câmaras (semana 1 e semana 2) alguns parâmetros físico-químicos da água (pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura) foram medidos dos locais estudados, utilizando-se um analisador de água HANNA HI 9828 Multiparâmetros.

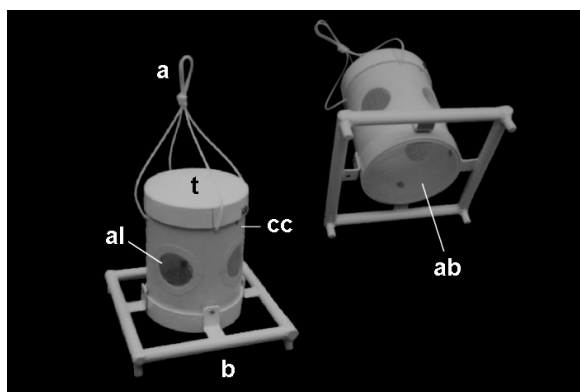


Figura 10 - Câmaras desenvolvidas para os testes *in situ* (MELETTI; ROCHA, 2002). a-alça para suspensão da câmara; b-base da câmara; al-abertura lateral; ab-abertura da base; b-base; cc-corpo da câmara. Como referência das dimensões, a base possui 25 cm de lado e o corpo, 20 cm de altura. O volume é de 3300 mL.

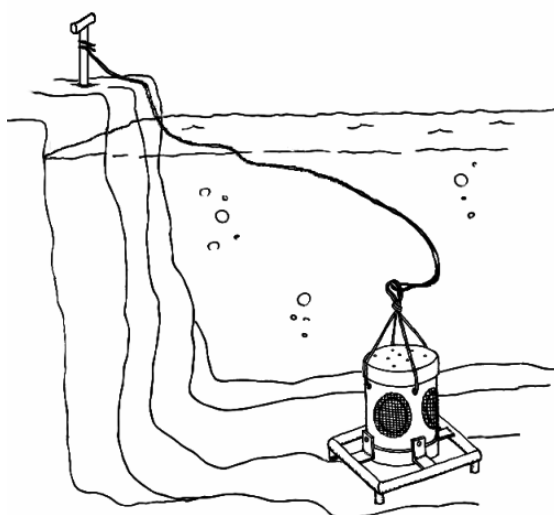


Figura 11 - Esquema de montagem de um teste *in situ* (MELETTI; ROCHA, 2002).

Após as semanas 1 e 2 os animais foram retirados das câmaras e levados para o Laboratório de Bioensaios – UEL. Este transporte foi feito com utilização de recipiente plástico, onde foi adicionado um volume de água do próprio local.

3.3 Locais estudados

Foram escolhidos quatro locais de estudo dentro da microbacia do ribeirão Cambé: Córrego da Mata, Montante de ETE e Jusante de ETE e Córrego dos Periquitos (Figura 12), nos quais foram realizados os testes *in situ*. Os critérios utilizados para escolha dos locais basearam-se na distinção dos IQAs e conseqüente

diferença na classificação da qualidade dos corpos d'água realizados pelo IAP nos anos de 2007 e 2008 (Tabela 4).

Tabela 4 – IQAs dos cinco locais escolhidos para serem estudados nos anos de 2007 e 2008.

Pontos	Locais	IQA
I	Córrego da Mata	65,36 (Bom)
II	Montante ETE Zona Sul	57,92 (Bom)
III	Jusante ETE Zona Sul	27,06 (Ruim)
IV	Córrego dos Periquitos	42,28 (Regular)
Local de coleta	Lago Igapó III	43,42 (Regular)

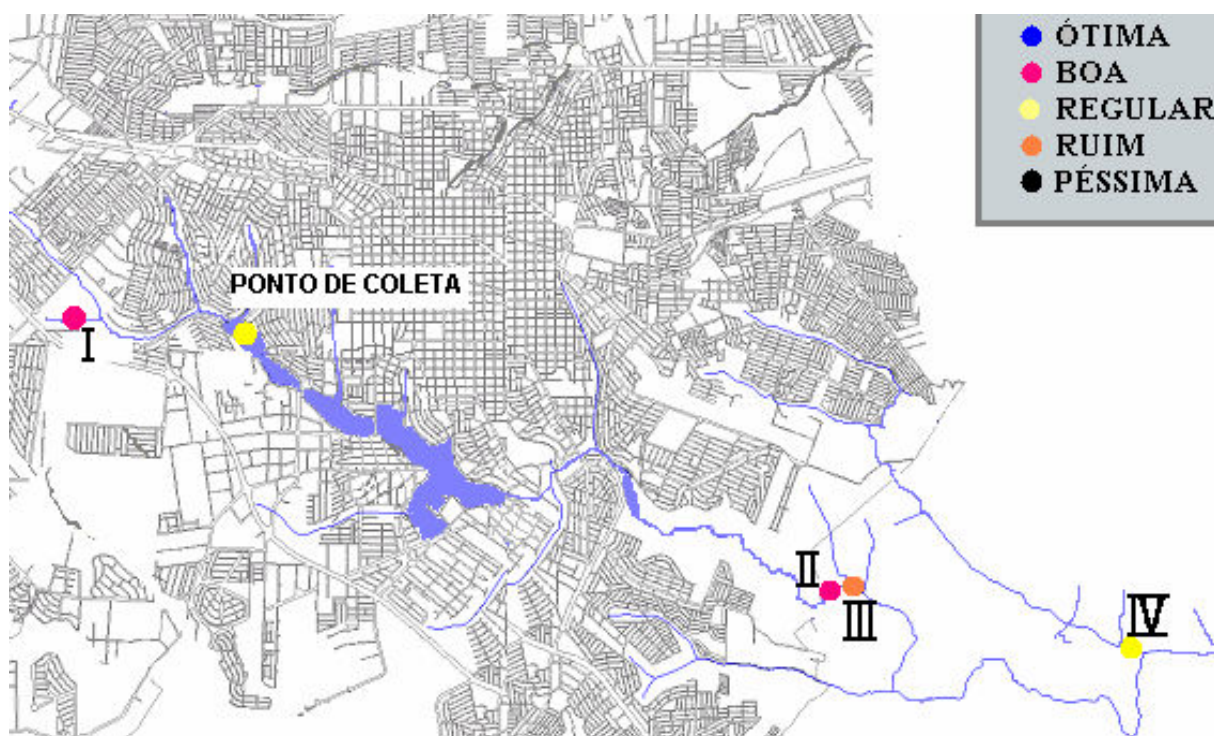


Figura 12 – Mapa da cidade de Londrina com destaque para a microbacia do ribeirão Cambé, os quatro locais escolhidos para serem estudados: I – Córrego da Mata; II – Montante ETE Zona Sul; III – Jusante ETE Zona Sul; IV – Córrego dos Periquitos; e o ponto de coleta utilizado: Lago Igapó III.

3.3.1 Córrego da Mata

O Córrego da Mata é um afluente do ribeirão Cambé (Figura 13), da vertente direita deste, localizado no compartimento 1 da microbacia (23°19'05.5" S e 51°12'13.8" O). Foi o local que, segundo as análises do IAP, apresentou o IQA médio

mais elevado entre os pontos da microbacia do ribeirão Cambé, sendo classificado como bom.



Figura 13 – Localização do Córrego da Mata em relação ao Ribeirão Cambé.

3.3.2 Montante de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

Este ponto fica no leito principal da microbacia do ribeirão Cambé à montante da ETE Sul da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) (Figura 14 e 13). Este local está localizado no compartimento 3 da microbacia ($23^{\circ}21'19.4''S$ e $51^{\circ}07'05.1''O$). De acordo com o IAP (2008) a qualidade da água deste ponto é classificada como boa.



Figura 14 - Trecho à montante da ETE Sul.

3.3.3 Jusante de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

Este ponto fica à jusante da ETE Sul da SANEPAR (23°21'11.8"S e 51°06'54.5"O) (Figura 16) e recebe o efluente da estação. De acordo com o IAP a qualidade da água deste ponto é classificada como ruim.

