



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
FACULDADE DE OCEANOGRRAFIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES
PROVENIENTES DE REGIÕES COM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO
POR ARSÊNIO NA FOZ DO RIO AMAZONAS**

TAMYRIS PEGADO DE SOUZA E SILVA

BELÉM/PA

2016

TAMYRIS PEGADO DE SOUZA E SILVA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES
PROVENIENTES DE REGIÕES COM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO
POR ARSÊNIO NA FOZ DO RIO AMAZONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Oceanografia do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará como requisito básico para obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia do Instituto de Geociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lílian Lund Amado
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane de Paula Ferreira

BELÉM/PA

2016

FICHA

Dados Internacionais de Catalogação de Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Geociências/SIBI/UFPA

Silva, Tamyris Pegado de Souza e, 1993 -

Análise de biomarcadores bioquímicos em peixes provenientes de regiões com histórico de contaminação por arsênio na Foz do Rio Amazonas./ Tamyris Pegado de Souza e Silva. – 2016

53 f : il.; 30 cm

Inclui bibliografias

Orientadora: Lílian Lund Amado

Coorientadora: Cristiane de Paula Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Geociências, Faculdade de Oceanografia, Belém, 2016.

1. Bagre (Peixe) – Amazonas, Rio. 2. Arsênio – Toxicologia – Amazonas, Rio. I. Título.

CDD 22 ed. 597.52098115

TAMYRIS PEGADO DE SOUZA E SILVA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES
PROVENIENTES DE REGIÕES COM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO
POR ARSÊNIO NA FOZ DO RIO AMAZONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Oceanografia do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará como requisito básico para obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia do Instituto de Geociências.

Data de aprovação: ____/____/____

Conceito: _____

Orientadora: Prof.^a Dr.^a LÍlian Lund Amado
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane de Paula
Ferreira

Banca examinadora:

Prof.^a LÍlian Lund Amado – Orientadora
Doutora em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Pará

Prof. Luciano Fogaça de Assis Montag – Membro Titular
Doutor em Zoologia
Universidade Federal do Pará

Prof. José Luiz Fernandes Vieira – Membro Titular
Doutor em Toxicologia
Universidade Federal do Pará

Dedico este trabalho a minha tia Martha (*in memoriam*), uma pessoa que durante toda sua existência se fez presente me ajudando, me cuidando e principalmente me amando em todas as fases da minha vida. No fim deste ciclo não foi diferente, apesar de sua partida. Obrigada por me iluminar sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por toda e cada experiência. Apesar dos obstáculos, Nele encontro forças para seguir e sou feliz pelo caminho trilhado até aqui.

À minha mãe, Rita Pegado, que me mostra como ser forte e determinada com muito mais do que palavras, com exemplos no dia a dia. Obrigada por me apoiar em todas as escolhas feitas por mim, principalmente na decisão de cursar oceanografia. Ao meu irmão, André Pegado, que sempre é tão carinhoso e prestativo em qualquer circunstância, até mesmo nos meus momentos de estresse. Ao meu padrasto, Expedito Menezes, por renovar minha família e por todo apoio prestado. Podemos não ter muito em comum, mas acredito que o mar nos aproxima. Ao meu pai, Alcindo Silva, por todo suporte que me proporcionou desde o meu nascimento até os dias de hoje, sem medir esforços. Ao meu avô Jurandir e a minha amada avó Lays, pessoa sem igual no mundo, fonte de bondade e inspiração, o amor que tenho por ela vai além dessa vida.

A toda família Pegado, aquela que se parece demais com a da música “A grande família”. Sinto-me privilegiada por receber tanto amor e apoio de todos os membros, estes sempre dispostos a estender a mão àqueles que precisam, sendo tudo ensinado com excelência pela grande matriarca, Bisa Inês (*in memoriam*). Um obrigada especial ao meu primo Higor e minha prima-irmã Natasha que tanto me escutaram e aconselharam em todos os aspectos da vida, nossa sintonia ultrapassa os laços de sangue.

Ao melhor companheiro de curso e de vida, Alysson Leite. Obrigada por escolher estar ao meu lado, sendo paciente, bem humorado, me apoiando e me mostrando sempre o lado positivo das coisas. Tenho extrema admiração por você, és merecedor de cada coisa boa que já veio e que há de vir. Gratidão eterna por essa parceria que vem dando tão certo desde o início. Não podendo deixar de fora toda família dele que me recebeu tão bem, principalmente a dona Sileuza, seu Wagner, Kelly, Rafael, Wagner, Samara e a pequena Nicole.

Aos amigos de curso e da turma de 2011, desejo de coração sucesso a todos, sabemos que não é fácil, mas acredito no potencial de cada um pra fazer uma oceanografia cada vez melhor. Principalmente e especialmente aqueles que estiveram integralmente ao meu lado nos momentos de aperto e de extrema alegria, meus amigos trazidos pelas correntes oceânicas: Alysson, Denys, Jéss (logo mais com o primeiro peixinho da galera “Miguel”), Ju, Ítalo, Thay e Rod. Gostaria de abrir um parêntese para

minha amiga-irmã Ju, que há 11 anos vem trilhando seu caminho junto ao meu, uma irmandade antiga que está selada com as bênçãos dos oceanos.

Ainda sobre irmandade, não poderia deixar de expressar minha gratidão à Thay, amiga incansável, definitivamente para todas as horas. Não serei capaz de esquecer e agradecer o suficiente quando vendo minhas dificuldades, sentou ao meu lado (mesmo já tendo terminado seu trabalho), mandou engolir o choro e ser forte e confiante (melhores qualidades dela). Obrigada de coração por TODOS os momentos divididos e que a nossa amizade se fortaleça cada vez mais.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Lílian Amado. Muito obrigada pela oportunidade, por me apresentar a Ecotoxicologia e parte do mundo em seus menores níveis biológicos. Sempre presente, incansável e disponível para seus alunos, fazendo seu trabalho com excelência, não é à toa o grande reconhecimento que ela tem. A cada um dos meus colegas do grupo BioPaq, agradeço pela ajuda durante os momentos dentro do laboratório, com coletas e as análises. Em especial agradeço ao John, grande amigo, pessoa incrível que me ajudou desde o primeiro dia no laboratório.

Agradeço ao laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Maria (RS) e às pessoas ligadas e aos professores Drs. Roberto Messias Bezerra e José Carlos Tavares Carvalho da Universidade Federal do Amapá (AP).

Por fim, a cada professor da faculdade de oceanografia, todos contribuíram para meu crescimento tanto pessoal quanto profissional (apesar de estar apenas começando). Obrigada por terem escolhido esta profissão e assumirem a imensa responsabilidade que é repassar o conhecimento.

“O oceano nos deu a vida, está na hora de retornarmos o favor”
(Sylvia Earle, oceanógrafa).

*“Eu sinto gratidão só pelo dom da vida...
Sabedoria pra enxergar o quanto sou pequeno na imensidão do mar.”
Cachalote.*

RESUMO

Os estuários são componentes importantes da zona costeira e a poluição dos mesmos é considerada um problema ambiental crítico. O Porto de Santana/AP está localizado às margens do rio Amazonas e era o ponto de chegada do minério de manganês extraído na Serra do Navio/AP. Os rejeitos deste minério foram descartados numa lagoa artificial liberando arsênio para o ambiente. Este metaloide pode ser um gerador de espécies reativas de oxigênio e gerar estresse oxidativo nos organismos expostos a ele. Os biomarcadores podem ser úteis para determinar o grau de impacto na saúde da biota. O objetivo do trabalho foi avaliar e relacionar as análises de biomarcadores bioquímicos no fígado de peixes da espécie *Propimelodus eigenmanni* com a especiação do arsênio na água. Foram realizadas quatro coletas: Chuvoso 1, Menos chuvoso 1, Menos chuvoso 2 e Chuvoso 2 em dois rios com histórico de contaminação antrópica por arsênio, localizados no Amapá (Beija-flor e Amazonas) e em um rio no Pará (Campumpema) sem histórico de contaminação antrópica direta por esse metaloide. Os peixes foram coletados através de pesca com anzol, crioanestesiados, foi realizada a biometria (peso, comprimento padrão e comprimento total) e o fígado foi dissecado e armazenado em freezer -80°C para as dosagens de biomarcadores. As variáveis abióticas foram mensuradas através de um aparelho multiparâmetro e a água para a dosagem das espécies inorgânicas de As foi coletada em tubos Falcons e armazenadas a 4°C. Além da análise de especiação do arsênio na água foram analisados nos peixes dois biomarcadores de exposição, a glutathione-S-transferase (GST) e a capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP), e um biomarcador de efeito, lipoperoxidação (LPO). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA two-way seguida por teste post-hoc (Tukey) e o nível de significância adotado foi de 5%. No caso da biometria foi realizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. O arsenato foi a única forma de arsênio inorgânico encontrada na água. As concentrações de arsenato foram maiores nos rios Beija-flor e Amazonas e menores no rio Campumpema. A atividade da GST e a LPO não apresentaram diferenças entre os indivíduos de *P. eigenmanni* dos rios Campumpema e Beija-flor e entre os períodos amostrados. A falta de indução da enzima de detoxificação pode estar relacionada ao fato de que há a possibilidade das brânquias metabolizarem os poluentes antes de atingirem o fígado, enquanto a exposição crônica pode explicar a ausência de alteração nos níveis de LPO. No mês menos chuvoso 1, nos organismos do rio Amazonas, a

atividade da GST apresentou um aumento sendo acompanhada pela diminuição do LPO, provavelmente devido ao maior valor de arsenato neste rio durante o período em questão. Os peixes não apresentaram qualquer diferença no ACAP, levando a inferir que a quantidade de arsênio aos quais os organismos estão expostos não está sendo suficiente para induzir sua capacidade antioxidante total. Apesar de o arsênio estar em uma de suas formas biodisponíveis e tóxicas, na grande maioria dos períodos analisados, o balanço redox dos organismos não está sendo alterado pelos xenobióticos presente no ambiente, incluindo o arsenato.

Palavras-chave: Peixe – Amazonas, Rio. Arsênio – Toxicologia - Amazonas, Rio.

ABSTRACT

Estuaries are important components of the coastal zone and the pollution of it is considered a critical environmental problem. The Porto de Santana/AP is located on the banks of the Amazon River and was the arrival point of manganese ore mined in Serra do Navio/AP. The ore tailings were disposed in an artificial lagoon releasing arsenic into the environment. This metalloid can be a reactive oxygen species generator and generate oxidative stress in organisms exposed to it. Biomarkers can be useful in determining the measure of impact on the health of the biota. The aim of this study was to evaluate and relate the analysis of biochemical biomarkers in fish liver of the species *Propimelodus eigenmanni* with the speciation of arsenic in the water. Four samples were taken: rainy 1, dry season 1, dry season 2 and rainy 2 in two rivers with anthropogenic contamination history for arsenic, located in Amapá (Beija-flor and Amazon) and a river in Pará (Campumpema) with no history of direct contamination by this metalloid. Fish were collected through angling, killed by marrow section, biometrics was made (weight, standard length and length) and the liver was dissected and stored in a freezer at -80°C for biomarker measurements. The abiotic variables were measured using a multiparameter device and water for dosage of inorganic species of arsenic was collected in Falcon's tubes and stored at 4 °C. In addition to the speciation of arsenic analysis in water were analyzed in fish two biomarkers of exposure, glutathione-S-transferase (GST) and total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and a biomarker of effect, lipid peroxidation (LPO). Statistical analyzes were executed through ANOVA two-way, followed by post-hoc test (Tukey) and the significance level was 5%. In the case of biometrics was held nonparametric Kruskal-Wallis test. The arsenate was the only form of inorganic arsenic found in water. The arsenate concentrations were higher in Beija-flor and Amazon rivers and lower in Campumpema river. The GST activity and LPO did not differ between *P. eigenmanni* from Campumpema and Beija-flor rivers and between the sampling periods. The absence of induction of detoxifying enzyme can be related to the fact that there is a possibility of gills metabolize pollutants before they reach the liver, while chronic exposure may explain the lack of change in levels of LPO. At rainy 1, in the Amazon organisms, GST activity showed an increase being accompanied by the decrease in LPO, probably due to the higher value of arsenate in this river during the period in question. The fish showed no difference in ACAP, leading to infer that the amount of

arsenic to which the organisms are exposed is not enough to induce their total antioxidant capacity. Although arsenic being in one of its bioavailable and toxic forms, in most of the analyzed periods, the redox balance of organisms is not being changed by xenobiotics in the environment, including arsenate.

Keywords: Fish – Amazon, River. Arsenic – Toxicology - Amazon, River.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Área de estudo	20
3.2 Amostragem	21
3.3 Dados abióticos	22
3.4 Laboratório	23
3.4.1 Biometria	23
3.4.2 Arsênio na água	23
3.4.4 Biomarcador de efeito	25
3.4.5 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Dados abióticos	27
4.2 Biometria dos peixes	28
4.3 Arsênio na água	29
4.4 Biomarcadores de exposição	31
4.4.1 Glutathione – S – transferase (GST)	31
4.4.2 Capacidade antioxidante total	32
4.5 Biomarcador de efeito	33
4.5.1 Lipoperoxidação (LPO)	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A poluição dos estuários é considerada um problema ambiental crítico por causa da alta variação dos diversos fatores abióticos que impõem severas restrições para os organismos que vivem nessas áreas (MATTHIESSEN; LAW, 2002; AMADO et al., 2006). Além disso, afeta a biodiversidade e o homem diretamente, pois esta resulta em uma variedade de efeitos biológicos, que vão desde perturbações bioquímicas e genéticas até o desequilíbrio ecológico, podendo ameaçar processos ecológicos. Portanto, a exploração de recursos biológicos, afeta negativamente a economia (SERIANI et al., 2013), apresenta efeito também na saúde humana, através do consumo de recursos aquáticos contaminados (CLARK, 1997; VAN DER OOST et al., 2003; ABESSA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012).

