

2020

JAQUELINE CREMONINI | ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SUBMETIDAS AO EFLUENTE TRATADO DE UMA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE CARNE DE FRANGO



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
**ANÁLISE DE
BIOMARCADORES EM
TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*) SUBMETIDAS AO
EFLUENTE TRATADO DE
UMA INDÚSTRIA DE
BENEFICIAMENTO DE
CARNE DE FRANGO**

JAQUELINE CREMONINI

LAGES, 2020

JAQUELINE CREMONINI

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*) SUBMETIDAS AO EFLUENTE TRATADO DE UMA
INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Ciências Ambientais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Área de Concentração em Toxicologia Ambiental, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito para obtenção de grau em **Mestre em Ciências Ambientais**.

Orientador (a):
Indianara Fernanda Barcarolli

Lages - SC, Brasil

27 de fevereiro de 2020

Cremonini, Jaqueline

Análise de biomarcadores em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas ao efluente tratado de uma indústria de beneficiamento de carne de frango / Jaqueline Cremonini. -- 2020.

52 p.

Orientadora: Indianara Fernanda Barcarolli

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação , Lages, 2020.

1. Biomarcadores. 2. Indústria de Frigoríficos. 3. Toxicidade. I. Barcarolli , Indianara Fernanda . II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação . III. Título.

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCAMB

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*) SUBMETIDAS AO EFLUENTE TRATADO DE UMA
INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE CARNE DE FRANGO**

Elaborada por
Jaqueline Cremonini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Ambientais

Indianara Fernanda Barcarolli - UDESC

Anieli Pinto Kempka - UDESC



Documento assinado digitalmente
Carlos Henrique Lemos Soares
Data: 22/04/2020 17:25:28-0300
CPF: 020.353.388-75

Carlos Henrique Lemos Soares - UFSC

Lages, 27 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, por nunca ter se afastado de mim principalmente naqueles momentos em que estava apenas eu e Ele.

A minha família, Leocir, Salete e Júlia, por serem âncora e apoiarem todas as minhas decisões.

Aos meus amigos, por terem trazido os sorrisos ao meu rosto.

A minha orientadora, Dra. Profa. Indianara Fernanda Barcarolli, que foi minha inspiração para conduzir a dissertação com tranquilidade e determinação.

O mestrado foi pra mim muito mais que um avanço na minha carreira profissional, foi um aprendizado de vida, mostrou toda minha força e as pessoas que vão estar ao meu lado em qualquer situação.

Agradeço imensamente a oportunidade de ter feito parte da família UDESC nesses dois anos. Com vocês, foi possível deixar um pouco da minha contribuição nessa área que eu amo tanto que é a das ciências ambientais.

Encerro esse ciclo com a certeza que eu faria tudo exatamente igual.

Obrigada a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Universidade do Estado de Santa Catarina

ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SUBMETIDAS AO EFLUENTE TRATADO DE UMA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE CARNE DE FRANGO

AUTOR: Jaqueline Cremonini

ORIENTADOR (A): Indianara Fernanda Barcarolli

Lages, 27 de fevereiro de 2020.

A indústria de frigoríficos é de fundamental importância na economia mundial, pois mobiliza toda uma cadeia produtiva de alimento que tem como matéria-prima a proteína animal. Porém, como a maioria das atividades industriais, a indústria de frigoríficos também pode gerar problemas ambientais. O tratamento dos efluentes resultantes dos processos produtivos deve ser adequado e eficiente no controle da poluição de modo a não causar prejuízos à biota dos corpos hídricos ao ser lançado no meio ambiente. Quando isso não ocorre, os organismos expostos ao efluente podem sofrer danos irreversíveis. O objetivo principal do trabalho foi avaliar, por meio da análise de biomarcadores, efeitos tóxicos causados em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápias do Nilo) após serem expostos ao efluente tratado de uma indústria de beneficiamento de carnes de frango localizada no município de Lages, Santa Catarina. O efluente tratado da indústria foi coletado em Abril de 2019 e o teste toxicológico realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O experimento teve duração de 5 dias (120 horas), sendo testado diluições do efluente de 10%, 25%, 50% e 75%. Após esse período foram coletados brânquias, fígado, cérebro e músculo dos organismos para análise das enzimas catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE). Os resultados apontaram poucas alterações dos biomarcadores nos peixes avaliados. Para a AChE, o cérebro e músculo não apresentaram resultados estatisticamente significativos. A CAT teve atividade significativa nas brânquias e fígado dos organismos e a GST teve atividade estatisticamente significativa no músculo e brânquias dos organismos. O efluente tratado da indústria possui uma excelente qualidade e baixa toxicidade para a espécie de peixe testada Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e utilizando como parâmetro os biomarcadores de contaminação AChE, CAT e GST.

Palavras-chave: Biomarcadores, indústria de frigorífico, toxicidade.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Environmental Sciences
State University of Santa Catarina

ANALYSIS OF BIOMARKERS IN TILAPIUMS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SUBMITTED TO THE TREATED EFFLUENT OF A POULTRY INDUSTRY

AUTHOR: Jaqueline Cremonini

ADVISER: Indiarana Fernanda Barcarolli

Lages, 27 february, 2020

The poultry industry has fundamental importance in the global economy, as it mobilizes a whole food production chain that has meat as its raw material. However, the poultry industry can cause environmental problems as most of the industrial activities. The treatment of effluents must be adequate and efficient in the control of pollution to avoid damage to the organisms who live into the aquatic environment. When it does not occur, organisms exposed to the effluent may suffer irreversible damage. The main objective of this work was to evaluate, through biomarker analysis, toxic effects caused on fishes *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia) after being exposed to treated effluent from poultry processing industry located in the municipality of Lages, Santa Catarina. The industry treated effluent was collected in April 2019 and the toxicological test carried out at Environmental Toxicology Laboratory (LABTOX) of the Environmental and Sanitary Engineering course at Center for Agricultural Sciences (CAV) of the Santa Catarina State University (UDESC). The experiment lasted for 5 days (120 hours), being tested the following effluent dilutions: 10%, 25%, 50% and 75%. After the test, gills, liver, brain and muscle were collected from the organisms for analysis of catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes. The results showed few changes in the biomarkers of the the evaluated fishes. For AChE, the brain and muscle did not show statistically significant results. CAT had significant activity in the gills and liver of the organisms and GST had statistically significant activity in the muscle and gills of the organisms. The treated effluent from the industry has excellent quality and low toxicity for the tested fish specie Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using as a parameter AChE, CAT and GST biomarkers.

Keywords: Biomarkers, poultry industry, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de carne de frango, bovina e suína em milhões de toneladas até 2028.....	13
Figura 2 - Consumo de carne de frango, bovina e suína em milhões de toneladas até 2028.....	14
Figura 3 - Peneira rotativa em uma indústria de beneficiamento o de carne de frango.....	15
Figura 4 - Flotador e decantador primário em uma indústria de processamento de carne de frango.	16
Figura 5 - Tanque de lodos ativados em uma indústria de beneficiamento de carne de frango. ...	17
Figura 6 - Biodisponibilidade dos poluentes e toxicidade dos organismos.	19
Figura 7 - Esquema simplificado das fases do metabolismo de detoxificação celular.	20
Figura 8 - Síntese e hidrólise da ACh.	24
Figura 9 - Exemplar de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	25
Figura 10 - Etapas da metodologia para realização da parte experimental.....	28
Figura 11 - Esquema da estação de tratamento de efluentes da indústria de beneficiamento de carne.	29
Figura 12 - Aclimatação dos peixes no LABTOX - UDESC.	31
Figura 13 - Diluições do efluente para o teste de toxicidade com peixes.....	32
Figura 14 - Remoção dos tecidos e refrigeração dos tubos Eppendorf.....	32
Figura 15 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima AChE.	38
Figura 16 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima AChE.....	38
Figura 17 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima CAT.	39
Figura 18 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima CAT.....	40
Figura 19 - Média e desvio padrão para as brânquias da enzima CAT.	40
Figura 20 - Média e desvio padrão para o fígado da enzima CAT.	41
Figura 21 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima GST.....	43
Figura 22 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima GST.	43
Figura 23 - Média e desvio padrão para as brânquias da enzima GST.....	44
Figura 24 - Média e desvio padrão para o fígado da enzima GST.	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Características comuns nas águas residuárias de frigoríficos.	14
Tabela 2 - Classificação científica da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> Linnaeus, 1758). .	25
Tabela 3 - Média dos resultados das análises físico-químicas de Março e Abril de 2019 do efluente final no tanque de decantação da indústria de beneficiamento de carne de frango e parâmetros do CONAMA n°430/2011.....	30
Tabela 4 - Atividade média enzimática e desvio padrão da AChE para o cérebro e músculo.....	37
Tabela 5 - Atividade média enzimática e desvio padrão da CAT.....	39
Tabela 6 - Atividade média enzimática e desvio padrão da GST.	42

LISTA DE EQUAÇÕES

(Equação 1)	33
(Equação 2)	34
(Equação 3)	35
(Equação 4)	36
(Equação 5)	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 PERFIL DO SETOR	13
2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES EM FRIGORÍFICOS	14
2.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL.....	18
2.3.1 Sistema de detoxificação celular	20
2.4.1 Classificação dos biomarcadores	22
2.4.2 Catalase (CAT).....	23
2.4.3 Glutathione-S-Tranferase (GST).....	24
2.4.4 Acetilcolinesterase (AChE).....	24
2.5 BIOINDICADORES AMBIENTAIS	25
2.5.1 Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	25
2.6 PEIXES COMO ORGANISMOS DE ESTUDO NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA.....	26
3 HIPÓTESES.....	27
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5 METODOLOGIA	28
5.1 COLETA DO EFLUENTE TRATADO	29
5.1.1 Caracterização do Efluente Tratado	29
5.2 TESTE DE TOXICIDADE.....	30
5.2.1 Aclimação dos peixes.....	30
5.2.2 Teste de toxicidade.....	31
5.2.3 Análise da catalase (CAT).....	32
5.2.4 Análise da glutathione-S-transferase (GST)	33
5.2.5 Análise da acetilcolinesterase (AChE).....	34
5.2.6 Análise de proteína.....	35
5.3 ESTATÍSTICA.....	36
6 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	36
6.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	37
6.2 CATALASE (CAT)	39
6.3 GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE (GST).....	42
7 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia brasileira tem se desenvolvido continuamente, alcançando além de um padrão internacional de qualidade, posições significativas de liderança no “ranking” mundial de mercado e de produção (MORETTO, 2011). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), o faturamento da indústria alimentícia brasileira em 2016 foi de R\$ 614,3 bilhões, um crescimento de 9,3% em relação a 2015 (ABIA, 2017).

Em Santa Catarina, a indústria de carnes foi responsável pelo maior faturamento no Valor Bruto da Produção Agropecuária cerca de R\$12,48 bilhões em 2016 (CIDASC, 2017). O Estado é o maior produtor nacional de carne suína e o segundo maior de carne de frango, atendendo o mercado brasileiro e o exterior, com presença em mais de 120 países (CIDASC, 2017).

A indústria de beneficiamento de carnes de frango é responsável pela produção de congelados de frango como sassami de frango, marinado e assado, empanados de frango pré-fritos e congelados, tiras de peito de frango pré-temperados e assados, filé de peito de frango desfiado, frito e assado, entre outros.

A água entra nesse processo na fabricação dos produtos, limpeza de equipamentos, tubulações e pisos, águas de sistema de resfriamento e geradores de vapor, esgotos sanitários dos funcionários e demais partes (AZIZ et al., 2019). Assim, o efluente gerado apresenta uma quantidade elevada de matéria orgânica, sólidos em suspensão, óleo e graxa e nutrientes (BUSTILLO-LECOMPTE & MEHRVAR, 2015).

A não biodegradabilidade está diretamente relacionada com o alto teor de gordura, corantes e aditivos aos processos, que são compostos orgânicos de estrutura complexa, de difícil degradação pelas técnicas convencionais de tratamento, o que vem a ocasionar inibição e/ou paralisação do metabolismo de certos organismos (MORETTO, 2011). A análise de biomarcadores é uma ferramenta utilizada para avaliar alterações fisiológicas de organismos expostos a esse tipo de poluição.

Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo avaliar, por meio da caracterização físico-química do efluente e da análise dos biomarcadores, CAT, GST e AChE, alterações na atividade enzimática de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após serem expostas a diferentes concentrações do efluente tratado de uma indústria de beneficiamento de carnes de frango localizada no município de Lages, Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERFIL DO SETOR

As projeções de carnes para o Brasil mostram que esse setor deve apresentar intenso crescimento nos próximos anos (OECD-FAO, 2018). Entre as carnes, as que projetam maiores taxas de crescimento da produção no período 2017/18 a 2027/28 são a carne de frango e a suína, que devem crescer anualmente 2,6%. Para atender ao consumo doméstico e às exportações, a produção de carne bovina tem um crescimento projetado de 1,9% ao ano (MAPA, 2018).