A ETE Sul (Figura 15) atende o esgoto referente a 176.109 habitantes do município de Londrina. Este esgoto passa pelas seguintes etapas de tratamento antes de ser despejado no ribeirão Cambé: 1-Tratamento preliminar, no qual os resíduos sólidos que chegam à estação são separados e encaminhados ao aterro controlado de Londrina; 2–Passa por 4 Reatores Anaeróbios de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente (RALF) onde o líquido sofre tratamento anaeróbio por meio de um manto de lodo que se forma no fundo do tanque, rico em bactérias. O esgoto, após percorrer este manto, retém e decompõe a matéria orgânica; 3–2 decantadores primários e 3 secundários; 4–3 filtros biológicos aeróbicos (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2009; SANEPAR, 2009). Ainda segundo o Governo do Estado do Paraná (2009) a média do ano de 2007 da DBO do efluente da ETE Sul é de 34 mg.L⁻¹.



Figura 15 – Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da região Sul de Londrina. Em azul, os pontos à montante e jusante do despejo da ETE. Fonte: Google Earth, 2009.



Figura 16 – Trecho a jusante da ETE Sul, com destaque para a espuma.

3.3.4 Córrego dos Periquitos

O Córrego dos Periquitos (Figura 17) é um afluente do ribeirão Cambé. O local estudado está localizado a aproximadamente 3 km a jusante do aterro controlado de Londrina ($23^{\circ}21'32.1''$ S e $51^{\circ}04'57.9''$ O). Apresenta uma pequena porção de mata ciliar que acaba em área agrícola (Figura 18). Sua água foi classificada como regular.



Figura 17 – Córrego dos Periquitos. Trecho a aproximadamente a 3 Km do aterro controlado.



Figura 18 – Área agrícola logo ao lado da pequena porção de mata ciliar do Córrego dos Periquitos. Córrego destacado em azul. Fonte: GOOGLE EARTH, 2009.



Figura 19 – Visão superior da região do aterro controlado e do Córrego dos Periquitos (destacado em azul). O local estudado fica a aproximadamente 3 km a jusante do aterro. Fonte: GOOGLE EARTH, 2009.

A nascente deste córrego foi aterrada pelo primeiro ‘lixão’ construído no município de Londrina. Atualmente, este ‘lixão’ foi readequado, transformando-se em um aterro controlado. Esta mudança visou o monitoramento e controle da área quanto à disposição de resíduos (SOUZA, 2008). O aterro controlado de Londrina (Figura 19), segundo a CMTU, ocupa uma área de 19 há e de acordo com SOUZA (2008) o volume atual de resíduos depositados no aterro é de 3,629,975,32 m³. Segundo dados do IAP disponibilizados pelo Governo do Estado do Paraná (2009) , o aterro controlado de Londrina opera de modo inadequado e recebe por dia 267,5 toneladas de lixo.

3.4 Determinação de metais na água

Foram medidas as concentrações dos metais alumínio, cromo, cobre, níquel e chumbo dissolvidos na água dos quatro locais de estudo, bem como do local de coleta dos animais (lago Igapó III) e água do laboratório (referência). As amostras foram coletadas, filtradas (0,45 µm) e fixadas em ácido nítrico 2%. As medidas foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Perkin Elmer – AA700).

3.5 Obtenção de amostras e armazenamento

Os animais foram sacrificados através do rompimento do músculo adutor anterior. As brânquias e glândulas digestivas foram removidas com auxílio de pinça e tesoura, sendo que estes órgãos foram utilizados para diferentes análises. A fração que foi utilizada para determinação da enzima glutathione S-transferase, 7-etoxiresorifina-O-desetilase, da glutathione reduzida e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico sofreu homogeneização (homogeneizador TECNAL TE-103), em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0, com posterior centrifugação 8870 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-80°C). As análises da capacidade antioxidante total e da atividade de proteínas resistentes à multixenobióticos (MXR) foram feitas de imediato, após o sacrifício dos animais.

3.6 Biomarcadores de biotransformação

3.6.1 7-etoxiresorifina-O-desetilase (EROD)

O ensaio da EROD foi realizado para determinar a atividade do citocromo P450 (subfamília CYP1A) por meio da desetilação da 7-etoxiresorufina, que se converte no produto resorufina, na presença de NADPH e oxigênio, e este é detectado por fluorescência (ex/em: 544/590 nm) (EGGENS; GALGANI, 2002). A

atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, partir de uma curva padrão de resorufina.

3.6.2 *Glutamina-S-transferase (GST)*

A GST foi determinada através do método descrito por Keen et al. (1976). A atividade desta enzima foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda 340 nm. Na reação ocorre a complexação da glutatona reduzida com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

3.7 Biomarcadores de estresse oxidativo

3.7.1 *Glutaciona reduzida (GSH)*

A concentração de GSH foi determinada pela reação da glutaciona reduzida com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) num meio contendo Glutaciona Reduzida e NADPH, a 412 nm, pelo método de Baker et al. (1990).

3.7.2 *Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com Federici (2007) foi utilizado como medida indireta de lipoperoxidação, o qual mede a quantidade de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, pela leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm). A concentração de TBARS foi expressa por $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína nas amostras.

3.7.3 *Capacidade antioxidante total (CANT)*

A capacidade antioxidante total foi medida através do método proposto por Amado et al. (2009). Os tecidos foram homogeneizados (1:4 – m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,75) com EDTA 2 mM e Mg^{2+} 5 mM e centrifugados a 8870 g

durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi então utilizado, sendo diluído para concentração de 1 mg.mL⁻¹ de proteína na microplaca. O método baseia-se na detecção de ERO por fluorescência (ex/em: 485/520 nm) utilizando 2',7'-diclorofluorescina diacetato (H₂DCF-DA) como substrato. Radicais peroxil são gerados pela decomposição à 35°C de 2,2'-azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP), sendo que a mesma amostra é submetida à presença e ausência de ABAP. A leitura de fluorescência emitida pela reação entre as ERO e o H₂DCF-DA foi feita por um fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer), monitorada durante 30 minutos (uma leitura a cada 5 minutos). A capacidade antioxidante total foi calculada pela diferença entre as áreas dos gráficos obtidos das leituras de unidade de fluorescência com presença e ausência de ABAP.

3.8 Mecanismos de resistência a multixenobióticos (MXR)

O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) foi avaliado a partir do ensaio de acumulação do fluorescente Rodamina B (substrato de P-gp) de acordo com Kurelec et al. (2000). Os animais foram mantidos *in vivo* em uma solução contendo 2,5 µM do fluorescente Rodamina B por um período de 2 horas, sem nenhum artifício que mantivesse suas valvas abertas. Os tecidos foram homogeneizados em água destilada (1:7 – m/v), centrifugados a 985 g por 7 minutos. A fluorescência referente ao acúmulo de rodamina foi medida (ex/em: 544/590 nm) por um fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer), e as concentrações determinadas através de uma curva padrão. Os dados foram expressos por mg de tecido úmido.

3.9 Concentração de proteínas nas amostras

A concentração de proteínas foi determinada pelo Método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue

G-250. A curva de calibração foi feita com soro albumina bovina (BSA). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm.

3.10 Análises estatísticas

Os dados foram comparados estatisticamente de duas formas. A comparação das médias dos dados da semana 1 e semana 2 de um mesmo local foi feita pelo teste t - Student. A comparação entre as médias dos dados obtidos nos diferentes pontos de coletas, em cada semana de exposição, foi feita por análise de variância paramétrica (ANOVA), seguido por um teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey) quando indicado, ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. A análise estatística foi feita com auxílio do software SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS

4.1 Testes *in situ*

O único local onde houve mortalidade durante os testes *in situ* foi o ETE jusante. Todos os animais morreram até o quarto dia do teste neste local e, portanto, os dados apresentados aqui se referem a um teste de apenas dois dias.

