

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

**“Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ALAD) de Tilápia
(*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento do Chumbo no Ambiente
Aquático”**

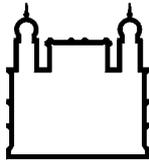
por

Carlucio Rocha dos Santos

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Saúde Pública*

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro, maio de 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

***“Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ALAD) de Tilápia
(Oreochromis niloticus) no Monitoramento do Chumbo no Ambiente
Aquático”***

apresentada por

Carlucio Rocha dos Santos

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Jaime Silva de Lima

Prof. Dr. Darcilio Fernandes Baptista

Prof. Dr. Moacelio Veranio Silva Filho

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Orientadora

Dissertação defendida e aprovada em 14 de maio de 2008.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

S237a Santos, Carlucio Rocha dos
Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ALAD) de
Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento do
chumbo no ambiente aquático. / Carlucio Rocha dos
Santos. Rio de Janeiro: s.n., 2008.
xi, 48 p., il., tab.

Orientador: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da Costa
Dissertação de Mestrado apresentada à Escola
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

1. Tilápia-metabolismo. 2. Monitoramento. 3.
Chumbo-análise. 4. Chumbo-toxicidade. 5. Marcadores
Biológicos. 6. Ambiente Aquático. I. Título.

CDD - 22.ed. - 363.73

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Paulo, minha mãe Ana, meus irmãos e família por terem me apoiado, mesmo sem saber, na conclusão de mais uma etapa.

À minha noiva Patrícia pelo carinho, paciência e simplesmente por existir.

À minha orientadora Rita pela oportunidade e incentivo para a conclusão deste trabalho.

À companheira de bancada e amiga Ana Luiza por todo o apoio e calma durante a conclusão deste trabalho.

À Moacelio por toda uma dedicação que, sem a qual nada disto seria possível.

À Fazenda Morro Grande, em especial Marcelino e Alfredo, pelo pronto fornecimento dos animais.

À todos os meus amigos do laboratório de toxicologia pelos momentos de alegria e descontração tornando o dia a dia mais leve.

À Faperj pelo financiamento deste estudo.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente e que porventura não mencionados saibam que palavras não podem refletir a totalidade de minha gratidão.

“Todas as doenças têm seu princípio em algumas das três substâncias: Sal, Enxofre ou Mercúrio; isto quer dizer que podem ter sua origem no domínio da matéria, na esfera da alma, ou no reino do espírito. Se o corpo, a alma e a mente estão em perfeita harmonia, uns com os outros, não existe nenhuma discordância; mas se se origina uma causa de discordância em um destes três planos, isto se comunica aos demais”.

Paracelsus

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz”.

Aristóteles

RESUMO

O chumbo é um metal com características físico-químicas largamente empregadas na indústria levando à sua grande dispersão no ambiente. O chumbo causa alguns efeitos hematológicos na biogênese do radical Heme da hemoglobina inibindo a enzima delta aminolevulínico desidratase (ALAD; EC 2.4.1.24). O objetivo desse estudo é avaliar o potencial da tilápia (*Oreochromis niloticus*), que resiste a muitas condições adversas e está sendo extensamente cultivada para monitorar o chumbo em ambiente aquático usando ALAD como biomarcador. Machos de tilápia pesando ao redor de 200g foram obtidos de um criador comercial e até três peixes foram aclimatados em tanques de plástico contendo 40L de água filtrada por celulose e carvão ativado sob aeração constante. Os peixes foram anestesiados com eugenol e injetados através do peritônio com doses de 1, 10 e 100mg de acetato de chumbo por kg de peixe. Depois de 24 horas, os peixes foram anestesiados com eugenol e o sangue foi coletado por punção da veia caudal e o fígado foi coletado depois do sacrifício por secção da espinha dorsal. A atividade de ALAD foi determinada no sangue e em homogeneizados de fígado pelo método de SAKAI (Int. Arch. Occup. Environ. Health 68(2):126-32, 1996) sem usar DTT, que não reativa a ALAD de tilápia. Nos controles, a atividade de ALAD foi $2327 \pm 359 \mu\text{mol}$ de porfobilinogênio (PBG) por hora (Unidades) por litro de eritrócito para sangue e 374 ± 82 Unidades por kg de tecido para fígado. A dose in vivo que inibiu 50% de atividade de ALAD (IC50) foi 0,114mg/kg para sangue e 8,511mg/kg para fígado, indicando que a enzima de sangue é 75 vezes mais exposta que a enzima de fígado nesse peixe. O nível de chumbo no sangue (Pb-S) foi $276 \mu\text{g/L}$ com a dose de 1mg/kg, uma concentração de chumbo 2.42 vezes maior que o IC50 calculado, com uma total recuperação da atividade de ALAD depois de sete dias para sangue e somente dois dias para fígado. Em conclusão, esses resultados indicam que a atividade de ALAD de sangue de tilápias pode ser usada para monitorar chumbo e que é necessário determinar os valores normais porque DTT não reativa a ALAD desse peixe.