A produção total de carnes em 2017/18 foi estimada em 27,0 milhões de toneladas e a projeção para o final da próxima década é produzir 34,2 milhões de toneladas de carne de frango, bovina e suína. Essa variação entre o ano inicial da projeção e o final resulta num aumento de produção de 26,8% (MAPA, 2018). A Figura 1 apresenta a produção de carnes em milhões de toneladas até 2028.

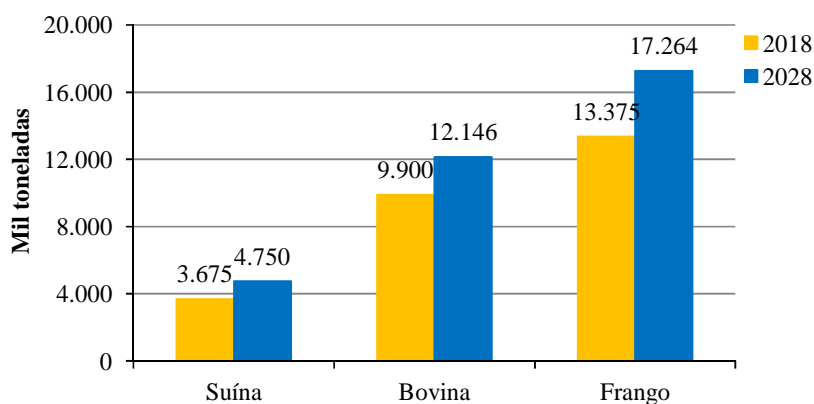


Figura 1 - Produção de carne de frango, bovina e suína em milhões de toneladas até 2028.
Fonte: MAPA, 2018.

O crescimento anual projetado para o consumo da carne de frango é de 2,6% no período 2017/18 a 2027/28. O consumo de carne de frango projetado para 2027/28 é de 12,2 milhões de toneladas, um aumento de 28,8% no consumo. A carne suína passa para o segundo lugar no crescimento do consumo com uma taxa anual de crescimento de 2,2%. Em nível inferior de crescimento situa-se a projeção do consumo de carne bovina, de 1,5% ao ano para os próximos

anos (MAPA, 2018). A **Figura 2** apresenta o consumo de carnes em milhões de toneladas até 2028.

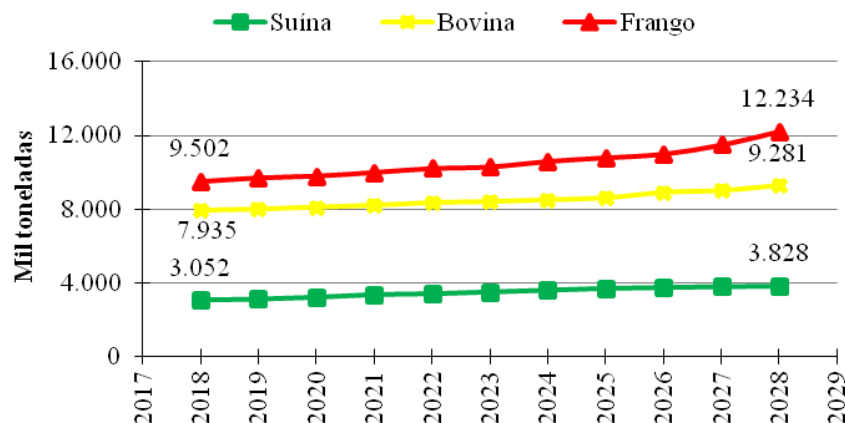


Figura 2 - Consumo de carne de frango, bovina e suína em milhões de toneladas até 2028.
Fonte: MAPA, 2018.

Com relação à exportação, as estimativas indicam elevadas taxas de crescimento para os três tipos de carnes analisados. As carnes de frango e bovina devem crescer 3,0% ao ano e a carne suína a 3,4% ao ano (MAPA, 2018).

2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES EM FRIGORÍFICOS

Os procedimentos de abate e processamento de carnes geram efluentes com características muito distintas (PEREIRA et al., 2016). As águas residuárias deste segmento industrial apresentam altas concentrações de carbono orgânico total (COT), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total (NT), nitrogênio kjeldahl total (NTK), fósforo total (PT), sólidos suspensos totais (SST) e óleos e graxas (O&G) (BUSTILLO-LECOMPTE et al., 2014; AZIZ et al., 2019). A Tabela 1 apresenta características comuns nas águas residuárias de frigoríficos de acordo com suas faixas e médias.

Tabela 1 - Características comuns nas águas residuárias de frigoríficos.

Parâmetro	Faixa	Média
pH	4,9 e 8,10	6,95
COT (mg/l)	100 e 1200	546
DQO (mg/l)	1.250 e 15.900	4.221
DBO (mg/l)	610 e 4.635	1.209
NT (mg/l)	50 e 841	427
NTK (mg/l)	40 e 700	

NH ₄ -N (mg/l)	20 e 300	
PT (mg/l)	15 e 200	
PO ₄ ⁻³ (mg/l)	8 e 120	
SST (mg/l)	300 e 2.800	1.167
O&G (mg/l)	40 e 1.385	

Fonte: Bustillo-Lecompte et al., 2014; Aziz et al., 2019.

Devido à alta toxicidade do efluente, é extremamente necessário tratá-lo antes de sua disposição em corpos d'água ou no solo (PEREIRA et al., 2016), apesar de que alguns frigoríficos antigos não possuem um tratamento apropriado para a descarga de sangue e águas residuárias (RAHMAN et al., 2014).

As etapas do tratamento de efluentes podem ser divididas nos seguintes níveis: tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário ou avançado (FRICK, 2011). Sendo aplicados processos de tratamento físicos, químicos ou biológicos (GUPTA, ALI, 2013).

O tratamento preliminar é realizado por meio de gradeamento, medidor de vazão, peneiramento, caixa de areia e caixa de gordura (FRICK, 2011). Em frigoríficos, o sistema preliminar é muito utilizado para segregação de penas, vísceras, ossos e demais sólidos que serão encaminhados para produção de farinhas na fábrica de subprodutos (OLIVO, 2006). A Figura 3 apresenta um exemplo de sistema preliminar utilizado por uma indústria de beneficiamento de carne de frango.



Figura 3 - Peneira rotativa em uma indústria de beneficiamento de carne de frango.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os sistemas mais utilizados para tratamento primário são os de flotação e decantação que se baseiam no processo de coagulação/floculação, por ser eficiente e de baixo custo (SCHATZMANN, 2009; GUPTA, ALI, 2013). O principal objetivo é remover os sólidos suspensos do efluente, incluindo os sólidos flutuantes e sedimentáveis (FRICK, 2011). A Figura 4 apresenta um exemplo de tratamento preliminar utilizado por uma indústria de beneficiamento de carne de frango.



Figura 4 - Flotador e decantador primário em uma indústria de processamento de carne de frango.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

No tratamento secundário, onde predominam os mecanismos biológicos, o objetivo principal é remover matéria orgânica e nutrientes como nitrogênio e fósforo (MEES, 2004). Constituído primeiramente de uma etapa anaeróbia, para conversão dos compostos mais complexos em compostos mais simples, para posterior assimilação em uma etapa aeróbia.

A etapa anaeróbia geralmente é realizada em sistemas convencionais como lagoas anaeróbias ou sistemas de alta taxa como em reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) e a etapa aeróbia utilizando lagoa aerada ou o sistema de lodos ativados com decantador secundário (SCHATZMANN, 2009). A **Figura 5** apresenta um tratamento secundário utilizando o sistema de lodos ativados em batelada sequencial por uma indústria de beneficiamento de carne de frango.



Figura 5 - Tanque de lodos ativados em uma indústria de beneficiamento de carne de frango.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Algumas vantagens no uso de processos aeróbios para o tratamento de águas residuárias incluem baixa produção de odor, rápida taxa de crescimento biológico e ajustes rápidos na temperatura e carga do efluente. Por outro lado, os custos operacionais dos sistemas aeróbios são maiores que os dos sistemas anaeróbios devido aos requisitos de manutenção e energia para introdução de oxigênio artificial. Existem diferentes operações de unidade aeróbia para tratamento secundário das águas residuárias como reator com lodo granular aeróbio, reator biológico rotativo de contato (RBC) e reator de batelada sequencial (SBR) (KESKES et al., 2012).

O desempenho de um reator de batelada sequencial (SBR) tratando águas residuárias de matadouros foi examinado à temperatura ambiente. As águas residuárias afluentes compreenderam 4.672 mg de DQO/L, 356 mg de NT/L e 29 mg de PT/L. A duração de um ciclo completo foi de 8 horas compreendendo quatro fases: preenchimento (7 min), reação (393 min), decantação (30 min) e empate/inatividade (50 min). A uma taxa de carga orgânica afluente de 1,2 g de DQO/(L.d), as concentrações médias do efluente final de DQO, NT e PT foram de 150 mg/L, 15 mg/L e 0,8 mg/L, respectivamente. Isso representou remoções de DQO, NT e PT de 96%, 96% e 99%, respectivamente. A remoção biológica de fósforo ocorreu no primeiro período de aeração e a remoção do nitrogênio ocorreu no tempo de reação seguinte por meio de nitrificação e desnitrificação parcial. A análise do balanço de nitrogênio indicou que a

desnitrificação e a síntese de biomassa contribuíram 66% e 34% na remoção do nitrogênio total, respectivamente (LI et al., 2008).

Rajab et al. (2017) investigaram em escala laboratorial o desempenho de um reator em batelada sequencial anaeróbio/aeróbio integrado (IAASBR) para o tratamento de águas residuárias de frigorífico. A eficiência média de remoção do IAASBR foi de 97% da DQO total (DQOT), 95% da DQO solúvel (DQOS), 98% do NH₃-N, 90% de gordura, óleos e graxas e 96% de sólidos suspensos totais (SST). A nova configuração do reator SBR suportou variações bruscas de carga orgânica, apresentou alta eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo e melhorou a capacidade de decantação do lodo do SBR integrado em comparação com o SBR convencional ou tanque de decantação.

Aziz et al. (2019) após reunirem diversos estudos na área concluíram que reatores como UASB, filtro anaeróbio, sistema de lodos ativados, reator de biofilme de leito móvel e reator de batelada sequencial foram executados com êxito no tratamento de efluentes de matadouros, porém, reatores de batelada sequencial intermitentes ou em conjuntos sequenciais combinados (anaeróbios e aeróbios) são tecnologias mais eficientes para remoção de carbono, nitrogênio e fósforo do que outros digestores de alta taxa.

O tratamento avançado de efluentes, ou tratamento terciário, pode ser adotado quando o sistema de tratamento convencional apresenta dificuldade na manutenção de parâmetros como nitrogênio e fósforo previstos nas legislações ambientais. Algumas técnicas que estão sendo empregadas são os processos avançados de oxidação (PAOs) como Fenton-Coagulação (BUSTILLO-LECOMPTE; MEHRVAR, 2015; ALMEIDA et al., 2015), eletrofloculação (BIASSI, 2014) e membranas de ultrafiltração (MALMALI et al., 2018).

2.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia ambiental é a ciência que estuda o destino dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos de degradação no ambiente e nas cadeias alimentares, bem como os efeitos destes contaminantes sobre a saúde e o bem-estar de humanos, animais e plantas, por meio da interação desses organismos (COSTA et al., 2008).

Os testes toxicológicos são utilizados para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes complementando as análises físico-químicas tradicionais, tais como DQO,

DBO, sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico, as quais não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, por isso, não são suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (COSTA et al, 2008).

Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Eles estão sendo cada vez mais utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (COSTA et al, 2008).

Um fator crítico para a toxicidade é a biodisponibilidade de produtos químicos no ambiente. A biodisponibilidade dos poluentes está relacionada à taxa de captação e eliminação pelo organismo, ou seja, representa a parcela que foi absorvida pelo organismo e que vai ser diretamente responsável pelos efeitos de toxicidade observados, a níveis celulares e moleculares, bem como, na capacidade do organismo de se adaptar ao meio (FENT, 2004). A **Figura 6** evidencia a relação entre biodisponibilidade de poluentes e os efeitos de toxicidade observados nos organismos.