4.1.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos durante os testes *in situ*, em três momentos distintos: no início dos testes, após a 1ª e a 2ª semana. As médias destas medidas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da água dos locais estudados, bem como do local de coleta (lago Igapó III) e da referência (depuração em laboratório).

Local	OD (mg.L ⁻¹)	pH	Condutividade (uS/cm)	T°C
Referência	8,00 ± 0,60	7,40 ± 0,20	63 ± 7	20,0 ± 1,6
Lago Igapó III	6,69 ± 0,24	7,28 ± 0,72	158 ± 28	22,7 ± 0,5
Córrego da mata	9,41 ± 0,84	7,51 ± 0,30	125 ± 21	17,5 ± 2,2
ETE montante	6,10 ± 0,36	7,10 ± 0,54	155 ± 13	18,5 ± 0,4
ETE jusante	5,60 ± 0,13	7,64 ± 0,07	736 ± 37	21,3 ± 0,3
Córrego dos Periquitos	4,69 ± 0,39	7,27 ± 0,25	887 ± 798	19,9 ± 0,6

A média da temperatura variou entre todos os locais de 17,5 e 22,7°C, e as temperaturas mais baixas ocorreram nos testes no Córrego da Mata. O teste neste local coincidiu com uma queda de temperatura no município de Londrina. Quanto ao pH foram observados valores médios variando de 7,1 a 7,6, não caracterizando variações muito significativas.

Córrego da Mata e ETE montante, que são os locais classificados pelo IAP como bons, os valores de condutividade variaram entre 105 e 179 uS.cm⁻¹, sendo os menores valores encontrados no Córrego da Mata. Na ETE jusante, classificada como Ruim, os valores mantiveram-se em torno de 740 uS.cm⁻¹ e no Córrego dos Periquitos, local classificado como Regular, foi observado um aumento de 1488 uS/cm (310 para 1798 uS.cm⁻¹) em duas semanas (Figura 20).

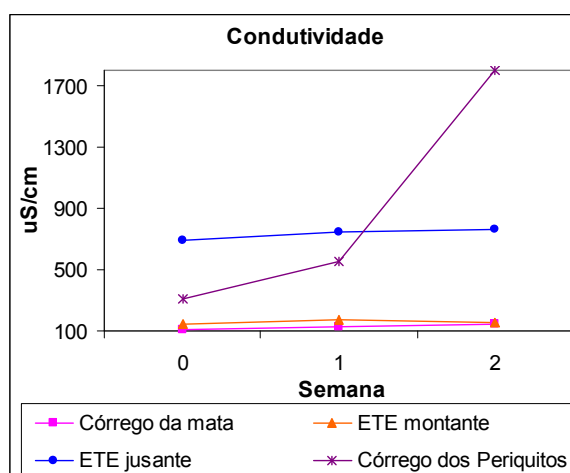


Figura 20 – Condutividade nos quatro locais estudados durante os testes *in situ*.

Quanto ao oxigênio dissolvido, os valores mais elevados foram verificados no Córrego da Mata (8,55 a 10,23 mg.L⁻¹), seguido pelo Lago Igapó III que apresentou valores em torno de 7,00 mg.L⁻¹. Nos locais ETE montante e ETE jusante foram verificados valores próximos em torno de 5,60 mg.L⁻¹. Os valores mais baixos foram observados no Córrego dos Periquitos, que se mantiveram entre 4,26 e 5,01 mg.L⁻¹ de oxigênio dissolvido.

4.1.2 Biomarcadores de biotransformação

4.1.2.1 EROD

Os bivalves mantidos no ETE montante apresentaram elevada atividade da EROD nas brânquias. Na glândula digestiva não foi observada alteração. Os resultados estão apresentados nas Figura 21 e 24.

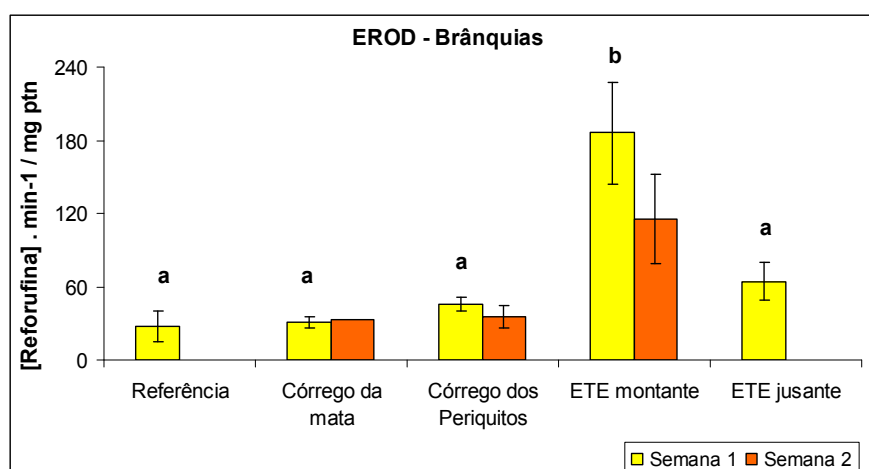


Figura 21 - Atividade da EROD em brânquias de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP. (n = 1 – 7).

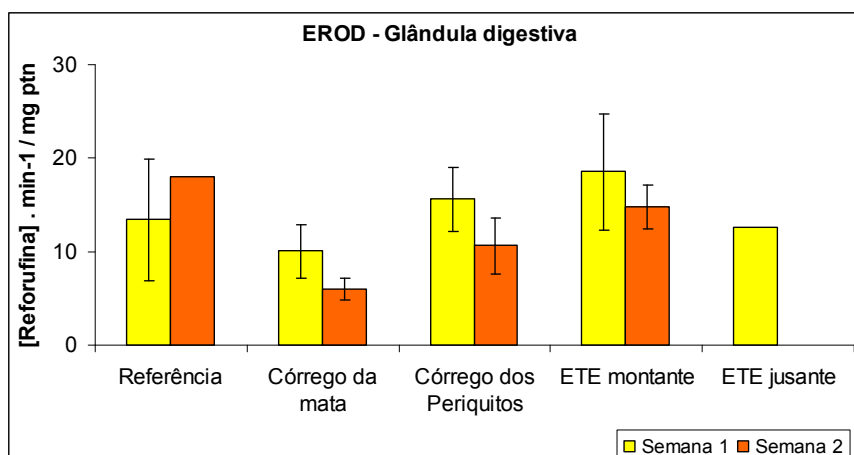


Figura 22 - Atividade da EROD em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. Não houve diferença significativa entre os grupos. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP (n = 1 - 7).

4.1.2.2 GST

A enzima de biotransformação GST teve sua atividade aumentada tanto em brânquia quanto em glândula digestiva nos bivalves mantidos na ETE jusante mesmo em apenas dois dias de teste. Também, em glândula digestiva, observa-se uma tendência de aumento nos animais da ETE montante. Já nos animais do Córrego da Mata houve uma diminuição transitória da atividade da enzima em glândula digestiva na Semana 1, que se restabeleceu na Semana 2 (Figura 23 e 22). Foi observada presença de espuma na água deste local no período da coleta da Semana 2.

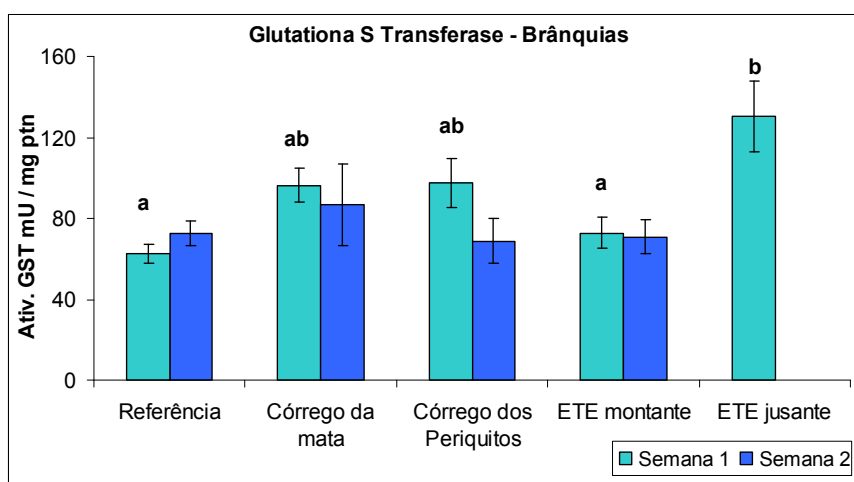


Figura 23 – Atividade da GST em brânquias de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos da Semana 1. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP (n = 7).