ABSTRACT

The lead is a metal with physical-chemical characteristics widely used in industry prompting its great dispersion in the environment. Lead causes some hematological effects in the biosynthesis of the Heme radical of hemoglobin inhibiting the enzyme 5 aminolevulinate dehydratase (ALAD; EC 2.4.1.24). This study is to evaluate the potential of tilapia (*Oreochromis niloticus*), which resists many adverse conditions and is being widely cultivated, for monitoring lead in aquatic environmental using ALAD as biomarker. Male tilapias weighing around 200g were obtained from a commercial breeder and up to three fish were acclimatized in plastic tanks filled with 40L of cellulose and activated charcoal filtered water with constant aeration. Fish were anesthetized with eugenol and were injected intraperitoneal with doses of 1, 10 and 100mg of lead acetate per kg of fish. After 24 hours, fish were anesthetized with eugenol, blood was collected by tail vein and liver was collected after sacrifice cutting spinal cord. ALAD activity was assayed in blood and liver homogenates by SAKAI method (Int. Arch. Occup. Environ. Health 68(2):126-32, 1996) without using DTT, which do not reactivates tilapia ALAD. In the controls, ALAD activity was $2327 \pm 359 \mu\text{mol}$ of porphobilinogen (PPG) per hour (Units) per liter of erythrocytes for blood and 374 ± 82 Units per kg of tissue for liver. The in vivo lead dose which inhibited 50% of ALAD activity (IC₅₀) was 0.114mg/kg for blood and 8.511mg/kg for liver, indicating that blood enzyme is 75 times more exposed than liver enzyme in this fish. The blood lead levels (Pb-S) was 276 $\mu\text{g/L}$ with 1mg/kg dose, a lead concentration 2.42 times bigger than the calculated IC₅₀, with a total recovery of ALAD activity after seven days for blood and just after two days for liver. In conclusion, these results indicate that blood ALAD activity of tilapias can be used for monitoring lead and that is necessary determining normal levels because DTT do not reactivate ALAD of this fish.

SUMÁRIO

ÍNDICES DE FIGURAS	ix
ÍNDICES DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
<i>Aspectos gerais.....</i>	<i>1</i>
<i>Fontes de Contaminação ambiental</i>	<i>1</i>
<i>Cinética do chumbo no ambiente</i>	<i>3</i>
1.1.1 Ar	3
1.1.2 Solo	4
1.1.3 Água	5
1.1.4 Biodegradação e degradação abiótica	6
<i>Cinética do chumbo no homem</i>	<i>7</i>
1.1.5 Absorção	7
1.1.6 Distribuição	7
1.1.7 Biotransformação e Eliminação	7
<i>Toxicodinâmica e principais sintomas no homem</i>	<i>8</i>
1.1.8 Sistema Hematopoiético	9
1.1.9 Outros efeitos	10
<i>A enzima Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ALAD) e os efeitos do chumbo</i>	<i>11</i>
<i>Toxicocinética do chumbo no ecossistema aquático</i>	<i>12</i>
<i>Toxicodinâmica do chumbo em peixes</i>	<i>13</i>
<i>Utilização de Indicadores Biológicos na Exposição ao Chumbo.....</i>	<i>14</i>
1.1.10 Indicadores de dose interna.....	15
1.1.11 Indicadores de efeito	15
1.1.12 Indicadores de Susceptibilidade	15
1.1.13 Bioindicadores	16
<i>Estabelecimento da Oreochromis niloticus Linneaus (Tilápia) como bioindicador em contaminações ambientais por chumbo</i>	<i>16</i>
2 OBJETIVOS	18
<i>Objetivo geral</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>18</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
<i>Material.....</i>	<i>19</i>
3.1.1 Reagentes	19
3.1.2 Equipamentos	19
3.1.3 Animais	19