No estuário do rio Amazonas, no ano de 1957, houve a implantação da Indústria e Comércio de Minérios S/A (ICOMI), sendo este, o primeiro e o mais durável empreendimento mineral de grande escala e intensivo na região amazônica brasileira (DRUMMOND, 2000). Tal indústria explorou durante 40 anos o manganês proveniente do município de Serra do Navio/AP. O minério extraído era transportado por via férrea com extensão de 194 Km até o Porto de Santana/AP, às margens do rio Amazonas (WALDE, 1985). De acordo com SCARPELLI (2003), o minério bruto era comercializado, porém os resíduos finos não apresentavam valor econômico, por tanto, estes foram submetidos a processos de beneficiamento que utilizavam altas temperaturas. O forte aquecimento recristalizou o minério e tornou-o instável, assim o arsênio (As) primariamente ligado aos hidróxidos de ferro e hidróxidos de manganês passou a ser solubilizável em condições ambientais.

O arsênio é um semimetal/metalóide, amplamente distribuído na crosta terrestre onde se encontra presente em mais de 200 espécies de mineral e os compostos de arsênio estão presentes em quantidades traço nas rochas, no solo, água e ar (WHO, 2001). Portanto, a crosta terrestre é sua principal fonte natural, porém este também pode ser mobilizado de seus estoques através de fontes antropogênicas que incluem atividades de mineração, ou inserido no meio ambiente por seu uso na composição de pesticidas, preservantes de madeira, geração de eletricidade pela queima de carvão e refinaria de petróleo, entre outros (ATSDR, 2006).

O arsênio existe em diferentes formas químicas e estados de oxidação que influenciam sua toxicidade e biodisponibilidade (AGUSA et al., 2008), sendo tóxico

tanto para animais quanto para vegetais. As formas inorgânicas de arsênio, como o arsenito (As^{III}) e o arsenato (As^{V}), são mais tóxicas, enquanto as formas orgânicas metiladas, como Monometilarsênio (MMA) e Dimetilarsênio (DMA), são considerados apenas moderadamente tóxicas (GEISZINGER et al., 2002; FATTORINI; REGOLI, 2004). De acordo com CAUSSY et al., (2003), entre as formas inorgânicas, a pentavalente é a que predomina nos ambientes aquáticos, pois é em ambientes aeróbicos (oxidantes) que o arsenato é mais estável, enquanto o arsenito predomina em ambientes anaeróbicos moderadamente redutores (MALIK et al., 2009).

O semimetal em questão apresenta diversas vias de exposição, tais como inalação, contato dérmico, via parental, através da prática agrícola, industrial ou médica (KHAN et al., 2009), além da ingestão de alimentos e água com algum teor do mesmo. A gravidade da exposição vai depender de seu estado de oxidação, quantidade presente do metaloide e tempo de contato. A água para consumo é a via que apresenta maior risco à saúde humana, pois a exposição crônica ao arsênio inorgânico pode ocasionar doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos (FERRECCIO, 1998), além de câncer de pele, pulmões, bexiga e fígado (APOSHIAN et al., 2003).

Uma vez dentro do organismo as formas inorgânicas se comportam de maneiras distintas. Como por exemplo, o arsenato que devido às suas propriedades bioquímicas serem similares as do fosfato pode substituir tal composto em reações de fosforilação, resultando na diminuição da síntese de ATP (FATTORINI; REGOLI, 2004), enquanto o arsenito reage com o grupo sulfidril e pode induzir modificações estruturais em proteínas (WANG et al., 2005) conduzindo à inativação de muitas enzimas (AKTER et al., 2005). A exposição aguda pode comprometer a atividade das enzimas, como já citado anteriormente, além de também comprometer a sinalização das células, o reparo do DNA (KITCHIN, 2001) e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHULIGA et al., 2002), tais como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), radical peroxil (ROO^{\cdot}) e a espécie não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas tanto de forma endógena quanto exógena (RAHMAN, 2007), sendo a primeira gerada pela atividade dos organismos aeróbicos, ou seja, seres que exigem oxigênio molecular (O_2) para oxidar os alimentos e gerar energia. A fonte exógena de geração de EROs pode ser diversa, como xenobióticos e compostos clorados, agentes ambientais, metais, íons e radiação (VALKO et al., 2006), logo o arsênio se enquadra como gerador de espécies reativas de

oxigênio, como já dito anteriormente, sendo classificado como fonte exógena. A reatividade e as propriedades das diferentes espécies reativas de oxigênio variam consideravelmente, sendo o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) a que reage instantaneamente e indiscriminadamente com praticamente todas as moléculas orgânicas (LIVINGSTONE, 2003).

As EROs podem causar diversas lesões às biomoléculas tais como proteínas, ácidos graxos e DNA, causando efeitos citotóxicos e teratogênicos, podendo até levar a morte celular (TIMBRELL, 1991). Em uma célula saudável e normal, EROs e produtos pró-oxidantes são detoxificados por defesas antioxidantes, como captadores de radicais livres de baixo peso molecular e enzimas antioxidantes específicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O desequilíbrio causado pelo excesso de agentes oxidantes e a deficiência no sistema protetor gera a condição de estresse oxidativo que pode causar danos celulares por vezes irreversíveis (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). O dano mais comum evidenciado em uma situação de estresse oxidativo é a peroxidação de lipídeos (GIORGIO et al., 2007), sendo esta uma das principais causas da morte celular. Basicamente, o ataque começa nas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados e gera uma reação em cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). SHILA et al., (2005) afirma que a toxicidade proveniente da exposição ao arsênio pode ser associada a esse tipo de estresse nos organismos expostos.

Os organismos vivos podem bioacumular metais tóxicos e, em alguns casos incorporá-los na cadeia trófica, podendo atingir grande parte dos diferentes extratos que constituem os ecossistemas aquáticos (VIARENGO, 1989). Porém, estes se utilizam de alguns mecanismos para eliminar o xenobiótico. SAKURAI et al., (2005) afirma que quando o arsenato, presente na água potável, é ingerido por humanos e outros organismos, sofre rapidamente uma conversão metabólica conhecida como biotransformação. NEWMAN (1998) define esse mecanismo como uma transformação, biologicamente mediada, de um composto químico em outro levando à eliminação, desintoxicação, seqüestro, redistribuição ou ativação. Ainda de acordo com NEWMAN (1998) a biotransformação pode aumentar a velocidade de perda a partir do organismo convertendo um xenobiótico lipofílico em um composto mais hidrofílico, facilitando a eliminação do mesmo. Porém, existem casos onde há a ativação do contaminante, causando o efeito adverso do mesmo agravando-o ou ainda, um composto inativo podendo ser convertido para um com maior bioatividade.

No caso específico do arsênio, a biotransformação é um processo em que primeiro o arsenato é convertido em arsenito e, em seguida, transformado em produtos mono-, di- e trimetilados (THOMAS et al., 2004). No entanto, alguns estudos recentes sugerem que a biometilação do As não é sempre um evento de desintoxicação, pois metabólitos metilados, como o DMA (dimetilarsênio), podem conservar a sua toxicidade e potencial carcinogênico tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SAKURAI et al., 2005).

Os organismos nos ecossistemas aquáticos são normalmente expostos a misturas de xenobióticos em baixas concentrações com interações que dificultam a previsão dos efeitos deletérios sobre os mesmos quando a informação é obtida exclusivamente a partir de análises químicas (REGOLI et al., 2004). Além disso, a intensa variação dos parâmetros físico-químicos da água, principalmente em regiões estuarinas, tais como a salinidade, pH e temperatura, podem alterar a biodisponibilidade e, por consequência, a toxicidade dos poluentes (WITTERS, 1998). Sendo assim, para avaliar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental é pertinente que sejam mensurados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos destes ecossistemas (WELLS et al., 2001). Esta abordagem pode ser obtida com o emprego de biomarcadores, que são previamente definidos como medições de fluídos corporais, células ou tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes (LIVINGSTONE, 1993).

Os biomarcadores podem ser úteis para determinar o grau de impacto na saúde da biota, além de identificar os estressores ou poluentes responsáveis por estes efeitos (FUENTES-RIOS et al., 2005). Medidas no nível bioquímico ou fisiológico detectam mais rapidamente e especificamente a presença de vários compostos tóxicos, permitindo a identificação precoce de mudança, antes dos efeitos deletérios atingirem níveis de organização mais elevados (MONSERRAT et al., 2003), tais como comunidades e ecossistema. Assim a biorremediação pode ser feita antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com conseqüências ecológicas severas (CAJARAVILLE et al., 2000).

A glutathione S-transferase (GST) pode ser citada como exemplo de um biomarcador amplamente utilizado, pois é uma família de isoenzimas cuja atividade pode reduzir ou evitar que ocorra o estresse oxidativo devido à metabolização de uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, como diversos xenobióticos, por meio da conjugação desta com a glutathione reduzida (GSH) que formam conjugados solúveis em água facilitando a excreção desses substratos (VAN DER OOST et al.,

2003; ALVES, 2012). Outro biomarcador de exposição relevante é a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), este mensura a capacidade do tecido de evitar a produção e eliminar radicais peroxil, esse radical é um dos principais precursores da peroxidação lipídica e geralmente degradado através da atuação da glutathione peroxidase (RIBEIRO et al., 2005).

É interessante que sejam analisados diversos biomarcadores, para minimizar interpretações errôneas nos casos de situações complexas de poluição (MINNIER et al., 2000; FLAMMARION et al., 2002; PACHECO; SANTOS, 2002; DEVILLER, 2005) e também pelo fato de que a avaliação de apenas uma única resposta biológica pode não refletir de forma ampla os danos à saúde dos organismos vivos (ZORITA et al., 2008).

Biomarcadores específicos são aqueles que informam qual tipo de contaminante que está em contato com o organismo, por exemplo, a metalotioneína que tem sido amplamente utilizada para indicar a presença de metais (GIGUÈRE et al., 2003). Uma vez que os poluentes podem modificar diretamente ou indiretamente o equilíbrio entre a concentração de pró-oxidantes e antioxidantes, a determinação do estresse oxidativo e/ou respostas de antioxidantes, nas espécies aquáticas, são comumente utilizados como biomarcadores não específicos (BAINY et al., 1996; GERACITANO et al., 2004). Além da classificação anterior, há também a distinção de biomarcadores entre os chamados de exposição e os de efeito.

Os biomarcadores de exposição são definidos como qualquer xenobiótico, seu metabólito, ou a interação entre o produto de xenobióticos e uma molécula ou uma célula que é medido em um organismo ou uma subunidade do organismo. Enquanto o biomarcador de efeito é qualquer alteração bioquímica, fisiológica ou comportamental que pode modificar o bem estar de um organismo (NRC, 1987; WHO, 1993).

Os biomarcadores são avaliados em organismos residentes em locais contaminados, sendo tais organismos chamados de biomonitores. MARKER et al., (2003) definem um biomonitor como o organismo (parte de um organismo ou uma comunidade de organismos) que contém informações nos aspectos quantitativos da qualidade do ambiente. Um biomonitor ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa ao contaminante que está exposto (AKAISHI, 2004). Os seres vivos em geral, e de uma forma mais intensa os que residem em estuários, apresentam capacidade de manter e conservar suas funções fisiológicas e metabólicas em resposta às mudanças físico-químicas remanescentes, tal capacidade é apresentada à literatura por MAGNUM e TOWLE (1997), que a definem

como homeostasia. A abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais, além da homeostasia, são outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo.

Entre os organismos aquáticos, os peixes teleósteos são considerados bons indicadores de estresse ambiental, devido a sua capacidade de acumular compostos químicos orgânicos e inorgânicos em seus tecidos, e transferi-los para níveis tróficos superiores (BOON et al., 2002; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2005), além do valor econômico de algumas espécies. O fígado e o rim são os principais órgãos com potencial de biotransformação, bioativação e eliminação de xenobiontes, refletindo a exposição aos contaminantes (BERNET et al., 1999). Neste estudo, a espécie de peixe *Propimelodus eigenmanni* (Van der Stigchel, 1946) (Siluriformes: Pimelodidae) foi selecionada como organismo biomonitor. Essa escolha foi baseada no fato de que essa espécie, segundo LUNDBERG e PARISI (2002), apresenta um alcance similar ao de uma espécie considerada sedentária. Os espécimes coletados através do Projeto Calhamazon pelos autores anteriormente citados, foram em sua maioria capturados entre 10 e 1000 metros da costa e de 2 a 30 metros de profundidade, ocupando substratos lamosos e ricos em detritos. Portanto, esse organismo se apresentou como um bom biomonitor pela sua ampla distribuição nos rios da Amazônia Oriental, pelo hábito bentônico e migração limitada.