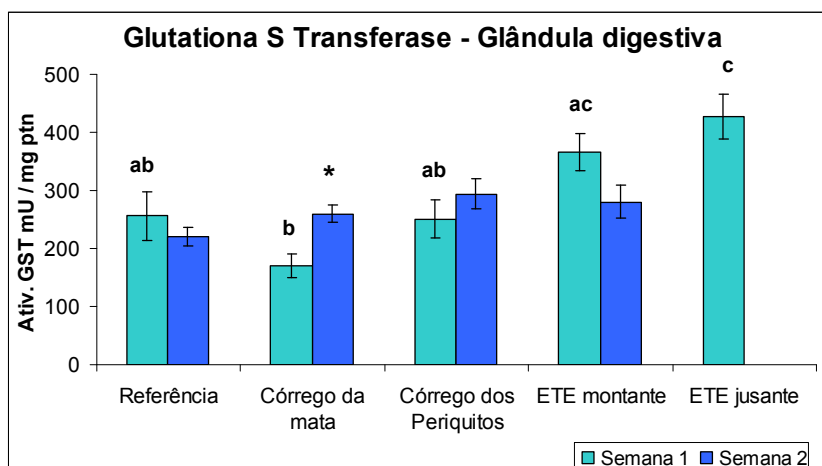


Figura 24 - Atividade da GST em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1 e o (*) diferença entre as duas semanas do Córrego da Mata. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 7$).

4.1.3 Parâmetros de estresse oxidativo

4.1.3.1 GSH

Foi observado que a concentração de GSH dos bivalves expostos ao teste *in situ* no Córrego dos Periquitos na Semana 2, nos dois tecidos analisados, foi significativamente maior do que a referência (Figura 25 e 26). Os animais mantidos na ETE montante também apresentaram concentração de GSH na glândula digestiva significativamente maior em relação aos animais do ponto de referência, na 2ª semana (Figura 26). Neste local a concentração de GSH havia reduzido na Semana 1.

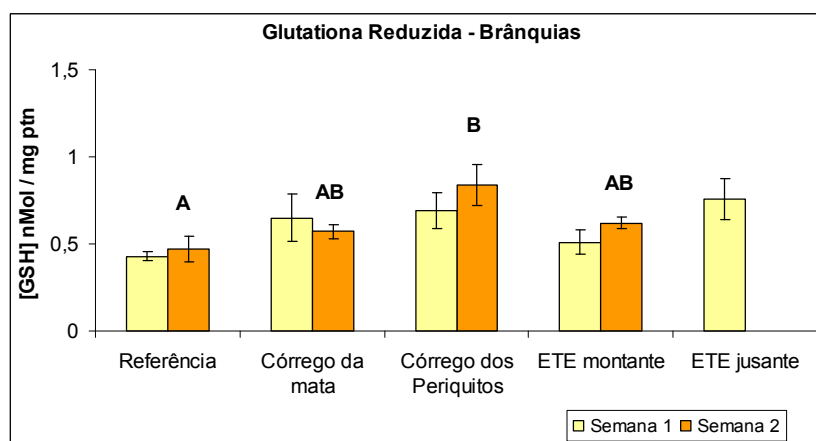


Figura 25 – Concentração de GSH em brânquia de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 2. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 7$).

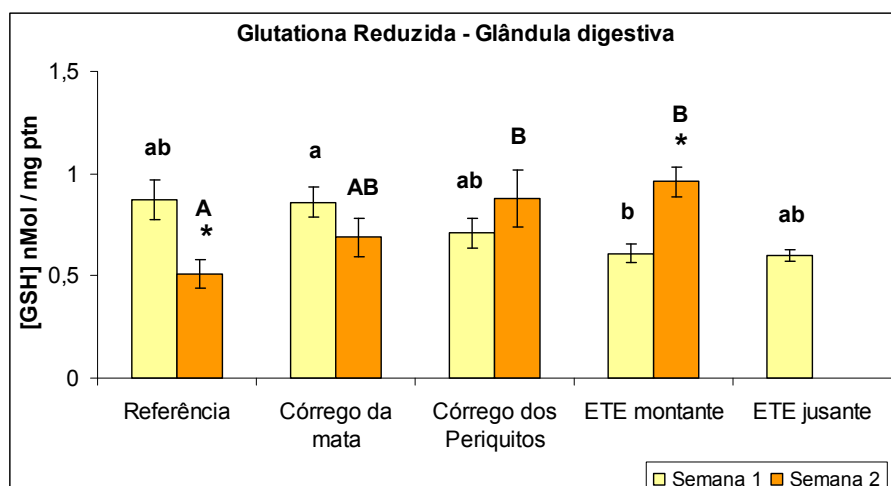


Figura 26 – Concentração de GSH em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1 e as maiúsculas entre os grupos da Semana 2. O (*) representa diferença entre as duas semanas do mesmo local. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 7$).

4.1.3.2 CANT

Apenas nos bivalves expostos ao teste *in situ* no Córrego dos Periquitos, observou-se redução significativa na capacidade antioxidante após a 1ª semana de confinamento. Nos demais tempos e locais não foram observadas diferenças significativas (Figura 27 e 28).

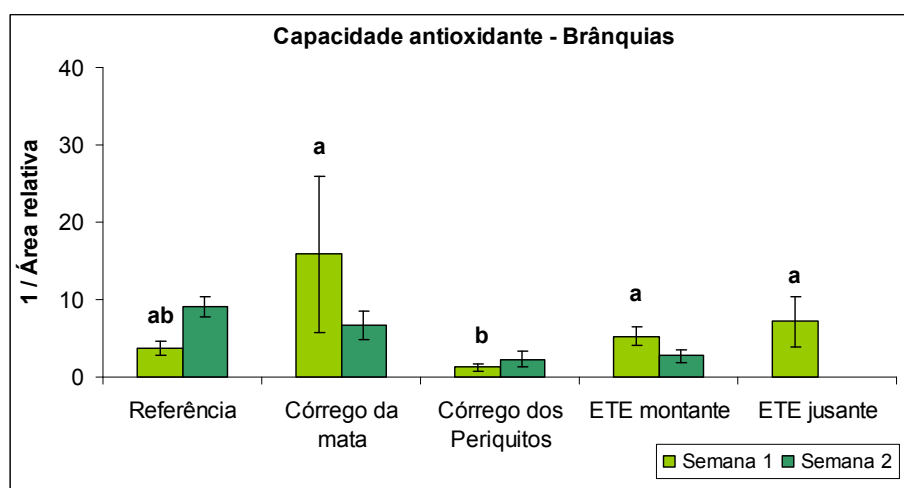


Figura 27 – Capacidade antioxidante total em brânquia de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 7$).