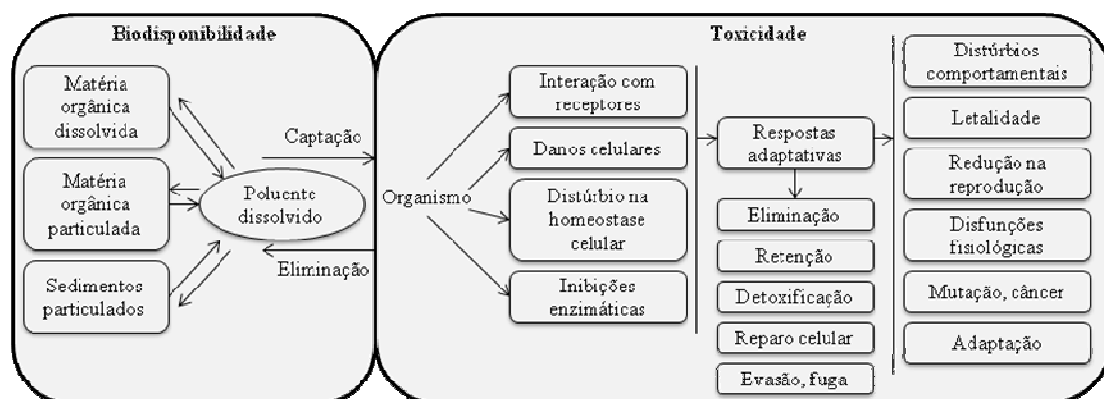


Figura 6 - Biodisponibilidade dos poluentes e toxicidade dos organismos.
 Fonte: Adaptado de FENT, 2004.

Os poluentes ao entrarem em contato com os organismos vivos ativam as etapas de defesa do organismo, induzindo enzimas de biotransformação para remover os compostos tóxicos da célula (GLISIC, 2015).

2.3.1 Sistema de detoxificação celular

O sistema de detoxificação celular ocorre em quatro fases distintas (**Figura 7**). A fase 0 inclui absorção de xenobióticos por proteínas transportadoras da membrana celular; a fase I denota a bioativação enzimática de compostos precursores e envolve oxidações, reduções e hidrólises para introduzir um grupo polar na molécula; a fase II inclui a conjugação dos metabólitos ou compostos precursores da fase I para grupos funcionais solúveis em água, mediada por enzimas; a fase III se refere a saída de compostos precursores ou metabólitos por proteínas transportadoras (HODGSON, 2010, apud GLISIC, 2015).

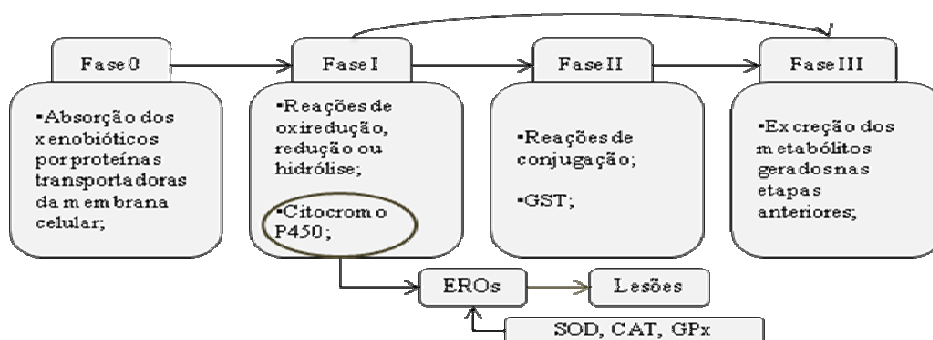


Figura 7 - Esquema simplificado das fases do metabolismo de detoxificação celular.

Fonte: Adaptado de NOGUEIRA et al., 2011.

O processo de biotransformação de fase I é realizado pelo sistema citocromo P450 (CYPs) associado à atividade da 7-etoxi-resorufina-O-deetilase (EROD) (NIYOGI et al., 2001). Os CYPs representam a principal via metabólica de biotransformação da fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas que fazem parte do sistema de oxidases de funções múltiplas (MFO). Este sistema desempenha papel central no metabolismo de muitos contaminantes tornando-os hidrofílicos e catalisando tanto reações de detoxificação quanto de bioativação (TERAMITSU et al., 2000).

Na fase II, os metabólitos produzidos na fase I são conjugados a compostos endógenos como a GSH (tiol reativo da glutatona). Os metabólitos resultantes da fase I de biotransformação se tornam substratos hidrofílicos para reações de conjugação na fase II de biotransformação (INSAUSTI et al., 2009). A glutatona-S-transferase (GST) é responsável pela conjugação de poluentes eletrofílicos com a GSH, diminuindo sua toxicidade, permitindo que o sistema de

transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular e posteriormente para bile ou urina (VAN DER OOST, BAYER, VERMEULEN, 2003).

Quando as reações não estão bem acopladas, pode-se gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (NOGUEIRA et al., 2011). Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Porém, a produção excessiva dos EROs pode conduzir a danos oxidativos, bem como ao estresse oxidativo, caracterizado pela oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), presentes nas células, impedem que as EROs provoquem lesões em macromoléculas (NOGUEIRA et al., 2011).

A resposta indutiva de enzimas de biotransformação está sendo muito utilizada como biomarcador em organismos vertebrados como invertebrados, uma vez que suas atividades são influenciadas pela presença de contaminantes no meio aquático (AGRADI et al., 2000; FLESCHE, 2011).

2.4 BIOMARCADORES AMBIENTAIS

O monitoramento biológico tem sido amplamente utilizado para avaliação do potencial efeito tóxico de compostos químicos que são lançados para o meio ambiente constituindo uma das importantes estratégias na avaliação das respostas dos diversos organismos frente aos contaminantes ambientais (COIMBRA, 2013).

Uma das ferramentas biológicas utilizadas para estabelecer um alerta da presença de toxinas no ambiente são os biomarcadores (ou indicadores biológicos) que podem ser definidos como as alterações moleculares, bioquímicas, celulares, ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos, tecidos ou órgãos de um organismo que podem estar relacionadas à exposição a um determinado ambiente contaminado (RYAN et al., 2007).

Ainda, segundo Wepener (2013), biomarcadores referem-se às modificações biológicas que expressam quantitativamente a exposição e/ou a magnitude do efeito tóxico de poluentes ambientais. Estes podem ser usados em programas de monitoramento para confirmar a exposição individual e/ou de um grupo de populações frente a determinados agentes químicos, bem como estimar o seu risco mediante a comparação com padrões previamente estabelecidos.

O biomarcador, de forma geral, deve ser específico, preciso, válido e sensível (GUPTA, 2014). A sensibilidade refere-se capacidade do biomarcador de mostrar diferenças marcadas mesmo em baixos níveis de exposição toxicológica (SOGORB et al., 2014). Deve ainda ter sensibilidade suficiente para fornecer informação sobre diferenças existentes em populações provenientes de regiões distintas e em diversos intervalos de tempo (como, por exemplo, variações sazonais e variações ao longo do tempo) (RYAN et al., 2007).

A utilização de biomarcadores é relatada como ótima ferramenta em estudos toxicológicos, por fornecerem várias vantagens, dentre elas: (a) detectam precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, evitando que os efeitos da intoxicação dos organismos cheguem a um ponto irreversível; (b) identificam espécies ou populações em risco de contaminação, (c) avaliam a magnitude da contaminação, (d) determinam o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes e (e) fornece informações valiosas com menores custos comparado aos métodos analíticos (CUNHA et al., 2006).

Dessa forma, o biomonitoramento supera as análises químicas por detectar efeitos subletais nos organismos e apresentar respostas à ação de misturas complexas de poluentes e ser sensível às respostas fisiológicas aos contaminantes (ZHOU et al., 2008). Além disso, por representarem as mudanças tóxicas induzidas, pelo sistema biológico, os biomarcadores são tidos como ligantes entre a contaminação (causa) e efeitos biológicos, sendo considerados como indicadores exclusivos da saúde do ecossistema (VASCO et al., 2016).

2.4.1 Classificação dos biomarcadores

Existem diversos tipos de biomarcadores que respondem de maneira diferenciada ao efeito tóxico dos contaminantes (KÄFFER, 2011). Segundo Sogorb et al. (2014), os biomarcadores são classificados em:

1) Biomarcadores de exposição: servem para determinar se um organismo foi exposto a um dado xenobiótico (SOGORB et al., 2014). É representado por um composto exógeno em seu metabolito, ou ainda um produto da interação entre o xenobiótico ou metabolito e um componente endógeno (MANNO et al., 2010). Em peixes, a inibição da acetilcolinesterase é um biomarcador de exposição do efeito de neurotoxicidade, peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes são biomarcadores do efeito de danificação oxidativa e, alteração nos níveis de estrogênio é um biomarcador de exposição de alterações endócrinas (CONNON et al., 2012).

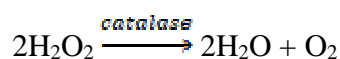
2) Biomarcadores de efeito: servem para determinar o efeito ou resposta do organismo exposto ao xenobiótico. Um biomarcador de efeito usualmente indica alterações em funções celulares, tecidos ou no organismo como um todo (SOGORB et al., 2014).

3) Biomarcadores de suscetibilidade: são utilizados para prever a suscetibilidade ou resistência do organismo frente aos efeitos nocivos de um xenobiótico (SOGORB et al., 2014). A predisposição genética, bem como fatores externos tais como a idade, dieta, espécie, habitat, podem influenciar a suscetibilidade de indivíduos expostos a substâncias químicas (AMORIM, 2013).

2.4.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima que desempenha um papel importante no processo de detoxificação e no mecanismo antioxidante celular pois impede a formação de EROs. Possui estrutura tetramérica composta por quatro grupos heme de ferro férrico (KRYCH-MADEJ & GEBICKA, 2017). São prioritariamente encontradas nos peroxissomos e em mitocôndrias, por serem as organelas que sofrem a maior presença dessa espécie reativa (HERMES-LIMA, 2004).

Mudanças na atividade da CAT, após exposição a produtos químicos, são indicadoras de produção de peróxido de hidrogênio nas células que podem causar lesões celulares nos organismos, sendo assim, considerada um biomarcador de estresse ambiental na maioria dos casos (GAO et al., 2008). Sua principal função é decompor peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular (KRYCH-MADEJ & GEBICKA, 2017), conforme reação apresentada abaixo:



2.4.3 Glutathione-S-Transferase (GST)

A glutathione-S-transferase possui um papel determinante na mitigação do estresse oxidativo, pois é a principal enzima a catalisar a conjugação de eletrófilos com o tiol reativo hidrofílico da glutathione GSH, facilitando assim o mecanismo de excreção (WON et al., 2011; BATHIGE et al., 2014). As GSTs são uma família de enzimas com várias habilidades catalíticas de acomodar múltiplas funções dentro das células de seres vivos eucariotes, como micróbios, plantas e animais (EATON & BAMMLER, 1999, apud BATHIGE et al., 2014).

2.4.4 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina na fenda sináptica, possibilitando o adequado funcionamento das sinapses colinérgicas presentes no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (ARAÚJO, SANTOS, GONSALVES, 2016). A AChE encontra-se mais abundantemente no SNC, nos músculo esqueléticos e na membrana dos eritrócitos (MÜLLER et al., 2002).

No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem de um neurônio a outro, a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica, onde ela sofre hidrólise catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina (ARAÚJO, SANTOS, GONSALVES, 2016). A **Figura 8** apresenta a reação de síntese e hidrólise da ACh.

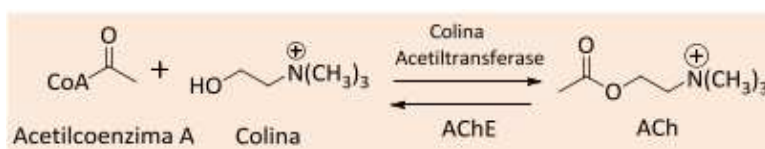


Figura 8 - Síntese e hidrólise da ACh.

Fonte: ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016.

2.5 BIOINDICADORES AMBIENTAIS

2.5.1 Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) caracteriza-se por uma espécie natural das bacias de rios africanos e foi introduzida em várias bacias da América do Sul, sendo muito cultivada em pisciculturas e pesqueiros (GRACA & PAVANELLI, 2007).

Respostas relacionadas à exposição de vários compostos tóxicos têm sido caracterizadas para esta espécie (TRÍDICO et al., 2010). Por apresentar hábito nectônico, este peixe pode ser afetado tanto por partículas insolúveis na água quanto por compostos solúveis em água, sendo assim uma espécie muito utilizada em modelos experimentais de estudo de ecotoxicologia (BEDIN, 2013).

A Tabela 1 apresenta a classificação científica da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) dada por Linnaeus, 1758.