Dessa forma o presente estudo integra análises bioquímicas em fígado de peixes da espécie *Propimelodus eigenmanni* com análise de especiação do arsênio na água (espécies inorgânicas), a fim de avaliar a qualidade da água em áreas historicamente contaminadas por arsênio no estuário amazônico, do ponto de vista biológico, a fim de contribuir para a elaboração de medidas remediadoras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar e relacionar as análises de biomarcadores bioquímicos no fígado de peixes da espécie *Propimelodus eigenmanni* com a especiação do arsênio (espécies inorgânicas) na água a fim de identificar possível contaminação por arsênio na foz do rio Amazonas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a atividade da enzima de detoxificação glutationa-S-transferase bem como a capacidade antioxidante total como biomarcadores de exposição em fígado de peixes coletados em distintos períodos sazonais em regiões com diferentes históricos de contaminação antrópica por arsênio;
- ✓ Analisar o conteúdo de lipídeos peroxidados como biomarcador de efeito em fígado de peixes coletados em distintos períodos sazonais em regiões com diferentes históricos de contaminação antrópica por arsênio;
- ✓ Determinar a concentração de espécies inorgânicas de arsênio (arsenito e arsenato) presentes em amostras de água coletadas em distintos períodos sazonais em regiões com diferentes históricos de contaminação antrópica por arsênio;
- ✓ Relacionar as concentrações das diferentes espécies químicas de arsênio com os resultados dos biomarcadores bioquímicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A Indústria e Comércios S/A (ICOMI) utilizou dois processos de beneficiamento do manganês. Em 1973 foi construída uma usina de pelletização nas proximidades do porto de Santana/AP, onde expuseram os resíduos a altas temperaturas (900°C – 1.000°C) para gerar pelotas endurecidas, a fim de gerar valor econômico, e esta atividade perdurou até o ano de 1983. Durante os anos de 1989 e 1996, a produção de sínter tomou lugar da pelletização, sendo este também um procedimento que se utiliza de altas temperaturas (700°C). O forte aquecimento recristalizou o minério e tornou-o instável, assim o arsênio (As) primariamente ligado aos hidróxidos de ferro e hidróxidos de manganês passou a ser solubilizável em condições ambientais (SCARPELLI, 2003)

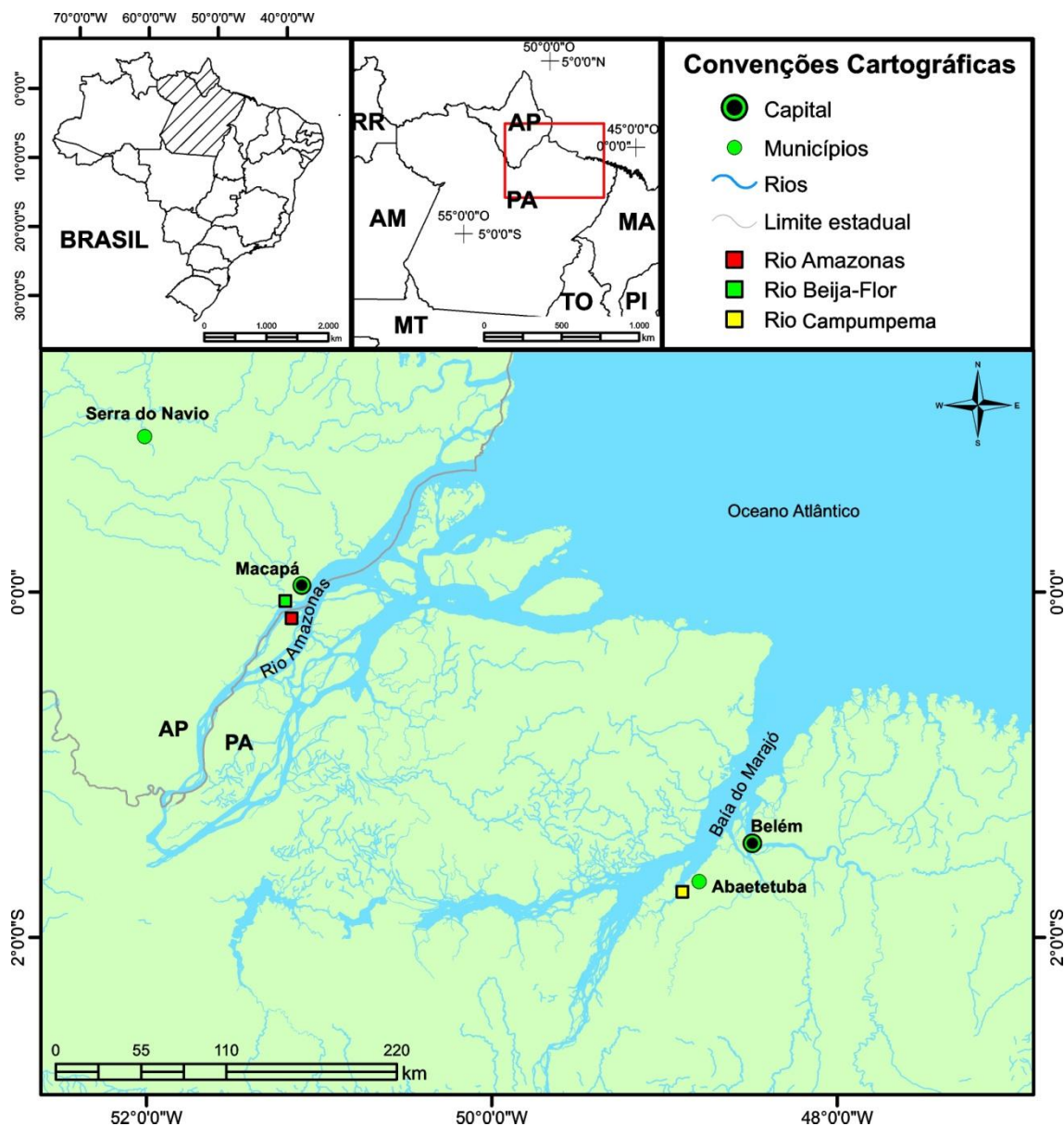
Posteriormente, os rejeitos de ambos os procedimentos foram depositados de maneira negligente numa lagoa artificial localizada na usina. Os resíduos contendo arsênio, quando solubilizados, atingiram as águas do nível freático da lagoa, e superficiais de pequenos igarapés nas suas imediações (SCARPELLI, 2003). No final da década de 90, os resíduos foram retirados da lagoa e depositados na forma de pilhas num trecho restrito da área industrial da ICOMI a céu aberto, à espera de destino final, e representam importante risco de exposição das populações residentes nas comunidades do entorno da área da empresa (SANTOS et al., 2003).

Sendo o histórico local conhecido, foram realizadas quatro coletas ao longo de um ano, nos meses de Abril, Agosto e Novembro de 2013 e Março de 2014, contemplando assim os dois períodos pluviométricos marcantes da região. O mês de Abril/13 representa o período chuvoso 1 e Março/14 o período chuvoso 2, enquanto Agosto/13 e Novembro/13 representam o período menos chuvoso 1 e 2, respectivamente.

Em cada uma das quatro coletas, três pontos foram amostrados (Figura 1), sendo dois deles localizados no estado do Amapá e o outro no estado do Pará. O primeiro às margens do rio Amazonas (00° 03' 13,3" S/ 051° 11' 26,7" W), próximo a comunidade de Elesbão, ponto que apresenta histórico de contaminação antrópica por arsênio. O segundo está localizado às margens do rio Beija-flor (00° 007' 23,8" S/ 051° 16' 53,4" W), próximo a comunidade de Mazagão, sendo esse ponto escolhido por apresentar um gradiente de contaminação devido estar situado a 16 km de distância do ponto onde estão depositados os resíduos de manganês.

O terceiro ponto se encontra às margens do rio Campumpema ($01^{\circ} 44' 09,1''$ S/ $048^{\circ} 53' 46,3''$ W) na cidade de Abaetetuba, localizada no Nordeste do Pará, localidade sem histórico de contaminação antrópica por arsênio.

Figura 1-Mapa da localização dos pontos de coleta no estuário amazônico.



3.2 Amostragem

Como organismo biomonitor foi utilizado o peixe da espécie *Propimelodus eigenmanni*, sendo estes coletados através de pesca com anzol para evitar alterações metabólicas em decorrência do estresse da captura. Após a captura, os indivíduos foram crioanestesiados, mortos por seção da medula e armazenados em um isopor com gelo,

para o transporte até o laboratório de Toxicologia (UFPA). As amostras de água para a realização da análise da especiação do arsênio foram coletadas e armazenadas também no gelo, em tubos Falcon, para transporte até o laboratório.

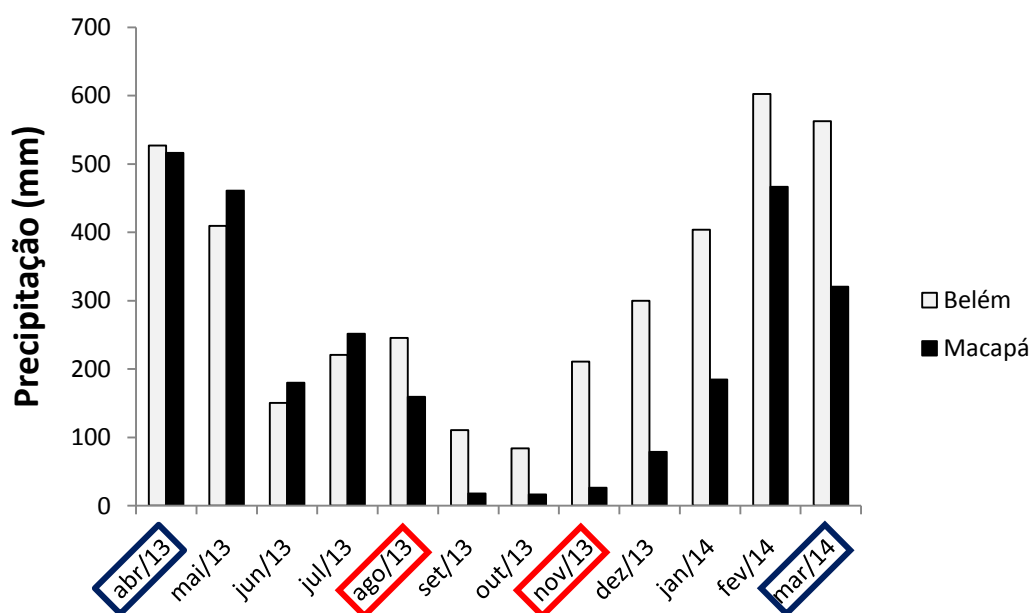
3.3 Dados abióticos

Foram coletados também variáveis físico-químicas, tais como salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura da água, todos medidos através de um aparelho multiparâmetro.

Os dados de precipitação foram obtidos através do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e estes são pertencentes às estações meteorológicas de Belém e Macapá por serem as mais próximas dos locais de coleta.

A precipitação no primeiro mês de coleta (chuvoso 1) foi em torno de 500 mm em ambas as estações de Belém e Macapá. No mês menos chuvoso 1, a precipitação em Macapá foi menor (quase 200 mm) em relação à Belém, onde a mesma ultrapassou os 200 mm. Na campanha menos chuvosa 2, em Belém as chuvas foram mais abundantes, atingindo precipitação maior que 200 mm enquanto em Macapá, a chuva foi mais escassa, não alcançando 100 mm. No mês chuvoso 2 também houve uma grande diferença na precipitação entre as cidades, em Belém foi registrado 600 mm, enquanto Macapá 400 mm (Figura 2).

Figura 2 - Precipitação total em mm nas cidades de Belém e Macapá. Fonte dos dados: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os meses destacados em azul representam os mais chuvosos e os destacados em vermelho os menos chuvosos.



3.4 Laboratório

3.4.1 Biometria

No laboratório os peixes foram pesados (g) e medidos. As medidas adotadas foram comprimento padrão (cm) e comprimento total, sendo a primeira definida como a medida entre a ponta do focinho e a extremidade do raio mais curto (mediano) da nadadeira caudal e a segunda como a medida entre a ponta do focinho e a extremidade da nadadeira caudal (SZPILMAN, 2000).

Posteriormente os mesmos foram dissecados para a obtenção do fígado, fonte de material para a análise dos biomarcadores. Os tecidos foram colocados em microtubos e armazenados num ultrafreezer a -80°C . A partir desse passo, para cada biomarcador se faz necessário um tratamento diferente das amostras, seguindo seus respectivos protocolos. As análises foram feitas com o auxílio de um espectrofluorímetro (Victor X, Perkin Elmer).

3.4.2 Arsênio na água

No total foram analisadas 47 amostras de água para a especificação de arsênio. Sendo 2 provenientes do rio Campumpema, 5 do rio Beija-flor e 3 do rio Amazonas, totalizando 10 amostras no período menos chuvoso 1 (Agosto/13). No período menos chuvoso 2 (Novembro/13) foram analisadas 12 amostras, 4 para cada um dos três rios analisados, enquanto no período chuvoso 2 (Março/14) foram analisadas 15 amostras, 5 provenientes de cada um dos três rios amostrados.

As análises de arsênio e suas espécies químicas inorgânicas na água foram realizadas no laboratório de análises químicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS e baseadas no trabalho de BOHRER et al. (2005). Foi utilizado um espectrômetro (SpectrAA 200, Varian, Austrália) com um sistema VGA 77 (para a geração de hidreto). Na geração de hidretos foi utilizada com taxa de fluxo de 1 mL/min para o redutor e taxa de fluxo da amostra de 8 mL/min, tendo o tetraborato de sódio como agente redutor das amostras (1% em 0,1 mol/L de NaOH). O arsênio total em solução foi determinado pela alteração do tampão citrato em 6.0 mol/L de HCl nas amostras com pH ajustado para 8. O arsenito foi determinado pela redução do tampão citrato (pH 4,5) nas amostras ajustadas para pH 2. A concentração de arsenato foi determinada pela subtração entre a concentração de arsênio total analisada e a concentração de arsenito. As curvas analíticas foram obtidas com padrões contendo entre 5-1000 $\mu\text{g/L}$ de arsênio.