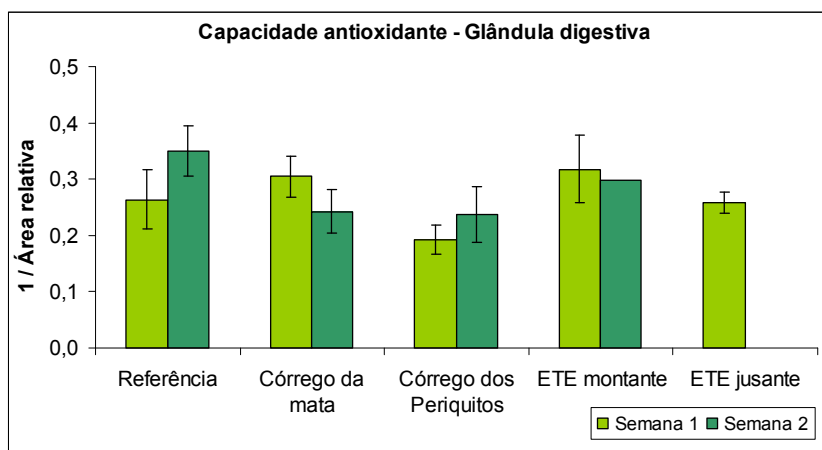


Figura 28 – Capacidade antioxidante total em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. Não houve diferença significativa entre as amostras. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP (n = 7).

4.1.3.3 TBARS

Ocorreu um decréscimo significativo na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos dois tecidos de *C. fluminea* após confinamento no Córrego dos Periquitos, e nas brânquias dos animais mantidos na ETE jusante (Figura 29 e 30).

Além disso, em glândula digestiva a concentração de TBARS também estava reduzida nos animais mantidos no Córrego da Mata e ETE montante por uma semana, em relação aos animais mantidos no local de referência.

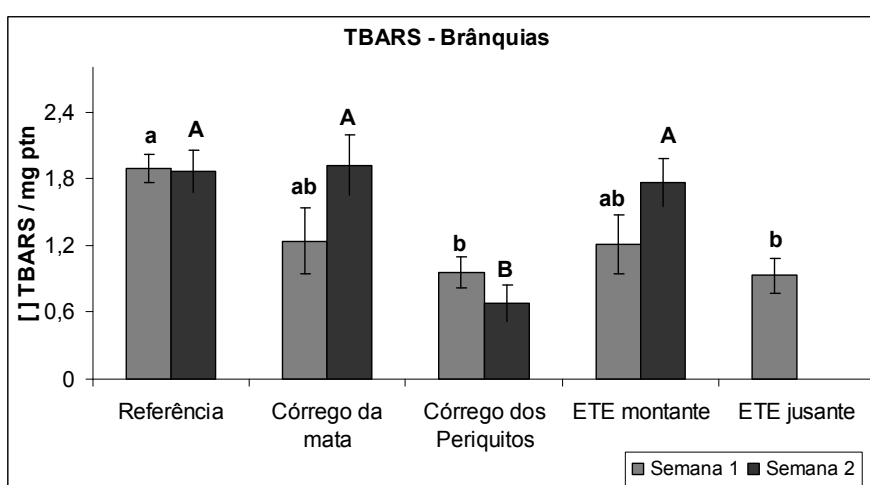


Figura 29 – TBARS em brânquia de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1 e as maiúsculas entre os grupos da Semana 2. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP (n = 7).

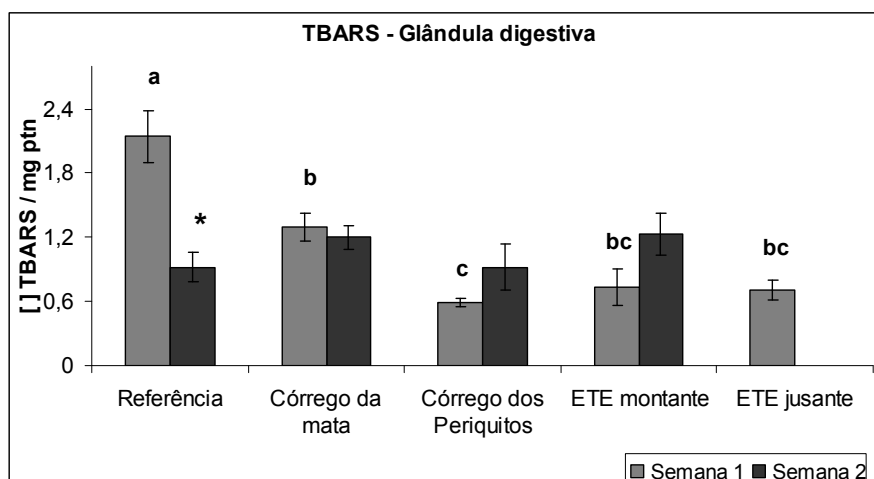


Figura 30 - TBARS em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1. O (*) representa diferença entre as duas semanas do mesmo local. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 7$).

4.1.4 MXR

As Figura 31 e 32 mostram os resultados obtidos para o mecanismo de resistência a multixenobióticos expressos por concentração de Rodamina B, nos animais expostos aos testes *in situ* nos diferentes locais.

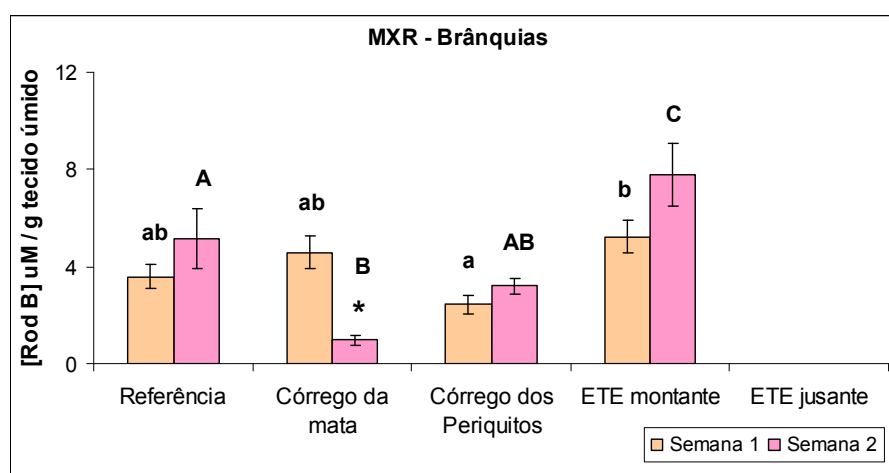


Figura 31 - MXR em brânquia de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1 e as maiúsculas entre os grupos da Semana 2. O (*) representa diferença entre as duas semanas do mesmo local. As barras equivalem as médias e as linhas verticais o EP ($n = 6$).

Os bivalves mantidos por duas semanas no Córrego da Mata apresentaram redução significativa na [Rod B] nas brânquias, em relação com os animais da referência. Por outro lado, houve um aumento significativo na [Rod B] tanto

nas brânquias quanto na glândula digestiva dos animais após duas semanas de confinamento na ETE montante, em relação aos animais da referência.

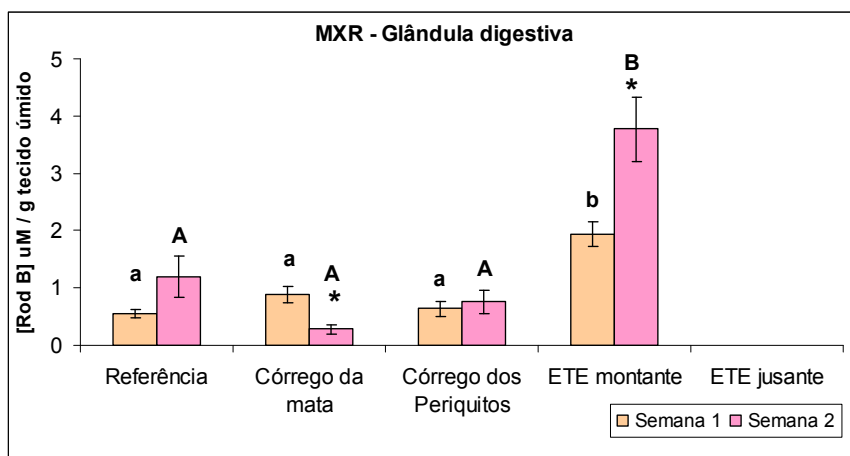


Figura 32 - MXR em glândula digestiva de *C.fluminea* mantidos por 1 ou 2 Semanas *in situ*. As letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos da Semana 1 e as maiúsculas entre os grupos da Semana 2. O (*) representa diferença entre as duas semanas do mesmo local. As barras equivalem às médias e as linhas verticais o EP ($n = 6$).