Tabela 2 - Classificação científica da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758).

Classificação científica	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Perciformes
Família	Cichlidae
Subfamília	Pseudocrenilabrinae
Gênero	<i>Oreochromis</i>
Espécie	<i>O. niloticus</i>

A **Figura 9** apresenta um exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), encontrada nas águas do território brasileiro.



Figura 9 - Exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.6 PEIXES COMO ORGANISMOS DE ESTUDO NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

Os peixes por estarem geograficamente distribuídos em vários ambientes e participam de diferentes níveis tróficos, estão sendo muito utilizados na avaliação da toxicidade de ecossistemas aquáticos (VASCO et al., 2016). Além disso, os peixes possuem alta capacidade de bioacumulação, biotransformação, compensação morfofisiológica de regular a forma neuroimunoendócrina e serve como modelo preditivo de mutação e teratogênese (KLAASSEN, 2001).

Alguns cuidados com a utilização de peixes como bioindicadores incluem idade/estágio de desenvolvimento, dieta, temperatura da água, concentração de oxigênio, pH, localização geográfica e estação do ano, pois podem influenciar na homeostase do peixe (DOMINGUES et al. 2010).

Segundo Johnson et al. (2013), o fígado é um dos principais órgãos utilizados pra aferir a saúde dos peixes, pelo seu potencial de biotransformação, com grande concentração de glutathione-S-transferase, bioativação e excreção de xenobióticos, podendo refletir a exposição de agentes químicos de maneira eficiente (YANCHEVA et al., 2016).

Outros órgãos para avaliação da toxicidade são o rim (pelo seu envolvimento na regulação osmótica e iônica) e as brânquias que atuam como interface seletiva entre os ambientes internos e externos, desempenhando um papel importante na proteção do epitélio a substâncias tóxicas e patogênicas (VASCO et al, 2016).

Por se reconhecer que os peixes respiram através de brânquias, faz com que este órgão seja considerado o primeiro que permite contato com os poluentes (FILHO et al. 2014), e estes desempenham um papel fundamental para as trocas gasosas e regulação osmo-iônica. Estas alterações histopatológicas podem afetar diretamente os mecanismos de respiração e osmorregulação, para além de fornecerem uma área superficial maior para o fluxo de oxigênio, gás carbônico, eletrólitos, água, amônia e íons hidrogênio entre o sangue do peixe e seu meio externo (WINKALER, 2001).

Num estudo realizado por Silva (2004), foram avaliadas as alterações histopatológicas nas brânquias e no fígado de peixe *Astyanax scabripinnis*. Os animais foram recolhidos em cinco pontos diferentes do Rio Cambé - PR durante o período de um ano, sendo este rio sujeito a descargas de efluentes industriais, domésticos e agrícolas. Os peixes recolhidos nos cinco pontos

apresentaram várias alterações histopatológicas no tecido branquial como a elevação do epitélio lamelar com redução da distância interlamelar e início de fusão lamelar, rompimento das células pilares e constrição do fluxo sanguíneo.

Oliveira et al. (2016) realizaram um trabalho com objetivo de comparar lesões branquiais e hepáticas em tilápias (*Oreochromis niloticus*) de lagoas de cultivo e de rios de uma área protegida localizada em São Luís - MA. O estudo apontou que a espécie analisada apresentou respostas biológicas que podem ser agrupadas de acordo com sua severidade e que podem ser usadas como biomarcadores importantes para o monitoramento de ambientes aquáticos.

O órgão que apresentou lesões mais severas (irreversíveis) foi o fígado, indicando saúde comprometida nos peixes da lagoa de cultivo e os peixes provenientes do rio da área protegida mostraram sinais de estresse crônico. Ambos os locais de obtenção dos peixes estavam sujeitos à impactos de ordem industrial e urbano, possivelmente devido ao crescimento urbano desordenado ao longo da extensão dos rios (OLIVEIRA et al., 2016).

Para avaliar neurotoxicidade o biomarcador mais utilizado é atividade da acetilcolinesterase (AChE). Um grande número de contaminantes ambientais incluindo os inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos, metais pesados e HPAs podem afetar a atividade da AChE. O mecanismo de toxicidade traduz-se na inibição da enzima, resultando na acumulação de acetilcolina nas fendas sinápticas e a alterações da funcionalidade do SNC, levando a alterações de comportamento e mesmo à morte do organismo (SANTOS, 2009).

No estudo realizado por Jebali et al. (2013), quantificaram-se as acetilcolinesterases no cérebro e tecido muscular da espécie de carpa *Cyprinus carpio*. As amostras foram recolhidas em três lagos da Turquia e os peixes submetidos a diferentes condições ambientais. Verificou-se uma inibição total da atividade da AChE no cérebro de *C. carpio* que estavam no lago com os resíduos de pesticidas organofosforados, bem como, acumulação no tecido adiposo da espécie aquática.

3 HIPÓTESES

- Através da análise dos biomarcadores é possível observar efeitos tóxicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*), submetidas ao efluente tratado de uma indústria de frigoríficos;

- Através da análise dos biomarcadores não é possível observar efeitos tóxicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*), submetidas ao efluente tratado de uma indústria de frigoríficos.

4 OBJETIVOS

Avaliar, por meio de biomarcadores, efeitos tóxicos causados em tilápias (*Oreochromis niloticus*), após serem expostas a diferentes concentrações do efluente tratado de uma indústria de beneficiamento de carne de frango localizada em Lages, Santa Catarina.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade enzimática da catalase (CAT) nas brânquias, fígado, músculo e cérebro do peixe *Oreochromis niloticus*;
- Determinar a atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST) nas brânquias, fígado, músculo e cérebro do peixe *Oreochromis niloticus*;
- Determinar a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo do peixe *Oreochromis niloticus*;

5 METODOLOGIA

A realização da parte experimental desse trabalho seguiu as etapas apresentadas na Figura 10.



Figura 10 - Etapas da metodologia para realização da parte experimental.

5.1 COLETA DO EFLUENTE TRATADO

O efluente tratado foi coletado em Abril de 2019 em uma indústria de beneficiamento de carnes de frango localizada no município de Lages - Santa Catarina. A estação de tratamento da indústria é composta pelas etapas de tratamento preliminar, com as peneiras rotativas e o tanque de equalização, tratamento primário, com o flotador e o decantador primário, tratamento secundário, com a presença do tanque de lodos ativados e o decantador secundário e por fim, com a etapa de tratamento do lodo, com a prensa desaguadora, compostagem e envio para o aterro.

As etapas da estação de tratamento de efluentes podem ser observadas no esquema da Figura 11. No decantador secundário, foram coletados 15 litros do efluente que seguiria para o corpo receptor (Rio Amola Faca).

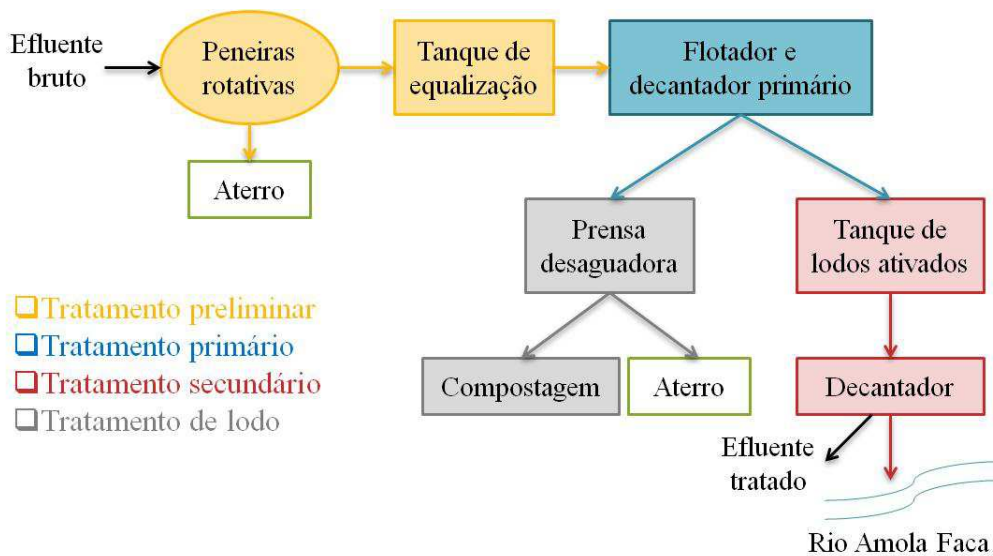


Figura 11 - Esquema da estação de tratamento de efluentes da indústria de beneficiamento de carne.

5.1.1 Caracterização do Efluente Tratado

A caracterização de um efluente é obtida a partir de diversos testes que mensuram o teor das substâncias que estão presentes no meio líquido. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e

desde que obedecem às condições, padrões e exigências dispostos nas normas brasileiras aplicáveis (CONAMA, 2011).

A

Tabela 3 apresenta a média dos resultados das análises físico-químicas de Março e Abril de 2019 do efluente tratado resultante no decantador secundário da indústria de beneficiamento de carne de frango comparados com os valores padrões de lançamento de efluentes dispostos pela Resolução Conama n° 430/2011.

Tabela 3 - Média dos resultados das análises físico-químicas de Março e Abril de 2019 do efluente final no tanque de decantação da indústria de beneficiamento de carne de frango e parâmetros do CONAMA n°430/2011.

Parâmetros	Efluente Final - Decantador Março/2019	Efluente Final - Decantador Abril/2019	CONAMA n° 430/2011
Temperatura	29°C	28°C	<40°C
pH	7,5	7,0	5 e 9
DQO	123 mg/L	120 mg/L	remoção de 60%
DBO	39 mg/L	28 mg/L	120 mg/L
NO ₂ -N	3,1 mg/L	0,1 mg/L	5 mg/L
NH ₃ -N	15,9 mg/L	6,9 mg/L	20 mg/L
NO ₃ -N	9,1 mg/L	0,9 mg/L	10 mg/L
PT	2,8 mg/L	2,8 mg/L	10 mg/L

A partir dos resultados da Tabela 3, nota-se que o efluente final no tanque de decantação possui uma ótima qualidade e atende aos parâmetros do CONAMA n° 430/2011. Considerando que a média de DQO de efluente bruto de frigorífico é 4.221 mg/L, DBO é 1.209 mg/l, NT é 427 mg/L e PT é 200 mg/L (BUSTILLO-LECOMPTE et al., 2014; AZIZ et al., 2019), a DQO e DBO do efluente tratado nesse caso específico já se encontram bem reduzidas, assim como os resultados dos outros parâmetros como nitrogênio total e fósforo total estão dentro da normalidade.

5.2 TESTE DE TOXICIDADE

5.2.1 Aclimação dos peixes

A aclimação dos peixes ocorreu em aquários montados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) durante sete dias.

Os 100 peixes foram alimentados uma vez por dia com ração industrial produzida para peixes e estavam sob aeração constante. A Figura 12 mostra os aquários com os peixes em aeração constante.



Figura 12 - Aclimação dos peixes no LABTOX - UDESC.

5.2.2 Teste de toxicidade

O teste de toxicidade foi realizado em duplicata sendo para ambas as réplicas o primeiro béquer controle (CTR) e mais 4 béqueres com diferentes diluições do efluente (10%, 25%, 50% e 75%), conforme pode ser visualizado na Figura 13.

No primeiro béquer (CTR) foi adicionado 2.500 ml de água da rede de abastecimento de água tratada da UDESC, no segundo béquer (10%) foi adicionado 250 ml de efluente e 2.250 ml de água, no terceiro béquer (25%) foi adicionado 625 ml de efluente e 1.875 de água, no quarto béquer (50%) foi adicionado 1.250 ml de efluente e 1.250 ml de água, e por último, no quinto béquer (75%) foi adicionado 1.875 ml de efluente e 625 ml de água.

Em cada béquer foi adicionado aleatoriamente 6 peixes com o mesmo tamanho e aproximadamente cinco gramas de peso cada um, submetendo-os a aeração mecânica constante durante cinco dias e sem alimentação.