3.4.3 Biomarcadores de exposição

Para a análise da glutathiona – S – transferase (GST) os tecidos foram pesados em uma balança de precisão (FA 2104N - Bioprecisa), numa relação peso:volume de 1:5, transferidos para eppendorfs onde foi adicionada solução tampão contendo Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e MgCl₂.6H₂O (5 mM), pH 8,00. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas à 10.000xg por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante extraído para a análise. Este biomarcador foi analisado seguindo o método descrito por HABIG e JAKOBBY (1981) que é baseado na conjugação de 1mM de Glutathiona (GSH; Sigma) com 1mM de 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB; Sigma). A atividade enzimática foi medida com absorbância à 340nm e expressa em unidade de GST, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para conjugar 1µmol de CDNB/min/mg de proteína, à 25°C e pH 7.00.

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil foi analisada através da determinação da concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO) nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil. Os radicais peroxil são produzidos por decomposição termal (35°) de 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4mM; Aldrich) (WINSTON et al., 1998). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca de fluorescência (Victor X, Perkin Elmer), em um meio contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 40 µM H₂DCF-DA. A geração de fluorescência total (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) foi calculada pela integração da unidade de fluorescência (UF) durante o período de leitura (60 minutos), posteriormente os dados da UF foram ajustados para uma função polinomial de segunda ordem. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante uma vez que uma alta fluorescência será obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (AMADO et al., 2009). Para facilitar a interpretação dos gráficos, esses dados estão expressos como o inverso da área relativa, possibilitando a leitura direta dos mesmos.

Para a relativização dos biomarcadores de exposição fez-se necessário a dosagem da concentração de proteínas totais, sendo esta realizada através do método de biureto utilizando um kit comercial da marca DOLES LTDA.

3.4.4 Biomarcador de efeito

Para a análise de conteúdo de lipídeos peroxidados (LPO) os tecidos foram pesados numa relação peso:volume de 1:12, transferidos para eppendorfs onde foi adicionado metanol 100% resfriado a 5°C. Os tecidos foram centrifugados à 1000xg por 10 minutos a 4°C sendo o sobrenadante separado do pellet e utilizado para a análise. O ensaio é baseado no método FOX (HERMES-LIMA et al., 1995 e MONSERRAT et al., 2003). Para a realização do ensaio foram adicionados de maneira seqüencial os seguintes reagentes nas microplacas, FeSO₄ (90 µL), H₂SO₄/0,25 M (35 µL), Xilenol 1mM (35 µL), H₂O mili Q (170 µL) e 20 µL de amostra. As microplacas foram incubadas à temperatura ambiente durante 135 minutos, posteriormente lida no leitor de microplacas (Victor X, Perkin Elmer) a 550 nm e em seguida foram adicionados 10µL de uma solução de CHP (hidroperóxido de cumeno 0,175 mM), como padrão de lipídeo peroxidado. Após 15 minutos (tempo para estabilizar a reação) houve uma nova leitura. As reações inespecíficas que provavelmente ocorrem durante o ensaio são identificadas e subtraídas da reação pelo preparo de uma microplaca que substitui o ferro por H₂O mili Q. Os resultados foram expressos em termos de hidroperóxidos de lipídeos (como substâncias reativas ao FOX) em nmol de CHP/g de tecido. O volume de amostra, diluição da mesma e período de incubação foram determinados pela padronização realizada antes das análises reais.

As análises dos biomarcadores de exposição (glutathione S-transferase e capacidade antioxidante total) foram realizadas com as mesmas amostras, pois a quantidade do sobrenadante foi suficiente para seguir ambos os protocolos, porém para a análise do biomarcador de efeito (lipoperoxidação) se fez necessária a utilização de amostras diferentes, principalmente pelo fato do preparo das amostras ser diferenciado em relação aos outros dois biomarcadores.

3.4.5 Análise estatística

A concentração de arsênio, os biomarcadores e a biometria foram testadas por local em relação aos períodos, bem como em cada período nos três locais.

Os dados dos biomarcadores foram testados para normalidade (KolmogorovSmirnov) e homocedasticidade (Levene), a análise estatística foi realizada através de ANOVA two-way seguida por teste post-hoc (Tukey), sendo estes dados expressos em média \pm desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados de biometria não atenderam aos pressupostos, portanto foi realizado o teste Kurskal-Wallis com os dados expressos em mediana \pm quartil.

4 RESULTADOS

4.1 Dados abióticos

A salinidade não apresentou variação, permanecendo uniforme (no valor de 0) em todos os pontos e períodos de coleta. Em relação à condutividade, no mês menos chuvoso 2 foram registrados o valor mais alto (62,5 μS) e mais baixo (21,1 μS) entre todos os períodos, o primeiro pertencente ao rio Amazonas e o segundo ao rio Campumpema (Tabela 1).

O oxigênio dissolvido apresentou sua menor concentração no mês chuvoso 1 no rio Amazonas (0,43 mg/L), enquanto a maior concentração foi encontrada no rio Beija-flor no mês menos chuvoso 2 (6,32 mg/L). A temperatura da água apresentou máxima de 30,6°C e mínima de 27,3°C, ambas registradas no rio Campumpema, porém a máxima ocorreu no mês menos chuvoso 2 e a mínima no mês chuvoso 2.

A temperatura do ar teve mínimas de 29°C e máximas de 32°C. Sendo que as mínimas ocorreram nos rios Beija-flor no mês menos chuvoso 1 e Amazonas no mês chuvoso 2, enquanto as máximas ocorreram no mês chuvoso 1 e no mês menos chuvoso 2, ambas no rio Campumpema.

Tabela 1 - Variáveis abióticas mensuradas nos quatro períodos e locais de coleta.

Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Chuvoso 1	Menos chuvoso 1	Menos chuvoso 2	Chuvoso 2
Campumpema	38,7	25,9	21,1	29,1
Beija-flor	32,5	44,7	40,3	40
Amazonas	40,4	35,6	62,5	32,5
O₂Dissolvido (mg/L)				
Campumpema	0,5	0,67	0,79	3,35
Beija-flor	0,48	0,56	6,32	5,8
Amazonas	0,43	1	0,85	4,6
Temperatura da água (°C)				
Campumpema	27,7	29,8	30,6	27,3
Beija-flor	-	29,7	30	29
Amazonas	28,8	30,3	30	28,4

4.2 Biometria dos peixes

Foram utilizados 261 peixes no total para a análise dos biomarcadores dentro dos 4 períodos de coleta.

Os peixes dos três rios amostrados não apresentaram diferenças no peso em relação aos períodos sazonais (Tabela 2), quando considerado o mesmo rio. Comparando-se os peixes dos diferentes rios, os do rio Campumpema apresentaram os valores mais altos em todas as coletas, enquanto os peixes com menores pesos foram capturados no rio Amazonas. Nos meses chuvoso 1 e menos chuvoso 1, os animais do rio Beija-flor tiveram pesos intermediários em relação aos outros dois rios, apresentando semelhança estatística com ambos. No mês menos chuvoso 2, os indivíduos do rio Amazonas foram significativamente menos pesados em relação aos dos rios Campumpema e Beija-flor. No mês chuvoso 2, os organismos dos três rios apresentaram valores de peso estatisticamente semelhantes.

O comprimento padrão dos peixes coletados seguiu semelhante ao padrão da variável “peso”, pois não houve diferença nos locais entre os períodos sazonais (Tabela 2). Os animais do rio Campumpema obtiveram maiores valores de comprimento padrão, já os do rio Amazonas, os menores valores. No mês chuvoso 1, os indivíduos do rio Amazonas apresentaram comprimento padrão significativamente menor em relação aos do rio Campumpema e Beija-flor, que permaneceram semelhantes estatisticamente entre si. No período menos chuvoso 1, os organismos do rio Campumpema obtiveram comprimento padrão significativamente maior em relação aos dos rios Beija-flor e Amazonas, que nesse mês não se diferiram estatisticamente.

No mês menos chuvoso 2, os peixes do rio Campumpema apresentaram valores significativamente maiores em relação aos do rio Amazonas, enquanto os do rio Beija-flor obtiveram valores semelhantes estatisticamente com ambos os rios. No mês chuvoso 2 não houve diferença entre os organismos dos três pontos.

Assim como as variáveis “peso” e “comprimento padrão”, os peixes dos três pontos coletados não apresentaram diferença entre os períodos sazonais (Tabela 3). No mês chuvoso 1, os indivíduos do rio Campumpema e Beija-flor obtiveram tamanhos estatisticamente semelhantes e maiores aos do rio Amazonas. Nos dois meses representantes do período menos chuvoso, os animais do rio Amazonas foram significativamente menores em relação aos do rio Campumpema, enquanto os peixes do rio Beija-flor permaneceram semelhantes aos de ambos os rios neste período. No mês

chuvoso 2, assim como nas variáveis anteriores não houve diferença entre os organismos dos três rios.

Tabela 2 - Peso (g), comprimento padrão (cm) e comprimento total (cm) dos peixes coletados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os pontos no mesmo período. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo ponto. Os dados estão expressos em mediana \pm quartil.

Peso (g)	Chuvoso 1 (n=67)	Menos chuvoso 1 (n = 62)	Menos chuvoso 2 (n = 67)	Chuvoso 2 (n = 65)
Campumpema	40,6 \pm 25,3Aa (n = 22)	42,6 \pm 31,5Aa (n = 18)	29,7 \pm 23,7 Aa (n= 22)	27,7 \pm 16,8 Aa (n = 22)
Beija-flor	25,6 \pm 19,4Aab (n = 23)	22,5 \pm 19,0Aab (n = 21)	19,2 \pm 14,1 Aa (n = 23)	25,2 \pm 20,8Aa (n = 21)
Amazonas	15,3 \pm 10,3Ab (n = 22)	16,0 \pm 11,3Ab (n = 23)	15,4 \pm 14,2 Ab (n = 22)	17,4 \pm 14,8 Aa (n = 22)
Comprimento Padrão (cm)	Chuvoso 1 (n = 67)	Menos chuvoso 1 (n = 62)	Menos chuvoso 2 (n = 67)	Chuvoso 2 (n = 65)
Campumpema	15,4 \pm 13,1 Aa (n = 22)	15,8 \pm 14,9 Aa (n = 18)	13,7 \pm 13,1 Aa (n= 22)	13,0 \pm 11,0 Aa (n = 22)
Beija-flor	14,1 \pm 13,0 Aa (n = 23)	12,6 \pm 11,6 Ab (n = 21)	12,1 \pm 11,1Aab (n = 23)	12,6 \pm 11,4 Aa (n = 21)
Amazonas	10,8 \pm 9,8 Ab (n = 22)	11,2 \pm 10,3 Ab (n = 23)	11,2 \pm 10,6 Ab (n = 22)	12,2 \pm 11,7 Aa (n = 22)
Comprimento Total (cm)	Chuvoso 1 (n = 67)	Menos chuvoso 1 (n = 62)	Menos chuvoso 2 (n = 67)	Chuvoso 2 (n = 65)
Campumpema	20,1 \pm 18,0 Aa (n = 22)	20,5 \pm 18,9 Aa (n = 18)	19,2 \pm 18,5 Aa (n= 22)	18,4 \pm 17,0 Aa (n = 22)
Beija-flor	17,6 \pm 17,1 Aa (n = 23)	17,2 \pm 16,3Aab (n = 21)	16,6 \pm 15,7Aab (n = 23)	18,4 \pm 17,2 Aa (n = 21)
Amazonas	14,6 \pm 13,6 Ab (n = 22)	15,1 \pm 14,1Ab (n = 23)	16,2 \pm 15,1 Ab (n = 22)	16,6 \pm 15,4 Aa (n = 22)

4.3 Arsênio na água

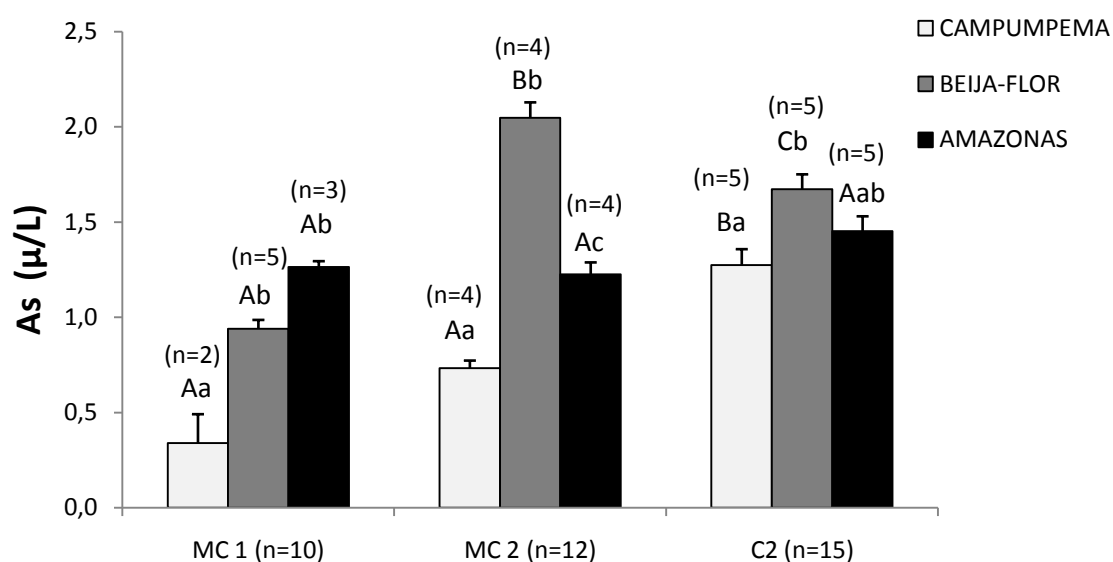
Nas análises de especiação do arsênio, entre as formas inorgânicas, apenas o arsenato foi encontrado nas amostras, o arsenito não foi detectado em nenhum ponto ou período de coleta. Não foi possível a coleta de água no período chuvoso 1.