<i>Métodos</i>	20
3.1.4 Lavagem e descontaminação da vidraria	20
3.1.5 Exposição	20
3.1.6 Coleta dos Tecidos	20
3.1.7 Determinação da atividade de ALAD	22
4 RESULTADOS	23
<i>Padronização da coleta do sangue de tilápia</i>	23
<i>Padronização da determinação de ALAD em sangue e fígado de tilápia</i>	24
<i>Exposição de tilápias a diferentes concentrações de acetato de chumbo</i>	26
<i>Cinética da atividade da ALAD de sangue e fígado de tilápias</i>	30
<i>Níveis de chumbo no sangue (Pb-S)</i>	31
5 DISCUSSÃO	32
<i>Padronização dos métodos</i>	32
<i>Efeitos da exposição intraperitoneal de acetato de chumbo nos níveis de ALAD de sangue e fígado de tilápias</i>	37
<i>Recuperação da atividade da ALAD de sangue e fígado de tilápia depois da exposição ao chumbo</i>	39
6 CONCLUSÕES	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1 – O chumbo atmosférico na contaminação global do ambiente e seu transporte para o organismo humano (adaptado de GALVÃO e COREY, 1989) .	3
Figura 2 - Biossíntese do Heme	10
Figura 3 Complexidade dos Indicadores Biológicos.....	14
Figura 4 - Características anatômicas da tilápia	21
Figura 5 - Sistema de manutenção e exposição dos peixes	21
Figura 6 - Biometria dos animais usados para os testes iniciais de determinação de ALAD em sangue de tilápias	25
Figura 7 - Biometria das tilápias usadas para os testes de exposição a diferentes concentrações de acetato de chumbo.	26
Figura 8 – Efeito da exposição ao chumbo no consumo de ração por peixes	27
Figura 9 - Cálculo do IC50 - 24 horas <i>in vivo</i> para ALAD de sangue e de fígado de tilápias expostas ao acetato de chumbo	29
Figura 10 - Recuperação da atividade de ALAD de tilápias depois da exposição ao acetato de chumbo	30

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de chumbo dissolvido em rios considerados não-contaminados	6
Tabela 2 Concentração de chumbo em picomolar (pg/L) em águas de oceano	6
Tabela 3 - Níveis de ALAD em sangue de voluntários humanos sadios em função da concentração de heparina como anticoagulante.	23
Tabela 4 - Determinação de ALAD em sangue e fígado de tilápias expostas ao acetato de chumbo	25
Tabela 5 - Inibição <i>in vitro</i> de ALAD de sangue de tilápia por chumbo	26
Tabela 6 - Dados individuais da exposição de tilápias a diferentes concentrações de acetato de chumbo	28
Tabela 7 - Memória de cálculo dos valores do IC50 - 24 horas.	29
Tabela 8 - Dados individuais da recuperação da atividade de ALAD de tilápias depois da exposição ao acetato de chumbo	30
Tabela 9 - Níveis de chumbo no sangue (Pb-S) de tilápias expostas ao acetato de chumbo via intraperitoneal.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH	American Conference of Governamental Industrial Hygiene
ALA	Ácido delta aminolevulínico
ALAD	Ácido delta aminolevulínico desidratase
ALA-P	Ácido delta aminolevulínico plasmático
ALA-U	Ácido delta aminolevulínico urinário
CEUA	Comitê de ética No Uso de Animais
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EP	Protoporfirina Eritrocitária
FEE	Fonte de Emissão Estacionária
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-transferase
HNO ₃	Ácido Nítrico
Ht	Hematócrito
IARC	International Agency for Research of Cancer
IC50	Concentração Inibitória 50%
Kd	Kilodalton
PBG	Porfobilinogênio
Pb-P	Chumbo Plasmático
Pb-S	Chumbo Sangüíneo
Pb-U	Chumbo Urinário
pH	Potencial Hidrogeniônico
SH	Grupamento Sulfidrila
TCA	Ácido Tricloroacético
ZPP	Zincoprotoporfirina

1 INTRODUÇÃO

Aspectos gerais

O chumbo é um metal de cor cinza-azulado maleável, com ponto de fusão em 327,5°C. É altamente resistente a corrosão, mas é bastante solúvel em altas concentrações de ácidos nítricos e sulfúricos. Sua valência usual é +2, sendo encontrado na natureza com número atômico equivalente a 82 e quatro formas isotópicas (208, 207, 206, 204) com massa atômica média de 207,2. É um metal que possui alta densidade (11,3g/cm³), sendo relativamente abundante na natureza. Em contato com o ar o chumbo oxida-se, recobrando-se com uma película descorada de óxido de chumbo. A oxidação é mais rápida por aquecimento e dá origem a diversos tipos de óxidos tais como o massicote, o litargírio e o mírio. Essas características reunidas o tornam um metal ideal para uma série de processos industriais (SKERFVING, 1993; IPCS, 1995; PEIXOTO e MARTINS, 1996).