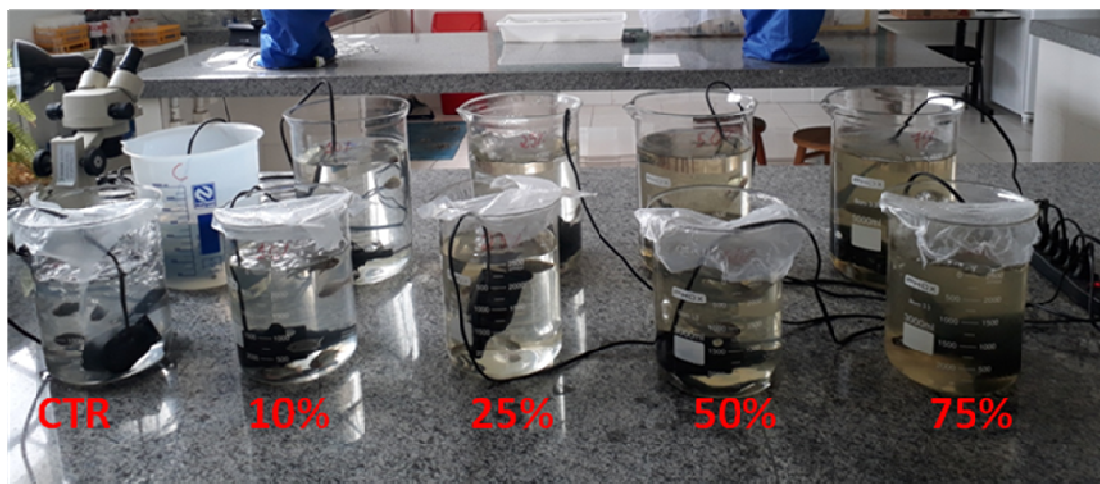


Figura 13 - Diluições do efluente para o teste de toxicidade com peixes.

Após os cinco dias, os peixes tiveram os tecidos das brânquias, músculo, cérebro e fígado removidos com material cirúrgico adequado (tesoura e pinça de inox) os quais foram armazenados em tubos de Eppendorf plásticos identificados. Após esse procedimento, os tecidos foram homogeneizados com solução-tampão e por fim, submetidos à refrigeração para evitar a degradação dos tecidos (

Figura 14).



Figura 14 - Remoção dos tecidos e refrigeração dos tubos Eppendorf.

5.2.3 Análise da catalase (CAT)

O protocolo para determinação da atividade da catalase foi proposto por Beutler (1975). Os coeficientes utilizados na equação da atividade enzimática da catalase foram obtidos a partir de dados experimentais realizados pelo autor do protocolo sob condições específicas do experimento que resultaram na metodologia que foi utilizada nesse trabalho.

Para a solução-tampão da CAT foi utilizado Tris HCl 1M (PM = 121,1), EDTA 5mM (PM = 372,24) e pH igual 8,0.

O substrato da reação foi preparado em uma proporção de 100 µL de H₂O₂ 30% em 100 mL de água destilada. As amostras foram acondicionadas em cubetas de quartzo, onde na cubeta destinada ao branco, foi adicionado 2,0 mL de solução tampão de CAT. Nas demais, foram adicionados 2,0 mL de solução tampão de CAT, 20 µL da amostra a ser analisada e 20 µL de substrato de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Em seguida, as leituras foram feitas um espectrofotômetro modelo T70+ da marca PG Instruments Ltda. O comprimento de onda foi ajustado para 240 nm e foram realizadas 5 leituras com um intervalo de 1 min entre elas. Ao final da análise, os valores obtidos foram transferidos para uma planilha eletrônica para o cálculo final da atividade da enzima, determinada por meio da (Equação 1):

$$\text{Atividade da CAT} = \frac{\Delta \text{Abs da amostra}}{Q_{\text{prot}} \times 0,071 \times 0,01} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que:

Atividade da CAT = Atividade da enzima catalase (µmol H₂O₂ metabolizada min⁻¹ mg de proteína⁻¹);

Δ Abs amostra = Média dos valores de absorvância de cada amostra;

Q_{prot} = Quantidade de proteína para cada amostra (mg).

5.2.4 Análise da glutationa-S-transferase (GST)

O protocolo para determinação dessa atividade foi proposto por Keen, Habig, Jacob (1976). Os coeficientes utilizados na equação da atividade enzimática da GST foram obtidos a partir de dados experimentais realizados pelos autores do protocolo sob condições específicas do experimento que resultaram na metodologia que foi utilizada nesse trabalho.

Para a solução tampão de GST foi utilizado: 400 mL de água destilada, 3,4 g de Fosfato

de Potássio Monobásico (PM = 136,09), 4,35 g de Fosfato de Potássio Dibásico (PM = 174,18) e pH igual 7,0. Foi diluído um sal de cada vez e após medir o pH, completou-se com água destilada até 500 mL.

Após foram preparadas duas soluções como substrato da reação. A primeira solução com a razão de 0,02 g de CNDB (1-cloro-2,4-di-nitrobenzene) para 1,0 mL de álcool 100% e a segunda, uma solução de 0,03 g de GSH para 1,0 mL de solução tampão GST.

Em uma cubeta de polipropileno, foi adicionado para o branco 2,5 mL de solução tampão de GSH. Nas demais cubetas, foram adicionados 2,5 mL de solução tampão, 10 µL de amostra, 10 µL de substrato de CDNB e 10 µL de substrato de GSH. No espectrofotômetro foi ajustado o comprimento de onda 340 nm e foram realizadas 5 leituras com um intervalo de 1 min entre elas. Ao final da análise, os valores obtidos foram transferidos para uma planilha eletrônica para o cálculo final da atividade da enzima, determinada por meio da (Equação 2):

$$\text{Atividade da GST} = \frac{Q_{\text{prot}} \times 9,6}{\Delta \text{ Abs da amostra}} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo que:

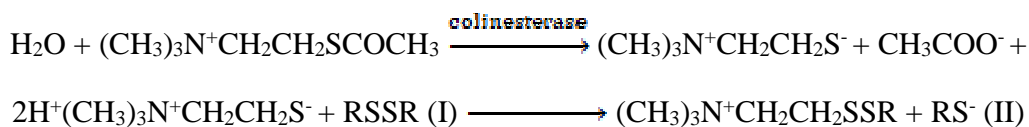
Atividade da GST = Atividade da enzima glutationa-s-transferase (nmol CDNB conjugado min⁻¹ mg de proteína⁻¹);

Δ Abs amostra = Média dos valores de absorbância de cada amostra;

Q_{prot} = Quantidade de proteína para cada amostra (mg).

5.2.5 Análise da acetilcolinesterase (AChE)

O método é baseado em Ellman et al. (1961) e consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. O substrato, iodeto de acetilcolina, é hidrolisado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiois-(2-nitrobenzoato) (I) para produzir o ânion amarelo 5-tio-nitrobenzoato (II), conforme equações mostradas a seguir.



A preparação da reação foi feita através da preparação da solução tampão de fosfato, seguido da preparação do substrato e do reagente de cor. Os coeficientes utilizados na equação da atividade enzimática da AChE foram obtidos a partir de dados experimentais realizados pelo

autor sob condições específicas do experimento que resultaram na metodologia que foi utilizada nesse trabalho.

Para preparação da solução tampão de fosfato foi utilizado 8,5 g de KH_2PO_4 dissolvido em 250 mL de água destilada e 2,5 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 250 mL de água destilada. Foi misturado 50 mL da solução de KH_2PO_4 com 39,5 mL da solução de NaOH e com ajuste do pH para 7,4.

O substrato foi preparado pesando 5,4 mg de iodeto de acetilcolina para 1 mL de água destilada. Como reagente de cor foi dissolvido 39,6 g de ácido 5,5'-ditiois-(2-nitrobenzoato) (DTNB) em 10 mL de tampão fosfato (0,1M) e após, adicionado 15 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

Em uma cubeta de polipropileno, foi adicionado 2,0 mL de tampão fosfato, 100,0 μL de substrato, 100,0 μL de reagente de cor (DTNB) e 100,0 μL de amostra. No espectrofotômetro foi ajustado o comprimento de onda 412 nm e serão realizadas 5 leituras com um intervalo de 30 segundos entre elas. Ao final da análise, os valores obtidos foram transferidos para uma planilha eletrônica para o cálculo final da atividade da enzima, determinada por meio da (Equação 3):

$$\text{Atividade da AChE} = \frac{\Delta \text{ Abs amostra} \times 73.03}{Q_{\text{prot}}} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo que:

Atividade da AChE = Atividade da acetilcolinesterase ($\mu\text{moles} \cdot \text{mg de proteínas}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);

$\Delta \text{ Abs amostra}$ = Média dos valores de absorvância de cada amostra;

Q_{prot} = Quantidade de proteína para cada amostra (mg).

5.2.6 Análise de proteína

Após a realização das análises referentes às atividades enzimáticas, foi aferido as absorvâncias dos teores de proteínas de cada amostra pelo método do biureto. Foi adicionado em cubetas, 50 μL de amostra, 1,5 mL do reagente de biureto e 2 gotas de NaOH. O comprimento de onda do equipamento foi ajustado para 550 nm e foi feita uma única leitura. Ao final da análise, os valores obtidos foram transferidos para uma planilha eletrônica para o cálculo final do teor de proteína em cada amostra, determinada por meio da (Equação 4):

$$Q_{prot} = \left(\frac{\Delta Abs da amostra}{\Delta Abs padrão} \right) \times 40 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo que:

Q_{prot} = Quantidade de proteína para cada amostra (mg).

$\Delta Abs amostra$ = Média dos valores de absorvância de cada amostra;

$\Delta Abs padrão$ = Absorvância padrão do equipamento (Abs = 0,111).

5.3 ESTATÍSTICA

Os resultados das atividades das enzimas CAT, GST e AChE foram submetidas a análise de variância (ANOVA) para comparação das médias das atividades enzimáticas entre as duplicatas pelo Teste Tukey, ao nível de confiança de 95%, no software de estatística SISVAR 5.6. Com esse procedimento foi verificado que não existia diferença significativa entre as médias das duas duplicatas para todos os testes.

Dessa forma, os resultados obtidos para as duplicatas foram agrupados. Após, foi realizado o intervalo de confiança de 1% para tirar resultados anômalos e a partir disso, os dados foram submetidos novamente ao teste tukey a ao delineamento dos blocos casualizados.

O teste de Tukey tem como base a DMS (diferença mínima significativa). Para dados balanceados a DMS é calculada por meio da Equação 5:

$$DMS = q_{\alpha}(g, N - g) \sqrt{\frac{QMErro}{n}} \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo que:

n = número de réplicas do tratamento

q_{α} = valor tabelado (Tabela do Teste de Tukey)

QMErro = quadrado médio do erro.

Os delineamentos experimentais são as formas de distribuição dos tratamentos na área experimental (UFLA-DEX, 2010). Os principais delinamentos experimentais utilizados na área ambiental são o delineamento inteiramente casualizado, delineamento blocos casualizados e delineamento do quadrado latino.

6 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a atividade média enzimática e o desvio padrão amostral para a acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo dos peixes analisados.

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, o que significa dizer que no teste Tukey de comparação de médias, pode-se afirmar com 95% de confiança que as médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais.

Tabela 4 - Atividade média enzimática e desvio padrão da AChE para o cérebro e músculo.

Tratamentos	Atividade média enzimática* e desvio padrão	
	Cérebro	Músculo
CTR	0,363 ± 0,305 a	0,207 ± 0,096 a
10%	0,686 ± 0,299 a	0,466 ± 0,310 a
25%	0,807 ± 0,037 a	0,418 ± 0,179 a
50%	0,623 ± 0,135 a	0,339 ± 0,308 a
75%	0,819 ± 0,281 a	0,265 ± 0,112 a
DMS	0,468	0,399

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

A Figura 15 e a Figura 16 apresentam de forma gráfica os resultados da atividade média enzimática com seu respectivo desvio padrão para a acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo dos peixes.

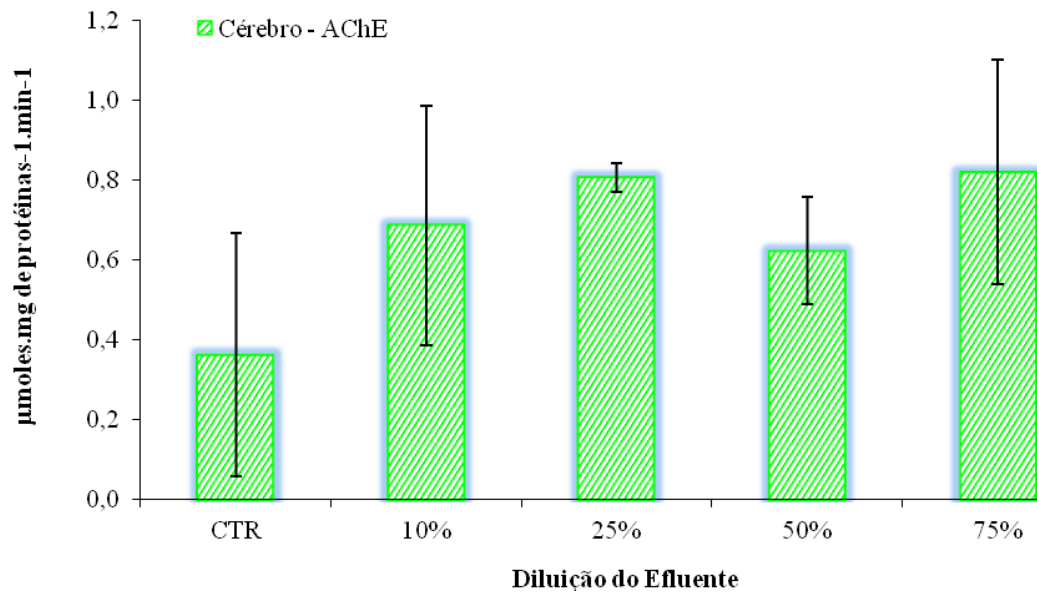


Figura 15 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima AChE.