Na coleta realizada no mês menos chuvoso 1, não houve diferença entre as concentrações de arsenato nos rios Beija-flor ($0,9 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$) e Amazonas

($1,3\pm 0,03\mu\text{g/L}$), porém o rio Campumpema mostrou uma concentração significativamente mais baixa ($0,3\pm 0,15\mu\text{g/L}$) em relação aos outros dois rios. No mês menos chuvoso 2, houve diferença entre todos os rios amostrados, o rio Amazonas apresentou uma concentração intermediária ($1,2\pm 0,06\mu\text{g/L}$) entre a maior concentração do rio Beija-flor ($2,0\pm 0,08\mu\text{g/L}$) e a menor do rio Campumpema ($0,7\pm 0,04\mu\text{g/L}$). Na campanha chuvosa 2 o rio Campumpema ($1,3\pm 0,08\mu\text{g/L}$) mostrou uma concentração significativamente menor a do rio Beija-flor ($1,7\pm 0,08\mu\text{g/L}$) e o rio Amazonas ($1,5\pm 0,08\mu\text{g/L}$) se mostrou estatisticamente semelhante aos outros dois rios (Figura 3).

O rio Campumpema apresentou variação sazonal. No mês chuvoso 2, foi possível observar um aumento significativo em relação aos meses anteriores. O rio Beija-flor também variou sazonalmente e houve diferença significativa entre todos os períodos. A maior concentração de arsenato neste rio encontra-se no mês menos chuvoso 2, seguido pelo mês chuvoso 2 e pelo mês menos chuvoso 1. O rio Amazonas teve uma baixa variação sazonal, não havendo diferença significativa entre os meses coletados (Figura 3).

Figura 3 - Concentração de arsenato nos rios amostrados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os pontos no mesmo período. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo ponto. MC1, MC2, C2 significam Menos Chuvoso 1, Menos Chuvoso 2 e Chuvoso 2, respectivamente e n o número de amostras. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

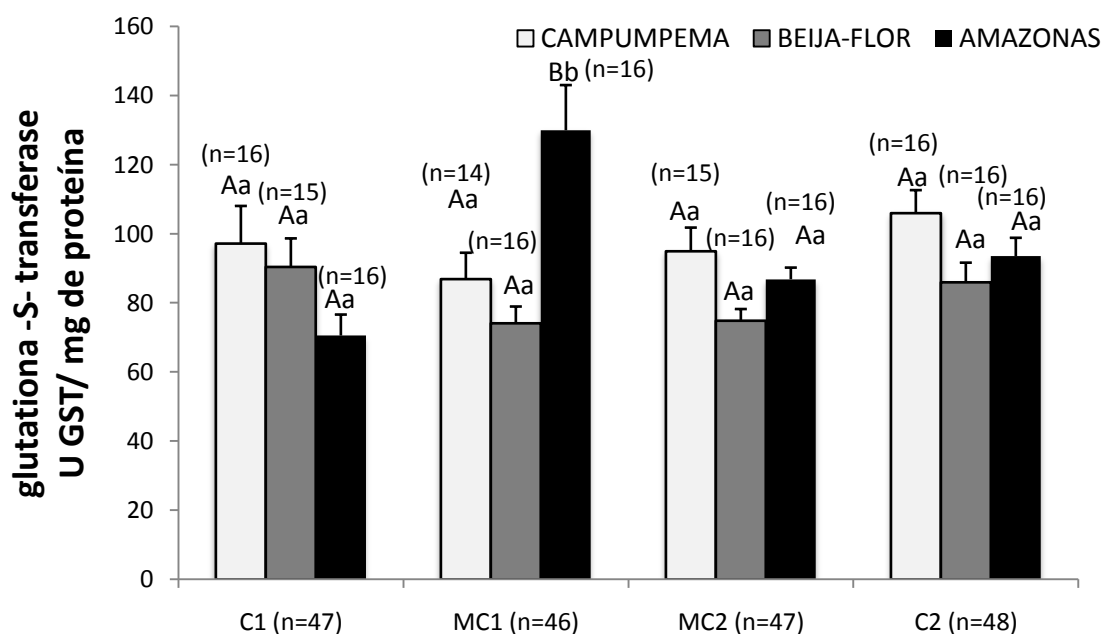


4.4 Biomarcadores de exposição

4.4.1 Glutathione S-transferase (GST)

Na campanha pertencente ao mês chuvoso 1 não houve diferença entre as atividades da enzima nos três rios do estuário amazônico. Na coleta do mês menos chuvoso 1 os peixes do rio Campumpema ($78,7 \pm 7,6$ U GST/mg de proteína) e do rio Beija-flor ($83,3 \pm 4,9$ U GST/mg de proteína) apresentaram atividade estatisticamente semelhantes e os do rio Amazonas ($118,1 \pm 13,1$ U GST/mg de proteína) mostraram um atividade superior desta enzima em relação aos dois primeiros. Nos meses que contemplam os períodos menos chuvoso 2 e chuvoso 2, assim como no mês chuvoso 1, não há diferença significativa na atividade da GST entre os organismos dos três rios em questão (Figura 4). Já no mês menos chuvoso 1, registrou-se uma maior atividade desta enzima de detoxificação nos animais provenientes do rio Amazonas em relação aos animais de Campumpema e Beija-flor. Também foi neste período sazonal que se verificou a maior atividade desta enzima nos animais do rio Amazonas. Nos outros dois rios a atividade da enzima permaneceu constante ao longo dos períodos de coleta.

Figura 4 - Atividade da glutathione-S-transferase no fígado de *Propimelodus eigenmanni* amostrados no estuário amazônico. Letras minúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os pontos no mesmo período. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo ponto. C1, MC1, MC2, C2 significam Chuvoso 1, Menos Chuvoso 1, Menos Chuvoso 2 e Chuvoso 2, respectivamente e n o número de amostras. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

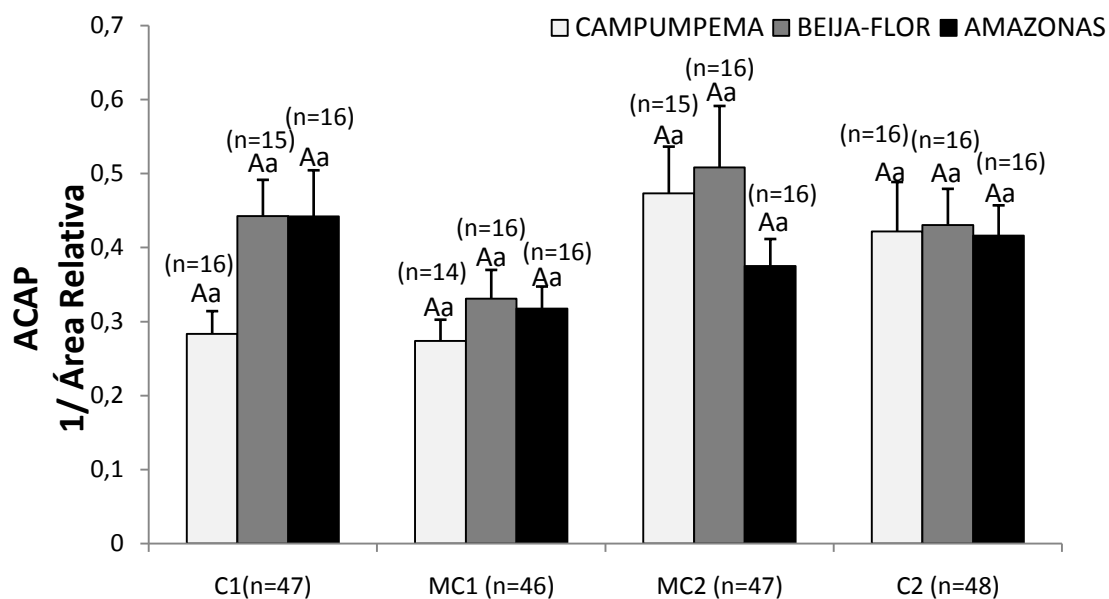


4.4.2 Capacidade antioxidante total

No mês chuvoso 1 não houve diferença estatística entre a capacidade antioxidante total dos peixes nos três rios amostrados. Os outros períodos seguintes (menos chuvoso 1, menos chuvoso 2 e chuvoso 2) se comportaram da mesma forma, não apresentando diferença entre os organismos dos pontos coletados (Figura 5).

Os indivíduos do rio Campumpema não apresentaram nenhuma diferença ao longo dos quatro períodos de coleta. Os peixes dos rios Beija-flor e Amazonas apresentam perfis semelhantes e assim como os organismos do rio Campumpema, não foi observada diferença da capacidade antioxidante total ao longo dos períodos (Figura 5).

Figura 5 - Capacidade antioxidante total no fígado de *Propimelodus eigenmanni* amostrados no estuário amazônico. Letras minúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os pontos no mesmo período. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo ponto. C1, MC1, MC2, C2 significam Chuvoso1, Menos Chuvoso 1, Menos Chuvoso 2 e Chuvoso 2, respectivamente e n o número de amostras. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.



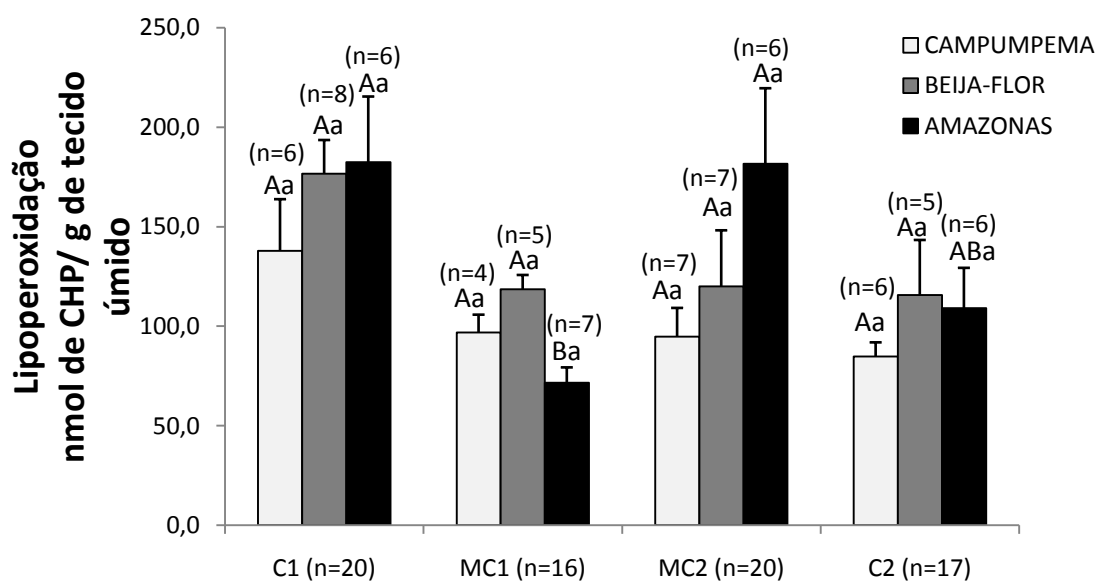
4.5 Biomarcador de efeito

4.5.1 Lipoperoxidação (LPO)

Na primeira coleta (chuvoso 1) não há diferença no conteúdo de lipídeos peroxidados nos peixes entre os três rios amostrados. Tal cenário repete-se nos outros três períodos (menos chuvoso 1, menos chuvoso 2 e chuvoso 2), não havendo diferença entre os rios em cada mês coletado (Figura 6).

O conteúdo de lipídeos peroxidados nos organismos provenientes do rio Campumpema e Beija-flor não apresentaram diferença estatística entre os períodos de coleta. Já nos peixes do rio Amazonas a lipoperoxidação apresentou variação sazonal, com diminuição no período menos chuvoso 1 ($71,6 \pm 7,8$ nmol CHP/g de tecido úmido).

Figura 6 - Lipoperoxidação no fígado de *Propimelodus eigenmanni* amostrados no estuário amazônico. Letras minúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os pontos no mesmo período. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo ponto. C1, MC1, MC2, C2 significam Chuvoso1, Menos Chuvoso 1, Menos Chuvoso 2 e Chuvoso 2, respectivamente e n o número de amostras. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.



5 DISCUSSÃO

A salinidade não apresentou variação entre os períodos e locais de coleta, o que pode ser explicado pela estratificação vertical bem desenvolvida da coluna d'água da plataforma continental do Amazonas dificultando a penetração da água salgada (GIBBS, 1970). Além disso, a imensa descarga do rio Amazonas não permite a entrada de água do mar na foz do rio (mesmo durante o período de descarga mínima) (NITTROUER et al., 1991).

Em relação a condutividade, os ambientes não mostraram um padrão nos períodos chuvoso 1, menos chuvoso 1 e chuvoso 2. No período menos chuvoso 2 o rio Amazonas apresentou o valor máximo de condutividade (62,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$), o que pode ser explicado pelo fato de que rios de águas brancas são ricos em nutrientes oriundos da erosão das encostas andinas (SIOLI, 1968), agindo conjuntamente com esse fator, a intensa decomposição da matéria orgânica aumenta a quantidade de íons dissolvidos na água, elevando assim a sua condutividade (ESTEVES, 1998). Já o rio Campumpema apresentou o valor mínimo de condutividade (21,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$) durante esse mesmo período (menos chuvoso 2), pois é quando há um menor movimento na coluna d'água provocando um menor carregamento de partículas e íons, mantendo uma baixa condutividade.