Historicamente o chumbo é reconhecido como o metal tóxico mais antigo e o que causa mais efeitos adversos à saúde do homem. Devido à rápida industrialização na segunda metade do século passado e às características físico-químicas do chumbo, como maleabilidade, resistência à corrosão entre outros, houve uma larga utilização desse metal em uma variedade de processos industriais o que tornou a exposição ao chumbo um importante problema para a Saúde Pública (NEEDLEMAN, 1980).

Fontes de Contaminação ambiental

Processos naturais e antropogênicos podem ser responsáveis pela liberação de chumbo no ambiente. Estima-se que as emissões naturais de chumbo para a atmosfera são provenientes de erupções vulcânicas, desgaste geológico e poeiras dispersas pelo vento. Entretanto, frente às grandes emissões feitas pelo homem, as vias naturais são de menor importância. A dispersão antropogênica do chumbo teve início há mais de 5.000 anos e, com a atual mobilização e utilização de chumbo pelo homem, a circulação do metal na biosfera é da ordem de 1.160.000 toneladas (ATSDR, 2007).

As atividades de mineração e fundição do chumbo primário, oriundo do minério, e secundário, oriundo da recuperação de sucatas ou baterias, constituem importantes fontes emissoras de chumbo. O impacto das atividades de mineração e fundição pode persistir por longo período no ambiente. Emissões atmosféricas de chumbo resultantes de operações de mineração e metalurgia constituíram cerca de 22% de todas as fontes antropogênicas do metal em 1983. Em 1984, a combustão da

gasolina contendo chumbo foi responsável por aproximadamente 90% do total de emissões. Em 1988 esta porcentagem diminuiu para 34% das emissões anuais de chumbo. Com as medidas restritivas em relação ao uso do chumbo na gasolina na década de 90 em alguns países, essa quantidade diminuiu ainda mais. Embora a combustão do chumbo na gasolina ainda seja uma fonte de liberação do metal na atmosfera em alguns lugares, liberações industriais no solo e na água proveniente de fundições de metais, fábricas de baterias e indústrias químicas são hoje os maiores contribuintes para o chumbo total liberado (IPCS, 1995; WHO, 1995; ATSDR, 2007).

Essas atividades industriais são freqüentemente realizadas em locais próximos a residências, aumentando os níveis ambientais de chumbo e expondo a população residente na circunvizinhança da fonte de emissão estacionária (FEE) a efeitos nocivos no organismo, especialmente no caso de crianças, que são mais sensíveis à contaminação (GALVÃO e COREY, 1989).

Atualmente, nos países considerados desenvolvidos, a existência de normas e programas de vigilância médica contribuiu para a sensível diminuição dos índices de exposição humana ao chumbo e, conseqüentemente, da degradação ambiental causada por esse metal. Isso se deve a fatores como a substituição da gasolina aditivada, a diminuição do uso de soldas em embalagens de alimentos enlatados, o controle da água potável e das emissões industriais, entre outros. Nos países em desenvolvimento, a falta de programas de controle das emissões e de uma vigilância apropriada, bem como a existência de diversas atividades artesanais de utilização do chumbo secundário, como a recuperação de baterias chumbo-ácida, a exposição ao chumbo ainda é um grande problema de Saúde Pública (MATTE, FIGUEROA, OSTROWSKI *et al.*, 1989; ROMIEU, LACASANA e McCONNELL, 1997; TONG, SCHIRNDING e PRAPAMONTOL, 2000).

Em uma revisão, Paoliello e Capitani (2007) discutiram diversos estudos de exposições humanas ao chumbo no Brasil. Esse trabalho revelou que, embora a exposição ocasionada através de fábricas de baterias e/ou de reciclagem sejam importantes, uma grande maioria de ocorrências de exposição ao chumbo, que nem sempre são notificadas, são oriundas de pigmentos, cerâmicas e, principalmente, de pequenas fábricas de fundição e de recuperação de baterias, que muitas vezes conduzem suas atividades em locais residenciais e sem nenhum tipo de condições para exercer esse tipo de função. O autor revela, ainda, a inadequação da legislação reguladora corrente no Brasil que estabelece um valor de chumbo em sangue (Pb-S) da ordem de 60µg/dL de sangue como um limite seguro para trabalhadores expostos

ocupacionalmente ao chumbo enquanto que a American Conference of Governmental Industrial Hygiene (ACGIH) estabelece um limite de $30\mu\text{g}/\text{dL}$.