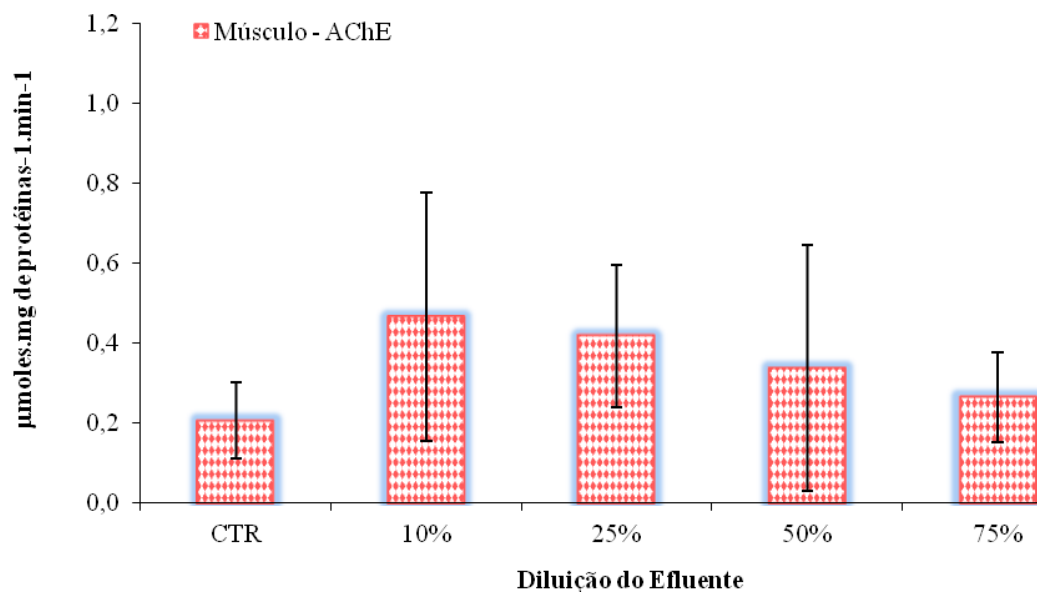


Figura 16 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima AChE.

Os resultados mostraram que a acetilcolinesterase teve atividade no cérebro e músculo dos organismos em relação ao controle, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo com as diferentes concentrações do efluente, ao nível de 5% de probabilidade, sendo portanto estatisticamente iguais, e em nenhum a diferença entre as médias superou o DMS.

6.2 CATALASE (CAT)

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a atividade média enzimática e o desvio padrão amostral para a catalase (CAT) no cérebro, músculo, brânquias e fígado dos peixes analisados.

Tabela 5 - Atividade média enzimática e desvio padrão da CAT.

Tratamentos	Atividade média enzimática* e desvio padrão			
	Cérebro	Músculo	Brânquias	Fígado
CTR	7,56 ± 8,73 a	12,21 ± 6,27 a	11,96 ± 1,78 a	8,99 ± 2,91 ab
10%	2,53 ± 1,40 a	9,25 ± 7,37 a	25,91 ± 6,31 b	11,60 ± 8,66 Ab
25%	2,66 ± 1,54 a	9,57 ± 4,54 a	17,55 ± 5,87 ab	9,11 ± 3,22 A
50%	3,16 ± 0,84 a	5,93 ± 4,21 a	20,46 ± 9,07 ab	3,64 ± 2,21 Ab
75%	7,11 ± 3,48 a	4,85 ± 2,42 a	17,23 ± 6,06 ab	6,00 ± 3,94 B
DMS	7,21	8,33	18,31	13,64

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

A Figura 17, Figura 18, Figura 19 e Figura 20 apresentam de forma gráfica os resultados da atividade média enzimática com seu respectivo desvio padrão para a catalase no cérebro, músculo, brânquias e fígado dos peixes.

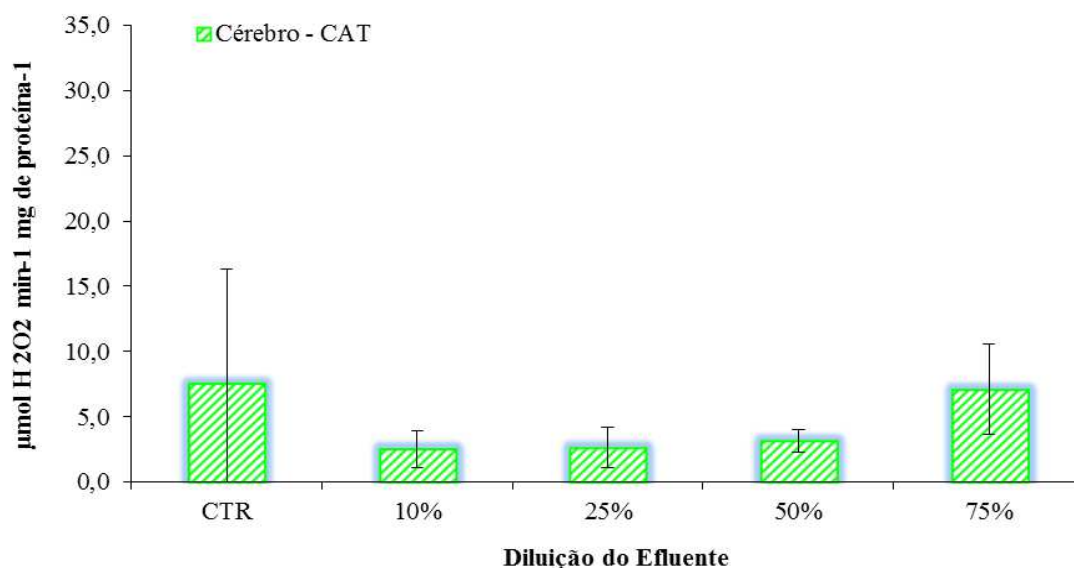


Figura 17 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima CAT.

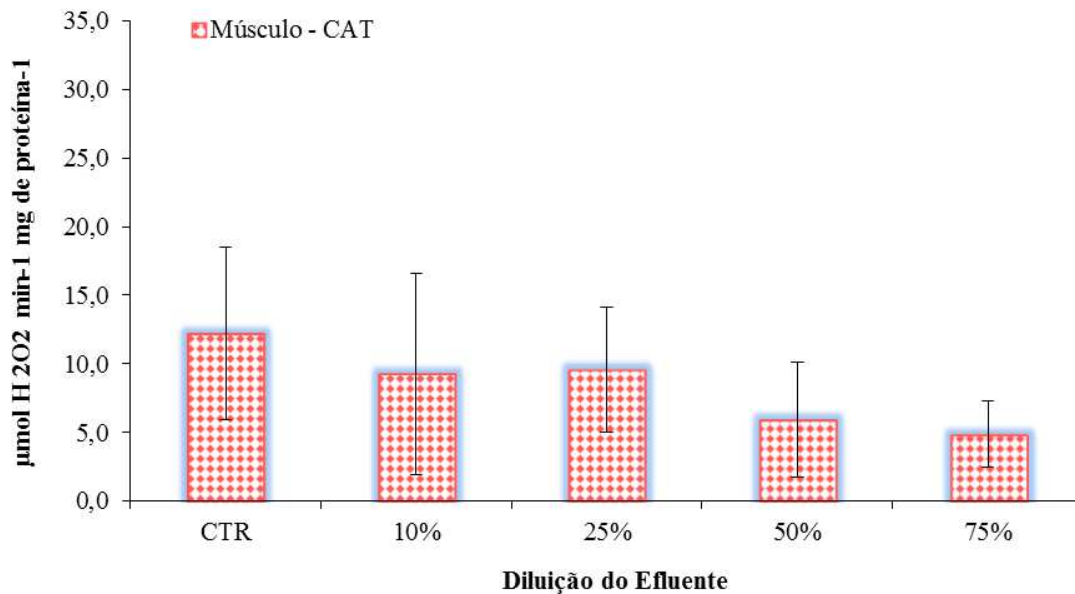


Figura 18 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima CAT.

As atividades enzimáticas médias do cérebro (Figura 17) e do músculo (Figura 18) dos organismos não foram estatisticamente significativas conforme as diluições comparadas ao controle, ao nível de 5% de probabilidade, o que significa que as médias são estatisticamente iguais, e em nenhum a diferença entre as médias superou o DMS.

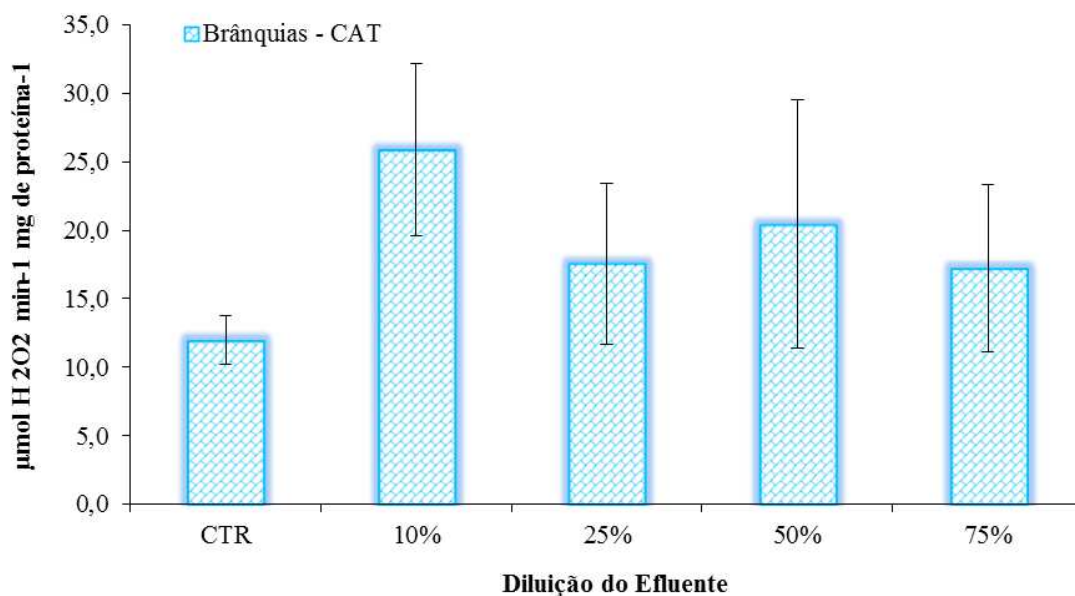


Figura 19 - Média e desvio padrão para as brânquias da enzima CAT.

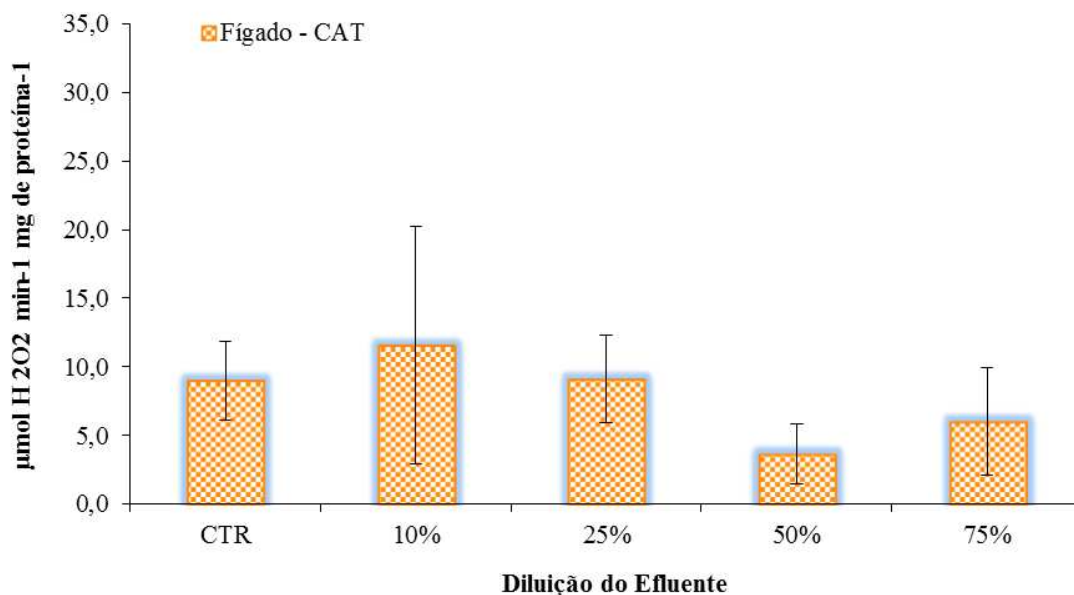


Figura 20 - Média e desvio padrão para o fígado da enzima CAT.