O oxigênio dissolvido apresenta maior concentração no período menos chuvoso 2 (6,32 mg/L – rio Beija-flor), enquanto a menor concentração se encontra no período chuvoso 1 (0,43 mg/L – rio Amazonas). As principais fontes de perda de oxigênio são dadas pela decomposição de matéria orgânica (oxidação), perdas para a atmosfera e respiração de organismos aquáticos (ESTEVES, 1998). Tendo isso em vista, no período chuvoso, a concentração de oxigênio dissolvido na água tende a diminuir devido ao aumento de nutrientes transportados para os rios através do escoamento artificial (VALLE JUNIOR, 2013). As altas taxas de sedimentação no período menos chuvoso podem explicar uma maior concentração de oxigênio dissolvido, pois nestas condições a água ganha relativa transparência, favorecendo a penetração solar intensificando a fotossíntese (MONTEIRO et al., 2015) e segundo ESTEVES (1998) esta atividade fotossintética é a principal fonte de oxigênio no ambiente aquático.

A homogeneidade da temperatura da água é típica de águas estuarinas tropicais (FLORES MONTES, 1996), essa estabilidade pode ser explicada pelo grande volume de água descarregada, ação dos ventos e correntes de maré gerando a turbulência da água (SANTOS et al., 1986).

Em relação a especiação do arsênio, o arsenato foi a única forma de arsênio inorgânico encontrada, tendo um potencial de poluição, visto que o mesmo dentro do organismo concorre com o fosfato, alterando assim a produção de ATP (geração de energia para o metabolismo) (FATTORINI; REGOLI, 2004). De acordo com a literatura, os rios de águas brancas, onde se encaixam os três rios amostrados (Campumpema, Beija-flor e Amazonas), possuem pH próximo a 7 (SIOLI, 1968; KONHAUSER et al., 1994; GAILLARDET et al., 1997) e nesses ambientes aquáticos aeróbicos o arsenito é oxidado gerando arsenato (LEMMO et al., 1983).

A resolução CONAMA número 357/2005, padroniza o valor de arsênio total nos corpos de água doce com padrões de consumo para pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo em 0,14 µg/L, porém os valores encontrados em todos os locais e períodos de coleta foram superiores ao permitido pelo CONAMA. De acordo com SÁNCHEZ-RODAS (2005) em comparação com sistemas aquáticos de mar aberto, é comum que os rios e estuários apresentem valores de arsênio bem mais altos, por possuírem elevadas quantidades de material em suspensão e sais dissolvidos provenientes da erosão dos sedimentos encontrados ao longo das bacias de drenagens (SIOLI; KLINGE, 1962).

O rio Campumpema apresentou concentrações semelhantes de arsenato nos meses menos chuvosos, enquanto no período chuvoso houve um aumento significativo ($p > 0,05$) da concentração do mesmo. Esse perfil pode ser explicado pela alta precipitação desse mês (562,7 mm) que gera alta vazão no rio, maior carreamento de água proveniente do continente. Dessa forma há liberação do metaloide retido nas rochas adsorvidos em óxidos de ferro e argilo-minerais e disponibilização pelo intemperismo (FIGUEIREDO, 2000; GRAY et al., 1999; SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002), além do revolvimento do sedimento de fundo.

As concentrações do rio Beija-flor foram diferentes estatisticamente ($p > 0,05$) em todos os períodos amostrados, apresentando um pico no período menos chuvoso 2. Essa variação pode estar relacionada com a hidrodinâmica do rio, pois por ser um braço de rio estreito e mais fechado em relação aos outros dois ambientes, o escoamento das águas acontece em menores proporções e de maneira mais lenta. PARREIRA (2012) comparou a dispersão de poluentes entre canais com diferentes hidrodinâmicas, comprovando que ambientes de baixa energia, como neste caso o rio Beija-flor, apresentam maiores concentrações de poluentes em geral agregados a materiais particulados em suspensão, fazendo com que esses compostos permaneçam nesse

ambiente não havendo intensa dispersão. Já em ambientes sujeitos a uma hidrodinâmica mais intensa, há dispersão desses poluentes e manutenção da qualidade das águas corroborando com o que relata AMORIM et al., (2009).

O único rio que não apresentou variação ao longo dos períodos analisados foi o Amazonas, porém ainda assim obteve maior concentração em relação ao rio sem histórico de contaminação antrópica por arsênio. A alta concentração de arsênio em águas naturais pode ser proveniente de diversas fontes, que inclui a dissolução de pirita, minerais e minérios, efluentes de indústrias do carvão, ferro e mineração de metais, resíduos de indústria de transformação química e de uma variedade de aplicações agrícolas e industriais (BUCHANAN, 1962; BROWNING, 1969; ATSDR, 2006). Essa afirmação corrobora o fato do ponto de coleta ser próximo a um local onde houve armazenamento de rejeitos de minério de manganês, além da formação geológica do local.

A concentração de arsenato no rio Campumpema é a menor encontrada entre os três pontos de coleta em todos os períodos, concordando assim com a expectativa inicial de que este local não apresenta histórico de contaminação antrópica direta por arsênio, sendo as concentrações encontradas, provavelmente, valores basais de arsênio na água para este ambiente. Devendo levar em consideração que estes valores estão acima do que a resolução nº 357/2005 do CONAMA permite, portanto deve-se atentar para o fato de que resolução pode não estar se baseando em valores que se aproximam da realidade do local. Os maiores valores nos rios Beija-flor e Amazonas também corroboram com a expectativa inicial de que estes locais apresentam histórico de contaminação antrópica por arsênio, onde seus perfis de acúmulo do metaloide ao longo dos períodos de coleta possivelmente estão ligados com a dinâmica de cada local.

Sendo feita a avaliação do comportamento do arsênio no ambiente estudado, precisam-se avaliar os efeitos que este metaloide está causando nos organismos expostos. Primeiramente se faz necessário saber que a glutathione (GSH) está presente na maioria das células em concentração milimolar e é um dos antioxidantes intracelulares mais importantes (MEISTER, 1988), bem como, potencialmente, um alvo para o arsênio (KALYANARAMAN, 1995). Numerosos compostos tóxicos ou potencialmente tóxicos são absorvidos ou removidos da célula por vias mediadas pela GSH (BALLATORI, 1994). Tem sido sugerido que a metilação GSH-dependente e a ligação às proteínas são os principais mecanismos de desintoxicação do arsênio por mamíferos e outros organismos (APOSHIAN, 1997). A GSH também ajuda a manter o estado

reduzido normal das células e neutralizam os efeitos deletérios do estresse oxidativo, reduzindo dissulfuretos de proteína, e pela eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (MEISTER 1995; SALVEMINI et al., 1999).

HU et al., (2003) através de seus resultados mostram que o arsenito (AsIII) pode alterar o nível de GSH, tanto a curto quanto a longo prazo, em células humanas. Os padrões dos efeitos dependem da intensidade e da duração da exposição ao arsênio. No caso do trabalho supracitado, após tratamento em longo prazo com baixa concentração de arsênio, o nível de GSH foi diminuído.

Neste estudo, apesar da concentração de GSH não ter sido avaliada, a atividade da GST foi empregada como um biomarcador de exposição. A atividade da glutathione-S-transferase é intimamente influenciada pela concentração de GSH presente no meio intracelular, pois a GST catalisa a reação entre a GSH e substratos eletrofílicos, sendo este um passo essencial na desintoxicação e eliminação de diversas classes de compostos químicos tóxicos, evitando lesão tóxica em vários tecidos (KEEN et al., 1976; HABIG; JAKOBY, 1981; PICKETT; LU, 1989; MARI; CEDERBAUM, 2000). A atividade desta enzima não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) nos meses chuvoso 1, menos chuvoso 1 (com exceção do rio Amazonas), menos chuvoso 2 e chuvoso 2, quando comparados os pontos de coleta. Sendo assim, podemos inferir que outras vias de detoxificação, como a interação direta da GSH com as espécies químicas de As, estão atuando em paralelo à atividade da GST, o que justificaria a falta de indução da atividade desta enzima ao longo do ano. VENTURA-LIMA et al., (2009) também observaram resultado semelhante ao avaliar a atividade desta enzima em brânquias do peixe zebra (*Danio rerio*) expostos à arsênio inorgânico. Em peixes, poluentes absorvidos através das brânquias podem ser metabolizados antes de chegar ao fígado e, mesmo com uma baixa capacidade metabólica, esse órgão pode contribuir significativamente para evitar a acumulação de poluentes ambientais nos demais órgãos (VENTURA-LIMA et al., 2009). Além disso, em um estudo realizado com arsenito e também com um tipo de composto orgânico (benzopireno) em baixas concentrações de exposição também verificou ausência de indução da GST. THOMPSON et al., (2010) observaram que a exposição de *Danio rerio* a benzopireno, a arsenito e a combinação de ambos (concentração de $0,4\mu\text{M}$ de benzopireno; $0,4\mu\text{M}$ de benzopireno + $0,4\mu\text{M}$ de arsenito; $0,4\mu\text{M}$ de benzopireno + $8\mu\text{M}$ de arsenito e $0,4\mu\text{M}$ de arsenito durante 7 dias) não influenciaram na atividade enzimática da GST hepática.

A ausência de indução da atividade da GST nos organismos analisados também pode estar ligada ao fato da biotransformação estar sendo efetiva. VENTURA-LIMA et al., (2011) analisaram a diferença dos efeitos do arsênio inorgânico (AsIII e Asv) em poliquetas estuarinos (*Laonereis acuta*) e ao realizar a análise da especiação de arsênio nos organismos, encontrou um aumento de compostos metilados (MMA e DMA) nos poliquetas expostos ao arsenato (Asv) em comparação aos expostos a arsenito (AsIII), estando este perfil de acordo com dados de acumulação de arsênio em organismos marinhos (FATTORINI et al., 2006). VENTURA-LIMA et al., (2011) ainda relacionaram a maior concentração de arsênio metilado com a inibição da atividade da GST Ω observada nesse grupo de indivíduos, sendo esta enzima membro da família de GST que apresenta resíduos de cisteína no sítio ativo estando envolvida na metabolização do arsênio (SAMPAYO-REYES; ZAKHARYAN, 2006). Alguns autores descreveram a biotransformação de arsênio inorgânico para formas metiladas como MMA e DMA como a via metabólica clássica (APOSHIAN et al., 2004; THOMAS, 2007) de detoxificação.

A glutathione-S-transferase não é o único biomarcador influenciado pelo nível de GSH na célula, a glutathione também implica no perfil da capacidade antioxidante total. AMADO et al., (2009) comprovaram que os resultados obtidos com amostras de fígado enriquecidas com GSH, mostraram uma clara redução da diferença de área, ou seja, um aumento da capacidade antioxidante total. O mesmo foi observado por REGOLI e WINSTON (1999) empregando a técnica TOSC (capacidade total de eliminação de oxirradicais em inglês). Em nosso estudo, os peixes não apresentaram qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) na capacidade antioxidante total, indicando que houve estabilidade dos níveis de GSH e de outros antioxidantes não enzimáticos e até mesmo enzimáticos durante o período de coleta, concordando com a falta de indução da GST já mencionada anteriormente. Sabe-se que uma pequena porcentagem (aproximadamente de 1 a 3%) do oxigênio que os organismos aeróbicos utilizam para a oxidação de alimentos e geração de energia é convertida em espécies reativas de oxigênio (LIVINGSTONE, 2003) e que este percentual pode ser elevado em situações de exposição a poluentes por vias de detoxificação intensificarem processos geradores de EROs. Os resultados obtidos com os biomarcadores de exposição analisados nos permite inferir que, na maioria dos períodos amostrados (com exceção do período menos chuvoso 1) os níveis de exposição a compostos xenobióticos, incluindo as forma

inorgânicas de As, nos ambientes analisados não estão sendo suficientes para gerar respostas biológicas compensatórias nos organismos biomonitores selecionados.

Em relação ao biomarcador de efeito analisado, nos meses chuvoso 1, menos chuvoso 1 (com exceção do rio Amazonas), menos chuvoso 2 e chuvoso 2 os organismos não apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de lipídeos peroxidados indicando que o sistema de defesa antioxidante destes animais está em equilíbrio com os níveis de EROs geradas endogenamente. PEDLAR et al., (2002) afirmam que a ausência de indução de LPO no peixe da espécie *Coregonus clupeaformis* pode acontecer devido as seguintes razões: via de exposição, tempo de exposição e indução de LPO em outros tecidos e/ou eliminação de radicais livres por metalotioneínas. As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular identificada em vertebrados, invertebrados e microrganismos, rica em resíduos de cisteína e que tem como papel principal a quelação de metais (MASON; JENKINS, 1995). O fato de quelarem metais de transição faz com os mesmos fiquem longe de alvos celulares e do próprio oxigênio molecular, evitando a geração EROs e de danos oxidativos. A metalotioneína hepática elevada em *Coregonus clupeaformis* pode ter fornecido uma proteção adequada contra a indução de LPO, como resultado da exposição dietética ao arsênio (PEDLAR et al., 2002). DAS et al., (1998) analisaram LPO no fígado de *Anabas testudineus* e correlacionaram a ausência da indução desse biomarcador após 30 dias de exposição com um aumento significativo na concentração de metalotioneína hepática durante o período de tempo analisado.