Cinética do chumbo no ambiente

O chumbo é um elemento de ocorrência natural na crosta terrestre e é registrado em todos os compartimentos ambientais. A Figura 1 ilustra a cinética do chumbo no ambiente bem como a absorção do metal pelo ecossistema ou pelo homem.

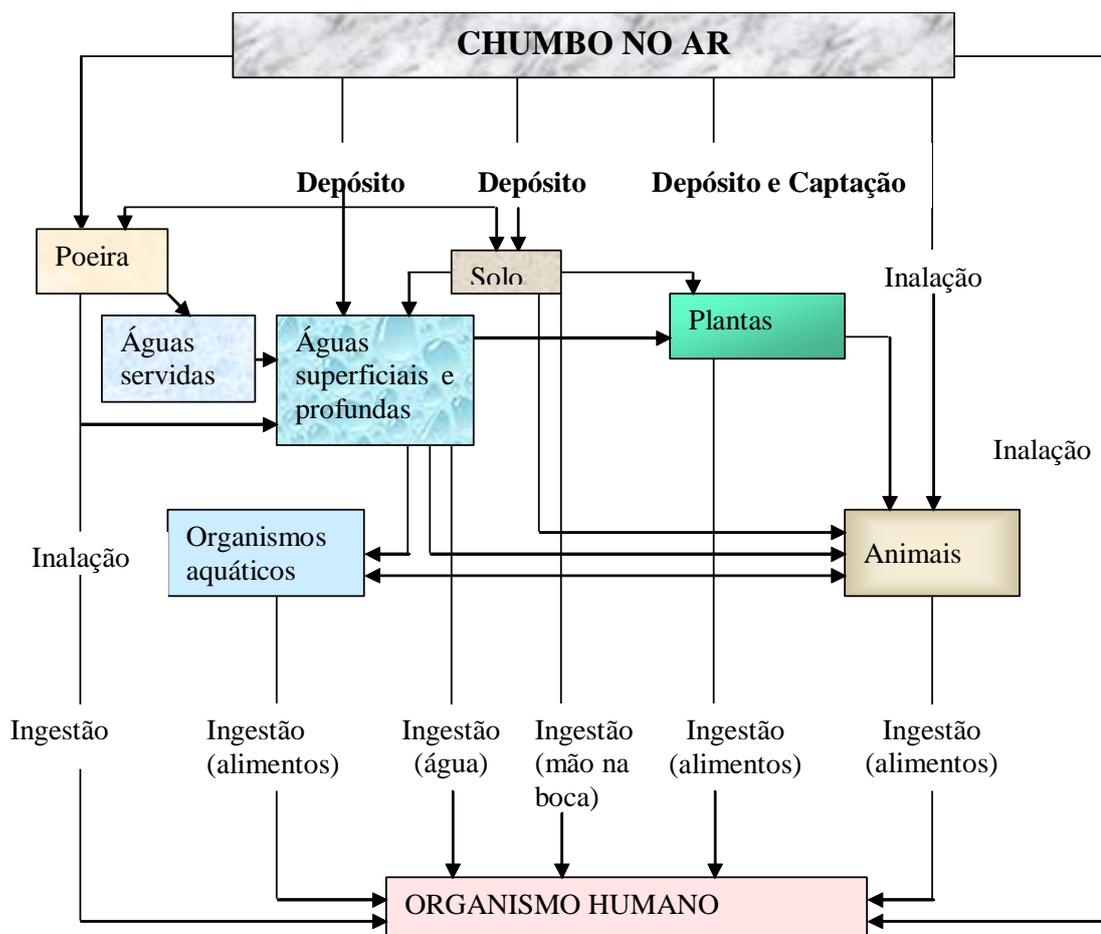


Figura 1 – O chumbo atmosférico na contaminação global do ambiente e seu transporte para o organismo humano (adaptado de GALVÃO e COREY, 1989).