4.2 Concentração de metais na água

As concentrações detectadas dos os metais alumínio, cromo, cobre, níquel e chumbo, estão expostas na **Tabela 6**. Em nenhum local as concentrações ultrapassaram os limites permitidos na Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005, para água de Classe 1.

Tabela 6 – Médias das concentrações de metais dissolvidos ($\mu\text{g/L}$) detectada nos diferentes locais de estudo, simultaneamente aos testes *in situ*. Entre parênteses estão os valores menores e maiores encontrados. A Referência equivale à água onde os animais foram mantidos em laboratório. Na última linha da tabela estão listados os limites máximos permitidos para água de Classe 1 dos metais Al, Cd, Cr, Cu, Ni e Pb pela Resolução CONAMA nº 357 (2005).

	Al dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cr dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cu dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Ni dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Pb dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Referência	0	0	0	0,5	2,0
Lago Igapó III	83,9	4,8	0	0,5	0
Córrego da Mata	49,8 (18,6 – 88,9)	4,1 (3,5 – 5,0)	0	0	0
Córrego dos Periquitos	84,1 (78,8 – 89,4)	20,2 (11,9 – 28,6)	5,6 (3,8 – 7,4)	6,4 (1,0 - 11,8)	0
ETE montante	37,0 (17,4 - 52,7)	5,4 (1,2 - 12,8)	2,3 (1,4 - 4,6)	0,4 (0,2 - 0,6)	0
ETE Jusante	41,2	5,8	0	0	0
	Al dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cr total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cu dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Ni total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Pb total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Limites	100	30	9	25	10

O chumbo não foi detectado em nenhuma amostra. O Córrego dos Periquitos apresentou as concentrações mais elevadas para todos os metais. É interessante comentar que a concentração de metais estava mais elevada na Semana 2 em relação à Semana 1.

5. DISCUSSÃO

A contaminação de águas superficiais urbanas pode ocorrer por diversas fontes e por isso a diversidade de xenobióticos que entra em contato com a biota aquática é grande. Ocorrência de metais (YABE; OLIVEIRA, 1998), pesticidas (ABDEL-HALIN et al., 2005), hidrocarbonetos (CRUNKILTON; DEVITA, 1997; ZHAO et al., 2008), fármacos (KOLPIN et al., 2004), por exemplo, já foram detectados nestas águas. Estes compostos podem, em concentrações subletais, causar respostas e efeitos nos organismos que são expostos a eles.

Os locais estudados neste trabalho apresentam fontes distintas de contaminação. O Córrego da Mata está localizado dentro da cidade, porém, inserido numa área de mata que minimiza a ação do escoamento superficial. O ETE montante também apresenta área de vegetação no seu entorno, mas está inserido em área rural. O ETE jusante, além dos fatores que atingem o ETE montante, apresenta uma fonte de contaminação pontual, que é o efluente do tratamento de esgoto. Este efluente pode conter diversos tipos de contaminantes que não são degradados no tratamento, alta condutividade, bem como concentração mais baixa de OD. No caso do Córrego dos Periquitos, foi observada contaminação por metais, alta condutividade e baixa concentração de OD, resultado da influência de resíduos do aterro controlado. As diferenças de fontes de contaminação podem acarretar em diferentes respostas dos organismos, pois estas dependem de fatores quanto à qualidade e quantidade de contaminação (COSSU et al., 2000).

O aumento da GST nos bivalves mantidos no ETE jusante, após dois dias de exposição, reflete o IQA ruim apresentado por este local. O aumento desta enzima pode estar relacionado com diversos contaminantes, como PAHs (GOWLAND et al., 2002), PCBs (PARK et al., 2009) substâncias estrógenas (HUGHES; GALLAGHER, 2004; TELES et al., 2007), que já foram identificados em efluentes de esgoto tratado (BARRICK, 1982; SOARES et al., 2008; GUO et al., 2009). Além do aumento da GST, neste local também foi observada diminuição na concentração de TBARS, que pode estar relacionada com hipóxia (VIDAL et al., 2002), pois além da concentração de OD neste local estar próxima de 5 mg.L⁻¹, a água apresentava aspecto viscoso, o que pode ter prejudicado a absorção de oxigênio pelas brânquias dos bivalves. A concentração baixa de oxigênio reflete na menor geração de ERO e, conseqüentemente, menor lipoperoxidação. Estes resultados contrapõem aqueles para o bivalve dulcícola *Ellipitio complanata*, cuja atividade da GST e lipoperoxidação apresentaram diminuição e aumento, respectivamente, quando expostas ao esgoto pré-tratado ou tratado com ozônio por sete semanas (GAGNÉ et al., 2007). Os animais confinados no ETE jusante não apresentaram alterações nos outros parâmetros, possivelmente pelo período de exposição de apenas dois dias.

No presente trabalho, os biomarcadores de estresse oxidativo apresentaram alterações significativas nos tecidos dos animais mantidos no Córrego dos Periquitos. Este local foi classificado por parâmetros físico-químicos e bacteriológicos como regular, e os resultados obtidos no presente trabalho mostram a ocorrência de metais no local. Este córrego está cercado por propriedades rurais e sofre contaminação difusa pelo chorume do aterro controlado de Londrina. Um aterro controlado não é impermeabilizado e, portanto, não evita o escoamento ou infiltração do chorume, podendo este comprometer a qualidade de águas superficiais e

subterrâneas. O chorume é um líquido produzido na decomposição do lixo, que pode ter uma composição muito variável (SISINNO; MOREIRA, 1996). Os resíduos sólidos de um município consistem principalmente numa mistura de plásticos, metais e alguns materiais orgânicos e, por isso, várias substâncias orgânicas e inorgânicas são encontradas na composição do chorume (OYGARD et al., 2004).

Os metais detectados na águas do Córrego dos Periquitos não ultrapassaram os limites permitidos pelo CONAMA (2005), porém, é importante ressaltar que as concentrações determinadas no presente trabalho correspondem à quantidade de metal dissolvido na água e a maioria dos limites do CONAMA refere-se às concentrações totais dos metais. Também foram detectados os metais Cr, Al e Cu em águas ao redor do Aterro Sanitário de São Carlos (LOPES et al., 2007).

Os bivalves mantidos no Córrego dos Periquitos apresentaram inibição da CANT. Este biomarcador pode ser induzido ou inibido; sua indução está relacionada a uma adaptação do organismo contra o aumento de ERO. Por outro lado, uma diminuição da capacidade antioxidante representa um efeito tóxico que deixa o animal mais susceptível ao estabelecimento de estresse oxidativo (REGOLI, 2000). A CANT reduziu na Semana 1 em brânquias de *C.fluminea* mantidos no Córrego dos Periquitos, porém na Semana 2 isto não se manteve. Este dado corrobora com os dados de Regoli (2000) nos quais bivalves *Mytilus galloprovincialis* transferidos de um local de referência para um local poluído mostraram a capacidade antioxidante reduzida na primeira semana. Esta mesma espécie apresentou diminuição da CANT em local contaminado por pesticidas (PAMPANIN et al., 2005).

A redução da capacidade antioxidante total indica que o animal está com seu sistema de defesa antioxidante comprometido, e por isso, espera-se um aumento nos danos oxidativos, tais como a lipoperoxidação. Porém, no Córrego dos

Periquitos foi observada redução da CANT acompanhada da redução de concentração de TBARS. Uma possível explicação para este fato é de que a ocorrência de lipoperoxidação é desencadeada, principalmente, pelo radical hidroxil. Este é formado através da reação de Fenton: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}^\bullet$, na qual há participação do íon ferro (VALAVANIDIS et al., 2005). A diminuição de ferro no tecido acarreta na diminuição da lipoperoxidação, como no roedor *Clethrionomys glareolus*, que quando alimentado com fontes de cádmio, teve a absorção intestinal de ferro prejudicada e diminuição de lipoperoxidação (WLOSTOWSKI et al., 2000). Além disso, redução na concentração de TBARS foi observada em *C. fluminea* em condições de hipóxia (VIDAL et al., 2002), e este local foi o que apresentou menor concentração de OD.