Nas brânquias (Figura 19), a atividade enzimática média dos organismos variou estatisticamente conforme as diluições em relação ao controle, apresentando uma diferença maior que o DMS entre a atividade média da concentração 10% e a atividade média do controle, significando que nesse tecido essa concentração foi estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%.

No fígado (Figura 20), a atividade enzimática média do fígado dos organismos variaram estatisticamente conforme as diluições em relação ao controle, ao nível de 5% de probabilidade, contudo, em nenhum a diferença entre as médias superou o DMS.

Alterações na atividade da catalase indicam que por causa da geração de peróxido de oxigênio nas células devido o contato com compostos químicos, a catalase teve atividade aumentada pois foi necessária sua produção para decompor esse peróxido de oxigênio em água e oxigênio molecular, impedindo que essas espécies reativas de oxigênio (EROs) provocassem as lesões celulares nos tecidos das brânquias e fígado dos organismos.

O trabalho de Zanette et al. (2008) comparou a atividade da enzima catalase em brânquias e glândulas digestivas de ostras das espécies *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas* que foram obtidas em quatro pontos distintos de um rio no município de São José, Santa Catarina, de acordo com um gradiente de contaminação por descarga de esgoto doméstico. Os resultados mostraram que a atividade da catalase aumentou em ambos os órgãos da *C. rhizophorae*

conforme aumentava a proximidade com o local de contaminação e a espécie *C. gigas* também apresentou um aumento, mas somente na atividade da enzima branquial.

O estudo realizado por Batista et al. (2014), identificou a resposta da catalase, entre outros biomarcadores, em *Astyanax bimaculatus* coletados em três pontos distintos (IP, RM e FP) de rios e corpos de água superficiais da bacia hidrográfica do Rio Una. As análises físico-químicas das amostras de água demonstraram uma concentração maior de poluentes, naturais ou antrópicos, para IP e RM em relação à FP, do mesmo modo que os níveis da catalase foram, respectivamente, 148,9% e 202,4% maiores nos peixes destes dois pontos (IP e RM) em comparação com os peixes do ponto FP.

6.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A

Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a atividade média enzimática e o desvio padrão para a glutatona-S-transferase no cérebro, músculo, brânquias e fígado dos peixes analisados.

Tabela 6 - Atividade média enzimática e desvio padrão da GST.

Tratamentos	Atividade média enzimática* e desvio padrão			
	Cérebro	Músculo	Brânquias	Fígado
CTR	4.967,9 ± 2.340,4 a	5.713,4 ± 3.215,8 a	2.783,2 ± 758,7 b	900,1 ± 499,5 ab
10%	2.643,8 ± 871,4 ab	3.343,1 ± 1.474,9 a	516,5 ± 146,4 a	1.117,2 ± 506,2 ab
25%	3.562,0 ± 1001,3 bc	3.870,3 ± 839,3 a	1.188,8 ± 343,8 a	458,21 ± 99,8 a
50%	2.089,9 ± 1014,3 ab	2.800,1 ± 1.931,8 a	730,3 ± 174,2 a	1.059,3 ± 459,8 ab
75%	1368,9 ± 501,8 a	12.617,3 ± 4108,3 b	1.035,1 ± 443,5 a	1.193,8 ± 301,7 b
DMS	3.882,72	7786,43	1.262,24	862,74

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

A Figura 21, Figura 22, Figura 23 e Figura 24 apresentam de forma gráfica os resultados da atividade média enzimática com seu respectivo desvio padrão para a glutatona-S-transferase no cérebro, músculo, brânquias e fígado dos peixes.

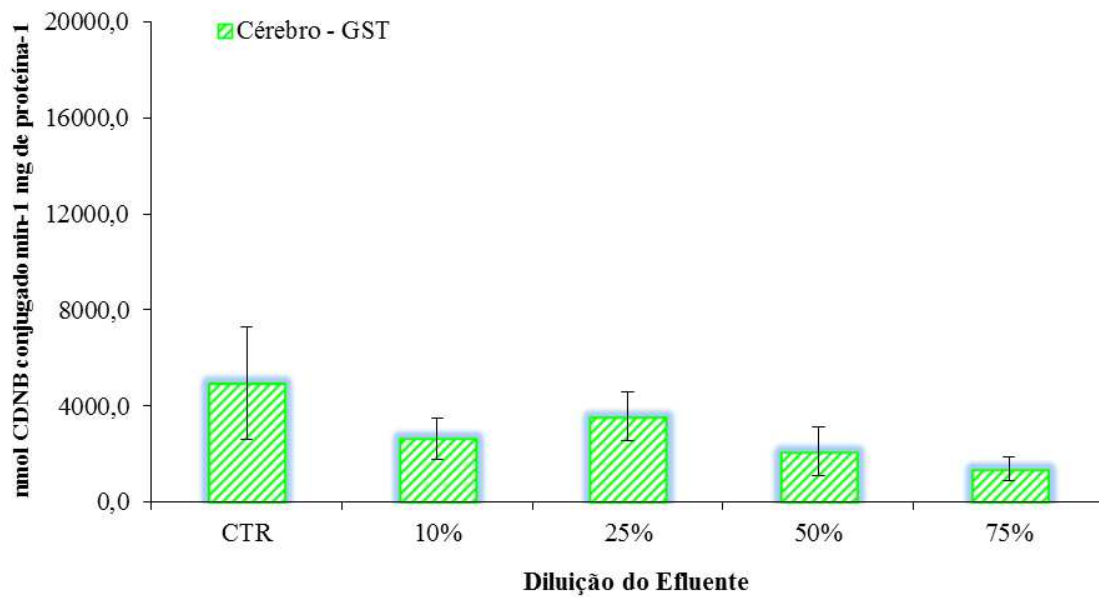


Figura 21 - Média e desvio padrão para o cérebro da enzima GST.

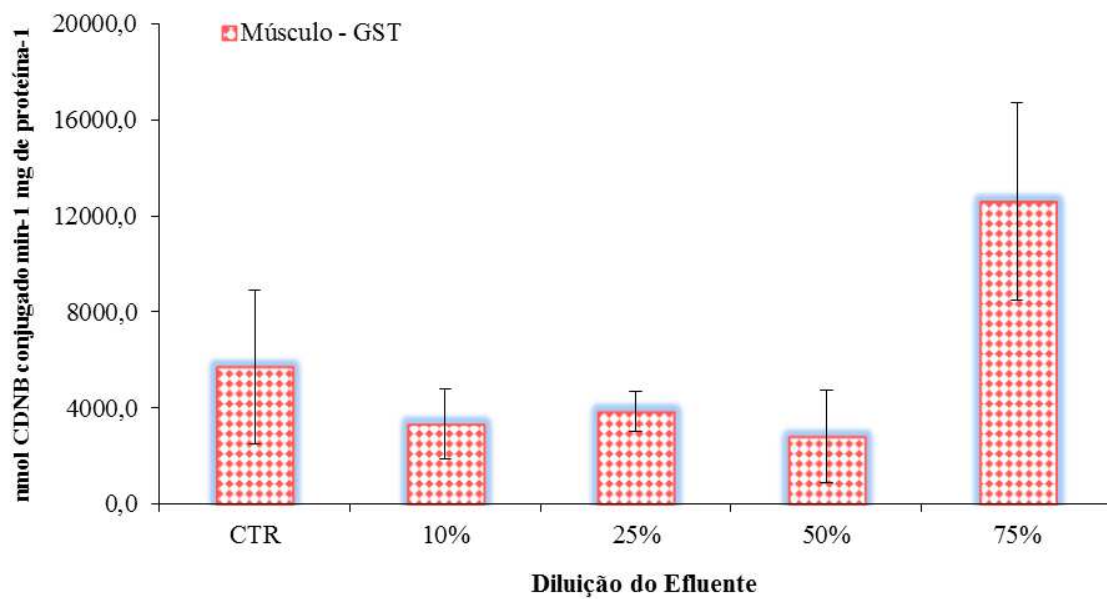


Figura 22 - Média e desvio padrão para o músculo da enzima GST.

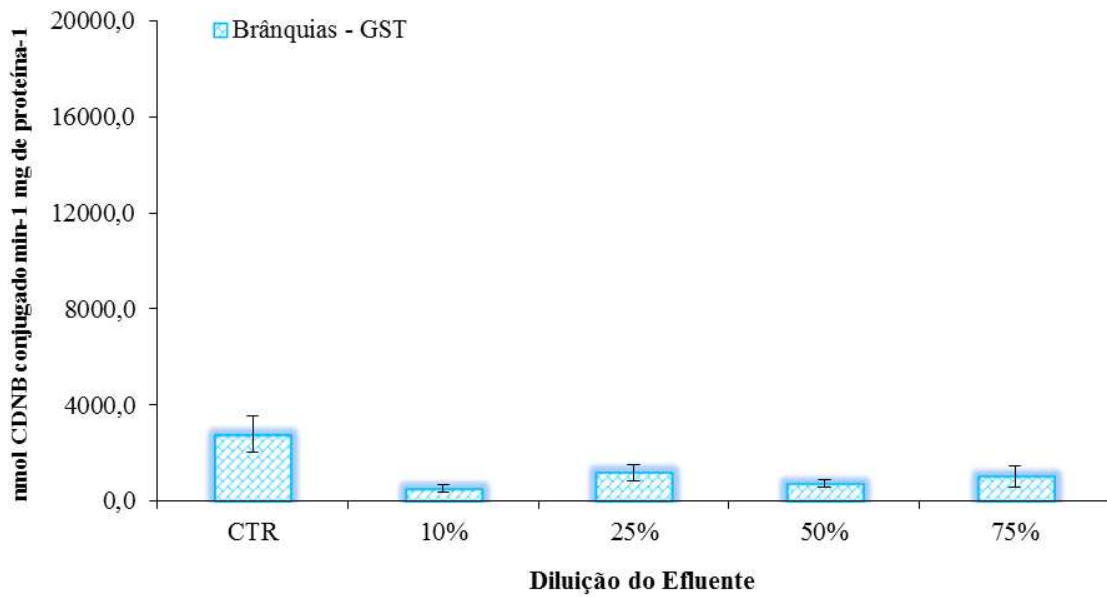


Figura 23 - Média e desvio padrão para as brânquias da enzima GST.

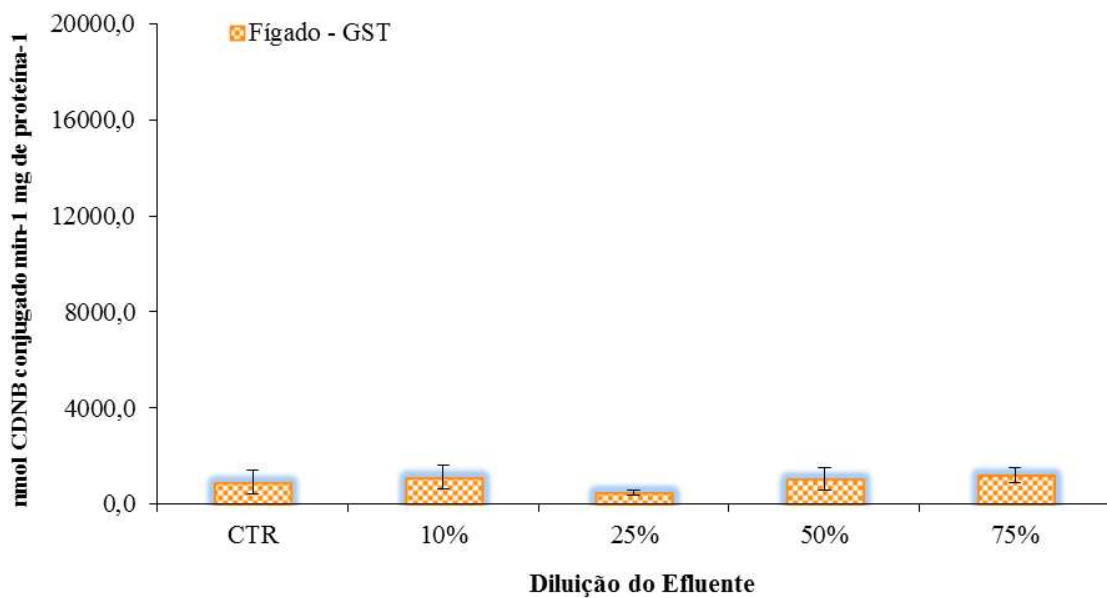


Figura 24 - Média e desvio padrão para o fígado da enzima GST.