No período menos chuvoso 1, a atividade da glutatona-S-transferase dos organismos do rio Amazonas, apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos indivíduos dos outros dois rios amostrados, estando este fato provavelmente relacionado com a maior concentração de arsenato neste rio no período em questão ($1,3 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$). Isso pode ter ocorrido devido flutuações naturais nas concentrações de metais de transição, que são carregados pelos rios, exigir uma maior resposta de detoxificação nos organismos (PISANELLI et al., 2009). FAROMBI et al., (2007) observaram atividades elevadas de GST em peixes amostrados em ambientes sob influência de poluição, concordando com o que expõem MONTEIRO et al., (2006), onde mostram que a elevação do nível de GSH concomitante com o aumento da atividade da GST representam uma adaptação e proteção frente ao estresse oxidativo.

Nos mesmos rio e período em questão ocorre a diminuição significativa ($p < 0,05$) do conteúdo de lipídeos peroxidados. A diminuição do LPO pode estar ligada a ação de

vitaminas (C e/ou E) que aparentemente agem sobre a peroxidação lipídica hepática (HIDALGO et al., 1988). No entanto também podemos inferir que a enzima está conseguindo detoxificar os organismos a ponto de evitar danos em lipídeos, já que na literatura é feita a relação entre as enzimas antioxidantes (e GSH) e a lipoderoxidação. Por exemplo, a diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes e GSH com rebaixamento do nível de GST nas brânquias de peixes da espécie *Claria sgariepinus* poderiam explicar a ocorrência de peroxidação lipídica (FAROMBI, 2007). Outro exemplo, que, no entanto corrobora os dados deste trabalho, é a exposição do peixe dourado a 200µg de As/L, onde foram observados baixos níveis de peroxidação lipídica quando houve um aumento nos níveis hepáticos de GSH (BAGNYUKOVA et al., 2007). Ressaltando que esta é o principal substrato para o funcionamento da GST, sendo esta relação demonstrada por AHMAD et al., (2000), onde peixes da espécie *Channa punctatus* expostos a efluentes provenientes de uma fábrica de papel, apresentaram aumento na atividade da GST juntamente com aumento do conteúdo de glutathiona no fígado.

Os meses de agosto/13 e novembro/13 foram determinados como menos chuvosos, porém em Macapá o primeiro apresentou uma precipitação de 159,3 mm enquanto no segundo a precipitação foi de apenas 26,3mm. Essa situação pode explicar a diferença que ocorre na resposta dos organismos pertencentes ao rio Amazonas relacionando os períodos menos chuvoso 1 e menos chuvoso 2. Apesar da ausência de diferença estatística na concentração de arsenato entre esses dois períodos no rio Amazonas, o menos chuvoso 2 apresenta uma tendência a diminuição de arsenato.

Na maioria dos rios, o arsênio é muito mais abundante em sedimentos do que nas águas sobrejacentes. As correntes de transporte geralmente transportam quantidades maiores de arsênio através de sorção sobre partículas em suspensão do que através de dissolução (MOK; WAI, 1994). Além disso, o clima pode influenciar grandemente a mobilização de arsênio em rios e outras águas de superfície, tempestades e inundações podem mobilizar arsênio através da escavação, oxidação e dissolução de sulfetos em sedimentos (HENKE, 2009).

Além do clima, em águas tropicais, o aumento da atividade biológica pode mobilizar arsênio dos sedimentos através da redução deste em ácido arsenioso (H₃AsO₃) ou em formas metiladas que são menos propensas a adsorção em oxi e hidróxidos de ferro e outros compostos (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002; MOK; WAI, 1994; SEYLER; MARTIN, 1989). Em água corrente e sedimentos, o DMA (V) e

MMA (V) podem provir diretamente dos microorganismos ou serem provenientes da degradação de organoarsênicos mais complexos. Eventualmente, em ambientes com fluxo intenso de água o arsênio metilado tende a degradar-se em arsênio inorgânico (AsV) (MOK; WAI, 1994).

Ao avaliar os ambientes aos quais os organismos estão expostos e as respostas biológicas dos mesmos, podemos relacioná-las com os parâmetros biométricos dos indivíduos. Nos períodos chuvoso 1, menos chuvoso 1 e 2 os peixes do rio Amazonas apresentaram as medidas biométricas menores. SOUSA et al., (2013) mostrou comportamento semelhante para peixes da espécie *Sciades herzbergii*, onde estes mostraram diferenças significativas entre a área de referência e o local potencialmente contaminado (Complexo Portuário de São Luís, MA) e como mostrado anteriormente o Amazonas foi o rio que apresentou altas concentrações de arsenato e onde esta se manteve constante ao longo das coletas. NICHOLSON e LAM (2005) afirmaram que a presença de xenobiontes em ambientes aquáticos leva à perda de funcionalidade de várias reservas energéticas dos animais como um mecanismo compensatório à alta demanda de energia requerida pelos processos de detoxificação.

No entanto, no período chuvoso 2, os parâmetros biométricos dos peixes pertencentes ao rio Amazonas se assemelharam aos do rio Beija-flor e Campumpema, ou seja, não houve nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$) entre os locais de coleta. Esses resultados se assemelharam aos apresentados por SORENSON, 1976 e SCHLENK et al., (1997) onde os efeitos da exposição ao arsênio via aquática e dietética sobre parâmetros morfométricos em peixes de água doce também não foram significativamente alterados.

Tendo em vista que os efeitos tóxicos dos poluentes podem sobrecarregar as defesas antioxidantes (BEBIANNI, 2004), de maneira geral, podemos inferir, através das respostas dos biomarcadores de exposição e efeito aqui analisados, que a quantidade de arsenato presente na água provavelmente não está sendo suficiente para gerar desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, não sendo, portanto capaz de gerar efeitos bioquímicos deletérios.

6 CONCLUSÃO

Os organismos do rio Beija-flor e Amazonas estão sendo expostos a uma quantidade de arsênio acima do valor permitido pelo CONAMA, sendo este valor estipulado para o arsênio total. No caso das amostras coletadas, a análise de espécies inorgânicas revelou que o arsênio na região encontra-se sob a forma arsenato e esta é considerada biodisponível e, portanto, passível de toxicidade.

No rio Campumpema as amostras também apresentaram valores maiores do que o permitido pelo CONAMA. Porém nesse caso, como esta área não recebe contaminação antropogênica direta por arsênio e os valores são estatisticamente menores em relação aos outros dois rios, podemos dizer que esta contaminação está relacionada ao carreamento do contaminante a partir de outras áreas ou a formação geológica local.

No período menos chuvoso 1 os organismos do rio Amazonas apresentaram uma indução na atividade da glutathione-S-transferase acompanhada pela redução no conteúdo de lipídeos peroxidados em relação aos organismos provenientes dos outros rios e nos outros três períodos amostrados.

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil não foi influenciada pela quantidade de arsênio a que os animais estão expostos.

Apesar de o arsênio estar em uma de suas formas biodisponíveis e tóxicas, na grande maioria dos períodos analisados, o balanço redox dos organismos não está sendo alterado pelos xenobióticos presente no ambiente, incluindo o arsenato. Isso foi evidenciado pela ausência de resposta dos biomarcadores de exposição e efeito somados, podendo também estar fazendo a utilização de outras vias de detoxificação além dos biomarcadores de exposição analisados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; SOUSA, E. C. P. M.; RACHID, B. R. F.; ZARONI, L. P.; PINTO, Y. A.; GASPARRO, M. R.; BÍCEGO, M. C.; HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S. Integrative ecotoxicological assessment of a complex tropical estuarine system. In: HOFER, T. N. (Ed.). *Marine pollution: new research. Hauppauge*: Nova Science, Lancaster: Gazelle, 2008. p. 1 -36. (Science, Technology & Business).
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY(ATSDR).*Toxicological profiles for arsenic*. Atlanta, USA: [s.n.], 2006.
- AGUSA, T.; TAKAGI, K.; KUBOTA, R.; ANAN, Y.; IWATA, H.; TANABE, S. Specific accumulation of arsenic compounds in green turtles (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) from Ishigaki Island, Japan. *Environ. Pollut.*, v.153, p.127-136, 2008.
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.1523, p.37-48, 2000.
- AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.46, n.2, p.244-253, 2004.
- AKTER, K.F., OWENS, G., DAVEY, D.E., NAIDU, R. As speciation and toxicity in biological systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v.184, p.97-149, 2005.
- ALVES, M. L. P. Toxicidade e alterações hematológicas, morfofuncionais, bioquímicas e genéticas em curimatás *Prochilodus lineatus*, (Teleostei, Prochilodontidae) expostos ao fenantreno. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Carlos, 2012.
- AMADO, L.L.; DA ROSA, C.E.; MEIRELLES LEITE, A.; MORAES, L.; VAZ PIRES, W.; PINHO, G.L.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei, Scianidae) from polluted and non-polluted áreas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 52, p.199-206, 2006.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total environment*, v.407, p.2115 - 2123, 2009.
- AMORIM, E. P.; FAVARO, D. I. T.; BRAGA, E. S. Avaliação dos teores biodisponíveis de Cd, Pb, Ni e Zn como indicadores de poluição na região do estuário de Santos/ São Vicente (SP), utilizando técnica ICP OES. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA, 12., 2009, Ouro Preto. Anais. Ouro Preto: UFOP, 2009. p. 1-4.

APOSHIAN, H.V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.37, p.397 – 419, 1997.

APOSHIAN, H. V.; ZAKHARYAN, R. A.; MIHAELA, D. A.; KOPLIN, M. J.; WOLLENBERG, M.L., 2003. Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.193, p.1–8, 2003.

APOSHIAN, H. V.; ZAKHARYAN, R. A.; AVRAN, M. D.; SAMPAYO-REYES, A.; WOLLENBERG, M. L. A review of the enzymology of arsenic metabolism and new potential role of hydrogen peroxide in the detoxification of the trivalent species. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.198, p.319–326, 2004.

BAGNYUKOVA, T.V.; LUZHNA, L.; POGRIBNY, I.; LUSHCHAK, V. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.48, p.658–665, 2007.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, v.34, p.151–162, 1996.

BALLATORI, N. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv. Pharmacol.*, v.27, p.271 – 298, 1994.

BEBIANNI, M. J.; GERET, F.; HOARAU, P.; SERAFIM, M. A.; COELHO, M. R.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEO, M.: Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers*, v.9, p.305-30, 2004.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.

BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C.; BECKER, E.; CARVALHO, L.M.; DESSUY, M. As species in solutions for parental nutrition. *J. Parental Enteral Nut.* v.29, p.1-7, 2005.

BOON, J. P.; LEWIS, W. E.; CHOY, M. R.; ALLCHIN, C. R.; LAW, R. J.; DE BOER, J. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environ. Sci. Technology.*, v.36, p.4025-4032, 2002.

BROWNING, E., 1969. Toxicity of Industrial Metals. Appleton-Century-Crofts, New York, 1969.

BUCHANAN, W.D. Toxicity of Arsenic Compounds. Elsevier Publishing Company, New York, 1962.

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, n.2, p.295-311, 2000.

CAUSSY, D. Case studies of the impact of understanding bioavailability: As *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.56, p.164–173, 2003.

CLARK, R. B. Marine pollution. 4.ed. Oxford: New York: Oxford University Press, 1997, 161 p.

DAS, D.; SARKAR, D.; BHATTACHARYA, S. Lipid peroxidative damage by arsenic intoxication is countered by glutathione-glutathione-S-transferase system and metallothionein in the liver of climbing perch, *Anabas testudineus*. *Biomed. Environ. Sci.*, v.11, p.187–195, 1998.

DEVILLER, G.; PALLUEL, O.; ALIAUME, C.; ASANTHI, H.; SANCHEZ, W.; FRANCO, N.; BLANCHETON, J.P. ; CASSELLAS, C. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.61, p.89-97, 2005.

DRUMMOND, J.A. Investimentos privados, impactos ambientais e qualidade de vida num empreendimento mineral amazônico: o caso da mina de manganês de Serra do Navio (Amapá). *Hist. ciênc. saúde-Manguinhos*; 6 (supl):753-93, set. 2000.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de Limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. Ltda., 1998.

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

FATTORINI, D., REGOLI, F. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spalanzanii*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 23, p. 1881–1887, 2004.

FATTORINI, D.; NOTTI, A.; REGOLI, F. Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chem Ecol.*, v.22, p.405–414, 2006.

FERRECCIO, C. Lung cancer and arsenic exposure in drinking water: a case-control study in northern Chile. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro; 14 Suppl 3:193-8, 1998.

FIGUEIREDO, B.R. Minérios e Ambiente. Editora da Unicamp, Campinas, São Paulo, 2000, 401p.

FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P. ; GARRIC, J. Multibiomarker responders in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.51, p.145-153, 2000.

FLORES MONTES, M. J. Variação Nictemeral do fioplâncton e parâmetros hidrológicos no Canal de Santa Cruz, Itamaracá, PE. 1996. 174 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDONZA, G.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilenses* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere*, v.61, n.2, p.192-199, 2005.

GAILLARDET, J.; DUPRÉ, B.; ALLÈGRE, C.; NÉGREL, P. Chemical and Physical Denudation in the Amazon River Basin. *Chemical Geology*, v.142, p.141-173, 1997.

GEISZINGER, A. E.; GOESSLER, W.; FRANCESCONI, K. A. The marine polychaete *Arenicola marina*: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater. *Mar. Environ. Res.*, v.53, p.37-50, 2002.

GERACITANO, L.A.; BOCCHETTI, R.; MONSERRAT, J.M.; REGOLI, F.; BIANCHINI, A. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Mar. Environ. Res.*, v.58, p.1-17, 2004.