No Córrego dos Periquitos foi observado aumento da GSH na Semana 2. Esta molécula é um elemento central na defesa antioxidante do organismo, porém apresentou resposta contrária a CANT. Este resultado pode ser devido a função exercida pela GSH como co-substrato da enzima antioxidante GPx (HERMES-LIMA, 2004). Esta enzima não foi medida no presente trabalho, porém o resultado obtido da CANT sugere que a mesma estava inibida, o que pode explicar o aumento do seu co-substrato, a GSH.

Os IQAs utilizados para comparação no presente estudo foram obtidos nos anos de 2007 e 2008 e, portanto, não apresentam simultaneidade ao presente estudo. É importante ressaltar que os locais estudados podem ter sofrido piora na qualidade de suas águas neste período de ausência de análises. Entretanto, alguns resultados dos biomarcadores avaliados não estiveram de acordo com os IQAs dos respectivos locais de estudo. No Córrego da Mata, por exemplo, cuja água foi classificada como boa, houve aumento da GST, em glândula digestiva, e do MXR, nos dois tecidos, na Semana 2. Neste período foi observada formação de espuma no local,

que pode ter ocorrido devido à presença de contaminação ou matéria orgânica, o que indica alguma mudança no ambiente entre os períodos da Semana 1 e 2.

O MXR reduzido no ETE montante pode estar relacionado com dois fatores. A princípio a água deste local é considerada boa, e com isso, espera-se que haja realmente diminuição deste mecanismo nos bivalves mantidos no local. Porém, como apresentado no Capítulo I do presente trabalho, este mecanismo em glândula digestiva de *C.fluminea* apresentou redução apenas a partir da terceira semana de depuração. O segundo fator que pode ser responsável pela diminuição do MXR, já na semana 1, pode ser devido à inibição deste. Existem agentes químicos que inibem este mecanismo de resistência, podendo acarretar na acumulação de outros agentes contaminantes (SMITAL; KURELEC, 1998). Este fato, associado à elevada atividade da EROD e concentração de GSH, em glândula digestiva, nos animais mantidos neste local, não está de acordo com o IQA bom deste local. O aumento da EROD geralmente está relacionado com a presença de contaminantes orgânicos, PAHs e PCBs (FERREIRA et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

Os biomarcadores estudados no presente trabalho apresentaram alteração em pelo menos um dos locais estudados, o que mostra que estes são sensíveis a determinada condição. Este fato indica que estes biomarcadores podem ser utilizados de forma eficientes na espécie *C.fluminea*. Os animais apresentaram alterações em diferentes biomarcadores nos diferentes locais, o que pode refletir a distinção da fonte de contaminação destes. Seria interessante que a concentração de outros contaminantes, não apenas dos metais, fossem medidos nos locais estudados, para que um perfil de contaminação fosse mais bem caracterizado. Isto permitiria que fossem feitas relações entre as alterações observadas e a presença de contaminantes

específicos. Na ausência destes dados não se pode afirmar que as alterações observadas nos animais do Córrego dos Periquitos estejam ligadas à presença de metais, bem como quais fatores que estimularam aumento de biomarcadores no ETE montante.

Os parâmetros tradicionais utilizados para determinação de Índices de qualidade de água nem sempre refletem a saúde do ecossistema ou dos organismos que vivem nele. Os biomarcadores testados no presente trabalho mostraram que alguns valores de IQA não representavam adequadamente a qualidade da água do local. As alterações observadas em parâmetros dos bivalves mantidos no Córrego da Mata e ETE montante, não eram esperadas, já que a água destes locais foi classificada como boa. Estas indicam que, mesmo nos locais de IQA bom, pode haver presença de contaminação que prejudica a saúde da biota. Já o Córrego dos Periquitos, classificado como regular, foi o local que apresentou maiores alterações, principalmente de defesa antioxidante e estresse oxidativo, além de que neste foram detectadas concentrações preocupantes de metais. Com isso, este estudo mostrou que a avaliação de parâmetros biológicos é uma ferramenta importante para classificação e diagnóstico da qualidade da água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HALIN, K.Y., SALAMA, A.K., EL-KHATEEB, E.N., BAKRY, N.M. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: Implications for monitoring and biomarker responses. **Chemosphere**, v.63, p.1491–1498, 2006.

ALMEIDA, E.A., BAINY, A.C.D., DAFRE, A.L., GOMES, O.F., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.318, p.21-30, 2005.

AMADO, L.L., GARCIA, M.L., RAMOS, P.B., FREITAS, R.F., ZAFALON, B., FERREIRA, J.L.R., YUNES, J.S., MONSSERAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Sci. of the total envir.**, v.407, n.6, 2009.

BAKER, M.A., CERNIGLIA, G.J., ZAMAN, A. Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples. **Analytical Biochemistry**, v.190, p.360-365, 1990.

BARCELLOS, F.C., OLIVEIRA, S.M.M.C., GREEN, A.P.L., CARVALHO, P.G.M. **Urbanização e impactos ambientais do Centro-Sul**. Trabalho apresentado no XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP, Caxambu, Minas Gerais, 18 a 22 set 2006.

BARRICK, R.C. Flux of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Central Puget Sound from Seattle (Westpoint) Primary Sewage Effluent. **Environ. Sci. Technol.**, v.16, p.682-692, 1982.

AMAP&P. **Atlas ambiental da cidade de Londrina**. Disponível em: <http://www.uel.br/atlas_ambiental> Acesso: 21 set 2009.

BAUDRIMONT, M., ANDRES, S., DURRIEU, G. BOUDOU, A. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. **Aquatic Toxicology**, v.63, p.89-102, 2002.

BERGAYOU H., MOUNEYRAC C., PELLERIN J., MOUKRIM A. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.765–769, 2009.

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

CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution

in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, p.295-311, 2000.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio ambiente. **Resolução nº357, de 17 de março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2005.

CANESI, L., VIARENGO, A., LEONZIO, C., FILIPPELLI, M., GALLO, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v.46, p.67-76, 1999.

COSSU, C., DOYOTE, A., BABUT, M., EXINGER, A., VASSEUR, P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.45, p.106-121, 2000.

COSTA, C.R., OLIVI, P., BOTTA, C.M.R., ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

CRAVO, M.F. **Respostas antioxidantes e dano oxidativo em diferentes regiões do corpo do poliqueto *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae)**. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Animal Comparada) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CRUNKILTON, R.L.; DEVITA, W.M. Determination of aqueous concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban stream. **Chemosphere**, v. 35, n. 7, p.1447-1463, 1997.

DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A., GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, n.1-3, p.19-27, 1995.

EGGENS, M.L. GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Mar. Environ. Res.**, v.33, p.213-221, 1992.

FEDERICI, G., SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415–430, 2007.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. Ed. Pedagógica e Universitária LTDA (E.P.U), São Paulo, 1980, 196p.

FERREIRA, M., MORADAS-FERREIA, P., REIS-HENRIQUES, M.A. The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, v.64, p.181-190, 2007.

FRANCO, J.F., TRIVELLA, D.B.B., TREVISAN, R., DINSLAKEN, D.F., MARQUES, M.R.F., BAINY, A.C.D., DAFRE, A.L. Antioxidant status and stress proteins in the

gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chem. Biol. Inter.**, v.160, p.232-240, 2006.

GAGNÉ, F., ANDRÉ, C., CEJKA, P., GAGNON, C., BLAISE, C. Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.145, p.542– 552, 2007.

GONÇALVES, G.W.P.S. **Urbanização e qualidade da água: monitoramento em lagos urbanos de Londrina – PR**. 2008. Dissertação (Mestre em Geografia, Meio ambiente e Desenvolvimento), Departamento de Geociências, Universidade Estadual de Londrina, 186p..