Os resultados mostram que a enzima GST apresentou inibição estatisticamente significativa no músculo na concentração de 50% e indução na concentração 75% (Figura 22) e, nas brânquias (Figura 23), a GST teve inibição estatisticamente significativa em relação ao controle em todas as concentrações.

No cérebro e no fígado, a atividade enzimática média dos organismos variou estatisticamente conforme as diluições em relação ao controle, ao nível de 5% de probabilidade, contudo, em nenhum a diferença entre as médias superou o DMS (Figura 21 e Figura 24).

No músculo, a atividade enzimática média (Figura 22) dos organismos variou estatisticamente conforme as diluições, apresentando uma diferença maior que o DMS entre a média da concentração 50% e 75%, significando que essas concentrações foram estatisticamente significativas nesse tecido.

Nas brânquias, a atividade enzimática média (Figura 23) dos organismos variou estatisticamente conforme as diluições em relação ao controle, onde todas as médias das diluições tiveram uma diferença maior que o DMS em relação a média do controle.

A GST é a principal enzima na fase II do processo de detoxificação celular, que catalisa a conjugação de eletrófilos com o tiol reativo hidrofílico da glutatona (GSH), facilitando o mecanismo de excreção de xenobióticos (BATHIGE et al., 2014).

O fígado é a principal fonte de GST em peixes, onde essa enzima corresponde a uma grande fração das proteínas hepáticas solúveis. A atividade da GST também já foi descrita em órgãos extra-hepáticos de peixes, entretanto sua atividade nesses tecidos é geralmente menor do que no fígado (MARTINEZ, 2006).

A atividade aumentada da GST pode estar associada a um processo adaptativo do organismo à presença de uma variedade de compostos orgânicos no ambiente, indicando que os resultados da GST devem ser analisados de forma cuidadosa e sempre associados com os resultados de outros biomarcadores bioquímicos (GALLAGHER & GROSS SHEEHY, 2001).

Foi relatado um aumento na atividade hepática do GST em vários estudos após a exposição de peixes a PAHs, PCBs, OCPs e PCDDs, mas a maioria dos estudos não demonstrou alterações estatisticamente significativas entre peixes de locais poluídos e o controle. Foi observada uma diminuição significativa nas atividades de GST em truta arco-íris, robalo, dourada e peixes-sol expostos PCDDs, pesticidas ou HAPs, e em algumas espécies de peixes em ambientes poluídos (VAN DER OOST, BAYER, VERMEULEN, 2003).

Dessa forma, a utilização da atividade total da GST como biomarcador para avaliação de risco ambiental ou ecológico é limitada a algumas espécies de peixes e, ainda, a exposição a certos compostos pode causar tanto a indução quanto a inibição da atividade enzimática (VAN DER OOST, BAYER, VERMEULEN, 2003).

7 CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho foram obtidas a partir dos resultados de Março e Abril das análises físico-químicas do efluente tratado e dos resultados da análise dos biomarcadores catalase, glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase no peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) após serem submetidas a esse efluente tratado.

O efluente da parte físico-química apresentou uma qualidade excelente indicando que o tratamento utilizado está sendo eficiente na remoção dos compostos orgânicos e inorgânicos do efluente. Como consequência, observaram-se poucas alterações dos biomarcadores no organismo dos peixes avaliados.

Para a acetilcolinesterase, o cérebro e músculo não apresentaram resultados estatisticamente significativos. A catalase teve atividade significativa nas brânquias e fígado dos organismos e a glutathione-S-transferase teve atividade estatisticamente significativa no músculo e brânquias dos organismos.

Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o efluente tratado da indústria, após ser submetido a todas as etapas do sistema de tratamento de efluentes, possui uma excelente qualidade e poucas alterações significativas foram observadas nos biomarcadores de contaminação catalase, glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase na espécie de peixe testada Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRADI, E. et al.. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water. **Chemosphere**, v. 41, p. 1555-1562, 2000.

ALMEIDA, F. S. C. de et al.. Determinação das condições operacionais para o tratamento terciário de efluente frigorífico pelo processo integrado Fenton-Coagulação. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, v. 10, n. 3, p. 1-1, 2015.

AMORIM, L. C. A.. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158- 170, 2003.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A.. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). **ABIA divulga balanço do setor de alimentos e bebidas**. 2017. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=319>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

AZIZ, A. et al.. Biological wastewater treatment (anaerobic-aerobic) technologies for safe discharge of treated slaughterhouse and meat processing wastewater. **Science Of The Total Environment**, v. 686, p. 681-708, 2019.

BATISTA, M. T. O. et al.. Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 4, p. 621-631, 2014.

BATHIGE, S. D. N. K. et al.. A mu class glutathione-S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 162, p. 85-95, 2014.

BEDIN, B. H.. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos a óleo diesel e biodiesel**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto - SP, 2013. 56 p.

BEUTLER, E.. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Straton, 1975.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F. et al.. Cost-effectiveness analysis of TOC removal from slaughterhouse wastewater using combined anaerobic–aerobic and UV/H₂O₂ processes. **Journal Of Environmental Management**, v. 134, p. 145-152, 2014.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M.. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. **Journal Of Environmental Management**, v. 161, p. 287-302, 2015.

COIMBRA, R. dos S. C.. **Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço**. Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes - RJ, v. 7 n. 1, p. 153-172, 2013.

COMPANHIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA (CIDASC). **Boletim Agropecuário traz panorama da produção de carnes em Santa Catarina**. 2017. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2017/03/24/boletim-agropecuário-traz-panorama-da-produção-de-carnes-em-santa-catarina/>>. Acesso em: 20 de maio 2018.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

CONNOR, R. E. et al.. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. **Sensors**, v. 9, n. 12, p. 12741-12771, 2012.

COSTA, C. R. et al.. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CUNHA, I. et al.. **Develop Protocols for Type of Monitoring and Seasonality**. CIIMAR. 2006.

DOMINGUES, I. et al.. Cholinesterase and glutathione-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. **Environmental Toxicology Chemical**, v. 29, p. 5-18, 2010.

FENT, K.. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205, n. 3, p. 223–240, 2004.

FLESCHE, S.. **Respostas do sistema de detoxificação e das defesas antioxidantes celulares em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a ambientes contaminados em Joinville, SC**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC. 2011. 139 p.

FRICK, J. M.. **Estudo do monitoramento de efluentes líquidos industriais de frigoríficos no Rio Grande do Sul**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - PR, 2016. 38 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (OECD-FAO). **Agricultural Outlook 2018-2027: Special focus: Middle East and North Africa**. 2018. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org/>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2018.

GALLAGHER, E. P.; GROSS SHEEHY, K. M.. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in, T.S.; lake Apopka brown bullheads (*Ameirus nebulosus*). **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 223-237, 2001.

GAO, Y. et al.. Toxic effects of enrofloxacin on growth rate and catalase activity in *Eisenia fetida*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 177–180, 2008.

GLISIC, B. et al.. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.

GUPTA, R. C.. Chapter 1: Introduction. **Biomarkers in Toxicology**. Kentucky: Elsevier, p.3-5, 2014.

GUPTA, V. K., ALI, I. **Environmental Water Advances in Treatment, Remediation and Recycling**. Amsterdam: Elsevier. 2013.

HALLIWELL B.; WHITEMAN M.. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HERMES-LIMA, M.. **Chapter 12 - Role of Free Radicals**. Nova Jersey: Wiley, 2004. 606 p.

HODGSON, E.. **Introduction to Biotransformation (Metabolism)**. Third Edit ed. Elsevier Inc., Volume 1, 2010.

INSAUSTI, D. et al.. Biliary fluorescent aromatic compounds (FACs) measured by fixed wavelength fluorescence (FF) in several marine fish species from the NW Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1635-42, 2009.

JEBALI, J. et al.. Cholinesterase activity as biomarkers of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 13, n. 8, p. 525-537, 2013.

KÄFFER, M. I.. **Biomonitoramento da qualidade do ar com uso de líquens na cidade de Porto Alegre, RS**. Tese de Doutorado em Ecologia. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS. 2011. 45 p.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B.. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal Biology Chemical**, v. 20, p. 6138-6188. 1976.

KESKES, S. et al..Performance of a submerged membrane bioreactor for the aerobic treatment of abattoir wastewater. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 28–34, 2012.

KLAASSEN, C. D.. **Metais pesados e antagonistas dos metais pesados**. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, p. 1389-1407, 2001.

KRYCH-MADEJ, J.; GEBICKA, L.. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 171, p. 10–17, 2017.

LI, J. P. et al.. Nutrient removal from slaughterhouse wastewater in an intermittently aerated sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7644-7650, 2008.

MALMALI, M. et al.. Journal of Water Process Engineering Evaluation of ultra filtration membranes for treating poultry processing wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 22, p. 218–226, 2018.

MANNO, M. et al.. Biomonitoring for occupational health risk assesment (BOHRA). **Toxicology Letters**, v. 192, p. 3-16, 2010.

MARTINEZ, C. B. dos. R. **Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água**. Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Estadual de Londrina. 2006. 19 p.

MEES, J. B. R.. **Tratamento de Resíduos Líquidos III**. Apostila. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira - PR, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Projeções do Agronegócio : Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília : MAPA/ACE, 2018. 112 p.

MORETTO, D.. **Avaliação da remoção de pigmentação de calda de indústria de balas utilizando peróxido de hidrogênio promovido com íon hidroxila**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim - RS, 2011. 50 p.

MÜLLER, T. C. et al.. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, v. 1587, n. 1, p. 92-98, 2002.

NIYOGI, S. et al.. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 13-26, 2001.

NOGUEIRA, T. D.. **Efeitos agudos de efluentes líquidos industriais**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande - MS, 2010. 71 p.

NOGUEIRA, L. et al.. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1–4, p. 243–255, 2011.

OLIVEIRA, S. R. S. de et al.. Lesões histopatológicas como biomarcadores de contaminação aquática em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes, Cichlidae) de uma área protegida no Maranhão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 9, n. 1, p. 12–26, 2016.

OLIVO, R.. **O Mundo do Frango, Cadeia Produtiva da Carne do Frango**. Criciúma : Editora do Autor, 2006. 680 p.

PEREIRA, E. L. et al.. Physico-chemical and ecotoxicological characterization of slaughterhouse wastewater resulting from green line slaughter. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 6, p. 1-12, 2016.

RAHMAN, U. et al.. Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. **Food Research International**, 2014.

RAJAB, A. R. et al.. Performance of integrated anaerobic/aerobic sequencing batch reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 967-974, 2017.

RYAN, P. B. et al.. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 155, n. 5, p. 833-840, 2007.

SANTOS, S.. **Estudo da actividade inibidora de acetilcolinesterase e actividade antioxidante por derivados de colina e ácido cafeico, cinâmico e rosmarinico**. Dissertação (Departamento de Química e Bioquímica), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009. 79 p.

SCHATZMANN, H. C.. **Tratamento avançado de efluentes de frigorífico de aves e o reuso da água**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC, 2009. 110 p.

SHAMI, N.J. I. E; MOREIRA, E. A. M.. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SILVA, A.. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquáticas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Londrina, Londrina - PR. 2004. 80 p.

SOGORB, M. A. et al.. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 356-367, 2014.

TERAMITSU, I. et al.. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. **Aquatic Toxicology**, v. 51, p. 145-53, 2000.

TRÍDICO, C. P. et al.. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo [a] pyrene and diazinon. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 858– 863, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA) - DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS (DEX). **Notas de aulas de estatística experimental. Parte 3 - Delineamentos Experimentais.** 2010. 12 p.

VAN DER OOST, R.; BAYER, J.; VERMEULEN, N.P.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 13, p. 57- 149, 2003.

VASCO et al.. **Biomarcadores para avaliação de alterações na qualidade ambiental de ambientes aquáticos.** 10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre - RS. 2016. 16 p.

WEPENER, V.. **Active Biomonitoring.** Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer Reference. 2013.

WINKALER, E. U.. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum.** Maringá, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

WON, E. J. et al.. Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 154, p. 82-92, 2011.

YANCHEVA, V. S. et al.. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.

ZANETTE, J. et al.. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 196-198, 2008.

ZHOU, Q. et al.. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.