GIBBS, R.J. Circulation in the Amazon River estuary and adjacent Atlantic Ocean. *Journal of Marine Research*, v.28, p.113-123, 1970.

GIGUÈRE, A.; COUILLARD, Y.; CAMPBELL, P.G.C.; PERCEVAL, O.; HARE, L.; PINEL-ALLOUL, B.; PELLERIN, J. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.*, v.64, p.185-200, 2003.

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Publishing Group*, v.8, p.722-8, 2007.

GRAY, D. J.; WILDMAN, J.E.; LONGMAN, G.D. Selective and partial extraction analyses of transported overburden for gold exploration in the Yilgarn Craton, Western Australia. *J. Geochem. Explor.*, v.67, p.51-66, 1999.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*, v.77, p.398-405, 1981.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.*, v.77, p.218-231, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 1999, Oxford.

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

HENKE, K. R. Arsenic : environmental chemistry, health threats, and waste treatment. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009. p. 569.

HERMES-LIMA, M.; CASTILHO, R. F.; MEINICKE, A. R.; VERCESI, A. E. Characteristics of Fe(II)- ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem*, v.145, p.53–60, 1995.

HERMES-LIMA, M. ; ZENTENO-SAVÍN. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v.133, p.537–556, 2002.

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

HU, Y.; JIN, X.; WANG, G.; SNOW, E. T. Alteration of GSH level, gene expression and cell transformation in NIH3T3 cells by chronic exposure to low dose of arsenic. Arsenic Exposure and Health Effects V. W.R. Chappell, C.O. Abernathy, R.L. Calderon and D.J. Thomas, editors 2003 Elsevier B.V.

KALYANARAMAN, B. Thiyl radical in biological systems: significant or trivial?, 1995. In: RICE-EVANS, C.; HALLIWELL, B.; LUNT, G.G. (Eds), Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives. Portland. Press, London, p.55 – 63, 1995.

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

KITCHIN, K.T. Recent advances in As carcinogenesis: modes of action, animal models systems and methylated As metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.172, p.249–261, 2001.

KONHAUSER, K.O.; FYFE, W.S.; KRONBERG, B.I. Multielement chemistry of some Amazonian waters and soils. *Chemical Geology*, v. 111, p. 155-175, 1994.

LEMMO N. V.; FAUST S. D.; BELTON T.; TUCKER R., 1983. Assessment of the chemical and biological significance of arsenical compounds in a heavily contaminated water-shed. Part I. The fate and speciation of arsenical compounds in aquatic environments-A literature review. *J. Environ. Sci. Health A*, v.18, p.335-387, 1983.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.57, p.195–211, 1993.

LIVINGSTONE, D.R. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue Méd.Vét.*, v.154, n.6, p.427-430, 2003.

LUNDBERG, J.G.; PARISI, B.M. *Propimelodus*, new genus, and redescription of *Pimelodus eigenmanni* Van der Stigchel 1946, a long-recognized yet poorly known South American catfish (Pimelodidae: Siluriformes). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, v.152, p.75–88, 2002.

MAGNUM, C.; TOWLE, D. Physiological adaptation to unstable environments. *Am. Sci.*, v.65, p.67–75, 1977.

MALIK, A.H.; KHAN, Z.M.; MAHMOOD, Q.; NASREEN, S.; BHATTI, Z.A. Perspectives of low cost arsenic remediation of drinking water in Pakistan and other countries. *J Hazard Mater.*, Aug 30, 2009, v.168, n.1, p.1-12.

MASON, A.Z., JENKINS, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: TURNER, A., TURNER, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley, Toronto, 1995. p. 479 –608.

MARI, M.; CEDERBAUM, A. I .CYP 2E1 over-expression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of g-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.15563–15571, 2000.

MARKER, B .A.; BREURE, A .M.; ZECHMEISTER, H.G. *Bioindicators&Biomonitors. Principles, concepts and applications*. 1ª Edição. Elsevier Science LTD, Amsterdam. 2003.

MATTHIESSEN, P.; LAW, R.J. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environ. Pollut.*, v. 120, p.739–757, 2002.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.*, v.251, p.3–7, 1995.

MEISTER, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.*, v.263, n.33, p.17205–17208, 1988.

MINIER, C.; LEVY, F.; RABEL, D.; BOCQUENE, G.; GODEFROY, D.; BURGEOT, T.; LÉBOULENGER, F. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research*, v.50, p.373-377, 2000.

MOK, W.M.; WAI, C. M. Mobilization of arsenic in contaminated river waters, in *Arsenic in the Environment: Part I: Cycling and Characterization* (eds J.O. Nriagu), John Wiley & Sons, Ltd, New York, 1994, p.99–117.

MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments Toxicol.*, v.9, p.255–269, 2003.

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

MONTEIRO, S. M.; EL-ROBRINI, M.; ALVES, I. C. C., 2015. Dinâmica Sazonal de Nutrientes em Estuário Amazônico. Mercator, Fortaleza, v.14, n.1, p.151-162, jan./abr, 2015.

NEWMAN, M.C. Fundamentals of Ecotoxicology, 1ª Edição, Chelsea, MI, Ann Arbor Press, 1998.

NICHOLSON, S.; LAM, P. K. S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International.*, v. 31, p. 212-132, 2005.

NITTROUER, C. A.; DE MASTER, D. J.; FIGUEIREDO, A. G.; RINE, J., 1991. AMASSEDS: an interdisciplinary investigation of a complex coastal environment. *Oceanog.*, v.4, p.3-7, 1991.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.*, v.74, p.3 -9, 1987.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology.*, v.4, n1, p. 53-59, 2005.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.53, p.331-347, 2002.

PARREIRA, C. N. Avaliação da hidrodinâmica e da poluição no canal de Piaçaguera, no estuário de Santos – São Vicente (SP), a partir de informações ambientais e modelagem numérica. 2012. 176 f. Tese (Mestrado em Ciência Ambiental) – Instituto de Eletrotécnica e Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEDLAR, R. M.; PTASHYNSKI, M. D.; EVANS, R.; KLAVERKAMP, J. F. Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonu clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, v.57, p.167–189, 2002.

PEREIRA, C. D.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; CATHARINO, G.; CESAR, A.; CHOUERI, R. B.; TANIGUCHI, S.; ABESSA, D. M.; BÍCEGO, M. C.; VASCONCELLOS, M. B.; BAINY, A. C.; SOUSA, E. C. P. M.; DELVALLS, T. A. Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels- A seasonal monitoring. *Environ. Toxicol.*, v.27, n.5, p.257-267, 2012.

PICKETT, C. B.; LU, A. Y. Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.*, v.58, p.743–764, 1989.

PISANELLI, B.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; REGOLI, F. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere*, v.77, n.11, p.1551–1557, 2009.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* v. 2, n.2, 2007.

REGOLI, F.; WINSTON, G. W. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.156, p.96–105, 1999.

REGOLI, F.; FRENZILLI, G.; BOCCHETTI, R.; ANNARUMMA, F.; SCARCELLI, V.; FATTORINI, D.; NIGRO, M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*, v.68, p.167–178, 2004.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. R. L. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio. *BIOSCI J*, v.21, p.133-49, 2005.

SAKURAI, T.; OCHIAI, M.; KOJIMA, C.; OHTA, T. T., SAKURAI, M.H.; TAKADA, N.O.; QU, W.; WALLKES, M.P.; HIMENO, S.; FUJIWARA, K. Preventive mechanism of cellular glutathione in monomethylarsonic acid-induced cytolethality. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.206, p.54–65, 2005.

SALVEMINI, F.; FRANZE, A.; LERVOLINO, A.; FILOSA, S.; SALZANO, S.; URISINI, M.V. Enhanced glutathione level and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.2750–2757, 1999.

SAMPAYO-REYES, A.; ZAKHARYAN, R. A. Inhibition of human glutathione S-transferase omega by to copherolsuccinate. *Biomed Pharmacother.*, Jun; v.60, n.5, p.238-44, 2006.

SÁNCHEZ-RODAS D.; GÓMEZ-ARIZA J. L.; GIRÁLDEZ I.; VELASCO A.; MORALES E. Arsenic speciation in river and estuarine water from southwest Spain. *Science of the Total Environment*, v.345, p.207-217, 2005.

SANTOS, A.; TANCREDI, A.C.N.S.; SILVA, M.S. Limnologia da Amazônia Oriental: caracterização biogeoquímica da parte sul do estuário do rio Amazonas. *Acta Limnologica Brasiliensia*, n.1, p.113-126, 1986.

SANTOS, E. C. de O. et al. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. *Rev. bras. epidemiol.*, [online] vol.6, n.2, p. 171-185, 2003. ISSN 1980-5497.

SCARPELLI, W. Arsênio do minério de manganês de Serra do Navio. *Novos Cadernos NAEA*, v.6, p.101-133, 2003.

SEYLER, P.; MARTIN, J. M. Biogeochemical processes affecting arsenic species distribution in a permanently stratified lake. *Environmental Science and Technology*, v.23, n.10, p.1258–63, 1989.

- SHILA, S.; KATHIRVEL, R.; JAYAVELU, T.; CHINNAKKANNU, P. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-lipoic acid. *Toxicol. Lett.*, v.155, p.27–34, 2005.
- SCHLENK, D.; WOLFORD, L.; CHELIUS, M.; STEVENS, J.; CHAN, K. M. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol.*,v.118C, p.177 –183, 1997.
- SCHULIGA, M.; CHOUCANE, S.; SNOW, E.T. Upregulation of glutathione-related genes and enzymes activities in cultured human cells by sublethal concentration of inorganic As. *Toxicol. Sci.*,v.70, p.183–192, 2002.
- SERIANI, R.; ABESSA, D.M. de S.; PEREIRA, C.D.S.; KIRSCHBAUM, A. A.; ASSUNÇÃO, A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 61, n.2, p.105-111, 2013.
- SIOLI, H.; KLINGE, H. Solos, típicos de vegetação e águas na Amazônia. *Amazoniana*, v.1, p.27-41, 1962.
- SIOLI, H. Hydrochemistry and Geology in the Brazilian Amazon Region. *Amazoniana*, v. 3, p.267-277, 1968.
- SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, v.17, p.517- 568, 2002.
- SORENSEN, E. M. B. Toxicity and accumulation of arsenic in green sunfish, *Lepomis cyanellus*, exposed to arsenate in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.15, p.756 – 761, 1976.
- SOUSA, D. B. P.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.369-376, 2013.
- SPILMAN, M. Peixes marinhos do Brasil: guia prático de identificação. Rio de Janeiro: Instituto Ecológico Aqualung e MAUAD Editora, 2000. 288p.
- TIMBRELL, J. A. Principles of biochemical toxicology. Taylor & Francis, London, England, 1991. p.415.
- THOMAS, D.J.; WATERS, S.B.; STYBLO, M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*,v. 198, p. 319–326, 2004.
- THOMAS, D. J. Molecular process in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.*,v.222, p.365–393, 2007.

THOMPSON, E. D.; BURWINKEL, K. E.; CHAVA, A. K.; NOTCH, E. G.; MAYER, G. D. Activity of Phase I and Phase II enzymes of the benzo[a]pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* v.152, p.371–378, 2010.

VALKO M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter*, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALLE JUNIOR, R. F.; ABDALA, V. L.; GUIDOLLINI, J. F.; SIQUEIRA, H. E.; CANDIDO, H. G. Diagnóstico Temporal e Espacial da Qualidade das Águas Superficiais do Rio Uberaba – MG. *Caminhos de Geografia Uberlândia* v.14, n.45 Março, p.01–11, 2013.

VANDER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.*, v.13, n. 2, p.57-149, 2003.

VENTURA-LIMA, J.; DE CASTRO, M.R.; ACOSTA, D.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; DE CARVALHO, L.M.; BOHRER, D.; GERACITANO, L.A.; BARROS, D.M.; MARINS, L.F.F.; DA SILVA, R.S.; BONAN, C.D.; BOGO, M. R.; MONSERRAT, J. M. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebra fish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol., C* v.149, p.538–543, 2009.

VENTURA-LIMA, J.; RAMOS, P. B.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; FERRAZ, L.; DE CARVALHO, L. M.; MONSERRAT, J. M. Accumulation, biotransformation, and biochemical responses after exposure to arsenite and arsenate in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Environ Sci Pollut Res.*, v.18, p.1270–1278, 2011.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Reviews in Aquatic Sciences*, v. 1, n. 5, p. 295, 1989.

WALDE, D. H. G. Geologia do manganês. In: Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Pesquisa Mineral. Principais depósitos minerais do Brasil. Brasília: DNPM; Cap. 10, v. 2, 1985.

WANG, Y., PUSCHECK, E.E., LEWIS, J., TROSTINSKAIA, A.B., WANG, F, RAPOOLEE, D. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38 MAPK correlate negatively mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicology*, v.170, p.55–62, 2005.

WELLS, P.G; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J. ; KNAP, A.H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants – exploiting the potential of rapid biomarkers assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, v.42, n.10, p.799-804, 2001.

WITTERS, H.E. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.41, p.90–95, 1998.

WHO (World Health Organization – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva; 1993.

WHO (World Health Organization). Second Edition Arsenic and Arsenic Compounds, 224. Environmental Health Criteria, Geneva, Switzerland., 2001.

WINSTON, G. W.; REGOLI, F.; DUGAS JR, A. J.; FONG, J. H.; BLANCHARD, K. A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med.*, v.24, p.480 –93, 1998.

ZORITA, I.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; APRAIZ, I.; CANCIO, I.; ORBEA, A.; SOTO, M.; MARIGÓMEZ, I.; CARAJAVILLE, M.P. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, v.153, n.1, p.157-168, 2008.