GOOGLE EARTH. Acesso em: out de 2009.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Diagnóstico do Plano da Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi**. Jul 2009.

GOWLAND, B.T.G., MCINTOSH, A.D., DAVIES, I.M., MOFFAT, C.F., WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**, v.54, p.231–235, 2002.

GUO, L., ZHANG, B., XIAO, K., ZHANG, Q., ZHENG, M. Levels and distributions of polychlorinated biphenyls in sewage sludge of urban wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.468–473, 2009.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY K.B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, [s.l.], p.319-368, 2004.

HOARAU, P., GARELLO, G., GNASSIA-BARELLI, M., ROMÉO, M., GIRARD, J. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-Transferase in the clam *Ruditapes decussates*. **Aquatic Toxicology**, v.68, p.87–94, 2004.

HUGHES, E.M., GALLAGHER, E.P. Effects of 17- β estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.137, p.237–247, 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>> Acesso: out 2009.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL / THE NATURE CONSERVANCY. **Dados sobre a espécie *Corbicula fluminea***.

Disponível em:

<http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Corbicula_fluminea.htm>

Acesso: 20 out 2009.

KALOYIANNI, M., DAILIANIS, S., CHRISIKOPOULOU, E., ZANNOU, A., KOUTSOGIANNAKI, S., ALAMDARI, D.H., KOLIAKOS, G., DIMITRIADIS, V.K. Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels, **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.149, n.4, 2009.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **J Biol Chem**, v.20, p.6183-6188, 1976.

KOLPIN, D.W., SKOPEC, M., MEYER, M. T., FURLONG, E. T., ZAUGG, S. D. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment**, v.328, p.119–130, 2004.

KURELEC, B., WALDMANNB P., ZAHN R.K. The Modulation of Protective Effects of the Multixenobiotic Resistance Mechanism in a Clam *Corbicula fluminea*. **Marin. Envir. Resea.**, v.42, n.1-4, p.383-387, 1996.

KURELEC, B., SMITAL, T., PIVEEVIAE, B., EUFEMIA, N., EPEL, D. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. **Ecotoxicology**, v.9, p.307-327, 2000.

LOPES, A.A., BRIGANTE, J., SCHALCH, V. Influência do Aterro Sanitário de São Carlos (SP), Brasil, na Qualidade das Águas Superficial e Subterrânea. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 2, p.115-127, 2007.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Imprensa oficial, 3ªed. Curitiba 2002, 440p.

MANDUZIO, H., ROCHER, B., DURAND, F., GALAP, C., LÉBOULENGER, F. The point about oxidative stress in molluscs. **ISJ**, v.2, p.91-104, 2005.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A.T. **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Ed. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Braz. J. Biol.**, v.62, p.187-190, 2002.

MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO. L.A., AMADO. L.L., MARTINS. C.M.G., PINHO. G.L.L., CHAVES. I.S., FERREIRA-CRAVO. M., VENTURA-LIMA. J., BIANCHINI. A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comp. Biochem. and Physiol. C**, v.146, p.221–234, 2007.

MOTA, S. **Urbanização e meio ambiente**. Ed. ABES, Rio de Janeiro, 1999, 352p.

NARBONNE, J.F., Djomo, J.E., Ribera. D., Ferrier. V., Garrigues, P. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.42, p.1-8, 1999.

OYGARD, J.K.; MAGE, A.; GJENGEDAL, E. Estimation of the mass-balance of elected metals in four sanitary landfills in Western Norway, with emphasis on the heavy metal content of the deposited waste and the leachate. **Water Research**, v.38, p.2851–2858, 2004.

PAIN, S., PARANT, M. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. **Chemosphere**, v.67, p.1258-1263, 2007.

PAMPANIN, D.M., CAMUS, L., GOMIERO, A., MARANGON, I., VOLPATO, E., NASCI, C. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.1548–1557, 2005.

PARK, H., AHN, I., KIM, H., LEE, J., SHIN, S.C. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.150, p.528–536, 2009.

PML - PREFEITURA MUNICIPAL DE LONDRINA. **Pontos turísticos**, 2009. Disponível em <<http://www.londrina.pr.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2009.

PDDESA/UNS - POPULATION DIVISION OF THE DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS OF THE UNITED NATIONS SECRETARIAT, World Population Prospects: The 2006 Revision and World Urbanization Prospects: The 2007 Revision, Disponível em: < <http://esa.un.org/unup> > Acesso: 16 out 2009.

RAND, G.M., WELLS, P.G., MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assesement**. Crc Press, Ed.2, 1995.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v.31, p.143-164, 1995.

REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v.50, p.351-361, 2000.

RICHARDSON, B.J., MAK, E., LUCA-ABBOTT, S.B., MARTIN, M., MCCLELLAN, K., LAM, P.K.S. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p.503–514, 2008.

RIGONATO, J., MANTOVANI, M.S., JORDÃO, B.Q. Comet assay comparisons of differente *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Gen. Mol. Biol.**, v.28, p.464-468, 2005.

ROCHER, B., LE GOFF, J., PELUHET, L., BRIAND, M., MANDUZIO, H., GALLOIS, J., DEVIER, M.H., GEFFARD, O., GRICOURT, L., AUGAGNEUR, S., BUDZINSKI, H., POTTIER, D., ANDRÉ, V., LEBAILLY, P., CACHOT, J. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.65–77, 2006.

SANEPAR. **Sistema de Esgotamento Sanitário**. Disponível em: <http://www.sanepar.com.br/sanepar/CalandraKBX/calandra.nsf/0/25678F656EED3C2D832572A3006D5022?OpenDocument&pub=T&proj=InternetSanepar&sec=Intern et_ASanepar> Acesso: 24 Out 2009.

SANTANA, L.M.B.M. Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR). 2004. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 66p.

SETTI, A.A. **A necessidade do uso sustentável dos recursos hídricos**. Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos naturais renováveis. Brasília, 1994, 344p.

SILVA, A.Z., ZANETTE, J., FERREIRA, J.F., GUZENSKI, J., MARQUES, M.R.F., BAINY A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.376–382, 2005.

SISINNO, C.L.S., MOREIRA, J.C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v.12, n.4, p.515-523, out-dez 1996.

SMITAL, T., KURELEC, B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. **Mutation Research**, v.399, p.43–53, 1998.

SOARES, A., GUIEYSSE, B., JEFFERSON, B., CARTMELL, E., LESTER, J.N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v.34, p.1033–1049, 2008.

SOUZA, J.C. **Resíduos sólidos urbanos domiciliares na cidade de Londrina – PR**. 2008. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em geografia), Departamento de Geociências, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 151p.

STIPP, N.A.F. **Macrozoneamento Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi (PR)**. Ed. UEL, Londrina, 2000, 222p.

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

TI Solution – Geoambiental. **Índice de Qualidade (IQA) dos ribeirões do município de Londrina determinado pelo IAP.**

Disponível em: <http://sistemas.tisolution.com/geo/TIMap_v2.aspx> . Acesso em: 31 mar. 2009.

VALAVANIDIS, A. VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.178–189, 2006.

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

VIDAL, M.L., BASSÈRES, A., NARBONNE, J.F. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Muller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.132, p.93–104, 2002.

WALKER, C.H. **Principles of ecotoxicology**. London, Taylor & Francis. 1996.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1735-1742, 1996.

WINKALER, E.U., SILVA, A.G., GALINDO, H.C., MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.2, p.507-514, 2001.

WLOSTOWSKI, T., KRASOWSKA, A., GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ, B. Dietary cadmium decreases lipid peroxidation in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). **J. Trace Elements Med. Biol.** v.14, p. 76-80, 2000.

YABE. M.J.S., OLIVEIRA, E.O. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v.21, p.551-556, 1998.

ZHAO, H., YIN, C., CHEN, M., WANG, W., CHRIS, J., SHAN, B. Size distribution and diffuse pollution impacts of PAHs in street dust in urban streams in the Yangtze River Delta. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.162–167, 2009.