1.1.1 Ar

O maior volume dos compostos orgânicos do chumbo lançados na atmosfera resulta de processos industriais, tais como o refinamento do chumbo primário e secundário. Na atmosfera o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas do ar podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição seca ou úmida. Cerca de 40 a 70% da

deposição do chumbo ocorre por deposição úmida, dependendo de fatores como localização geográfica, nível de emissão na área e índices pluviométricos, sendo essa forma de deposição mais significativa que a seca para a remoção do metal da atmosfera (WHO, 1995; PAOLIELLO e CHASIN, 2001; ATSDR, 2007).

O tamanho da partícula constitui um fator importante na determinação do transporte atmosférico do metal. Partículas grandes, com diâmetro superior 2 μ m, precipitam da atmosfera rapidamente e são depositadas relativamente próximas às fontes de emissão enquanto que partículas pequenas podem ser transportadas para muitos quilômetros de distância (PAOLIELLO e CHASIN, 2001; ATSDR, 2007).

O chumbo presente no ar pode ainda se sedimentar associando-se à poeira que se encontra nas residências. Visto que o chumbo não se biodegrada, quando esse se encontra associado à poeira, se deposita tornando-se uma fonte de exposição à longo prazo. Dessa forma, a poeira torna-se um vetor, isso é, a poeira se deposita sobre a superfície de alimentos (vegetais e frutas), brinquedos (crianças os conduzem a boca) e móveis, tornando-se dessa forma um veículo para a entrada de chumbo no organismo (LANDRIGAN, GEHLBACH e ROSENBLUM, 1975; QUITÉRIO, VAITSMAN, SILVA *et al.*, 2001).

1.1.2 Solo

O teor de chumbo no solo é muito influenciado por atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar. O acúmulo de chumbo no solo ocorre principalmente em função da taxa de deposição (seca ou úmida) da atmosfera. Vários fatores irão interferir na disponibilidade do metal, e, conseqüentemente, no transporte do chumbo para o interior do solo ou para a água, tais como: pH, composição mineral do solo, quantidade de matéria orgânica, entre outros. O chumbo é fortemente adsorvido à matéria orgânica e pouco sujeito à lixiviação. Quanto maior o pH mais adsorvido ao solo estará o chumbo. Assim, a lixiviação do metal puro para a água é muito lenta na maioria das condições naturais, exceto em situações de elevada acidez, como chuva ácida, onde a solução de líxívia diminui o pH aumentando a disponibilidade do metal. O metal pode, ainda, entrar no compartimento aquático como um resultado da erosão do solo contaminado. Os níveis naturais de chumbo em solos rurais são, normalmente, menores que 30ppm. Entretanto, nos arredores de grandes cidades, áreas próximas à fundições e rodovias com alto tráfego, as concentrações do metal no solo podem exceder a 10.000ppm. (WHO, 1995; PAOLIELLO e CHASIN, 2001; ATSDR, 2007).

1.1.3 Água

Após a deposição do chumbo na água, proveniente de deposição seca, úmida, da lixiviação do solo ou do despejo direto de contaminantes, o metal se divide rapidamente entre o sedimento e a fase aquosa. Isso irá depender de fatores tais como: o pH da água e dos sais dissolvidos nela e a presença de agentes complexantes orgânicos. Na água o chumbo pode se encontrar numa forma complexada com compostos orgânicos naturais, como ácidos húmicos ou fúlvicos, ou na forma de compostos de origem antropogênica, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (ATSDR, 2007).

A utilização de fertilizantes na agricultura que não se aderem ao solo e que contenham metais pode levar a um aumento contínuo das concentrações de chumbo em lençóis freáticos (ADEYEYE, AKINYUGHA, FESOB I *et al.*, 1996).

A especiação do chumbo pode se apresentar em diferentes formas na água doce e na água do mar. Em água doce o chumbo pode se apresentar como um cátion divalente (Pb^{++}) em pH abaixo de 7,5 ou na forma de complexos com carbonatos dissolvidos ($PbCO_3$) em pH alcalino. Mesmo pequenas concentrações de carbonatos oriundos da dissolução do CO_2 da atmosfera são suficientes para manter a concentração de chumbo nos rios no limite de solubilidade que é de cerca de $500\mu g/L$ (ATSDR, 2007).

O cloreto de chumbo e o carbonato de chumbo são os complexos mais formados nas águas do mar. A especiação do chumbo na água depende da presença de outros ligantes. Sabe-se que o chumbo forma complexos com o ácido húmico e com outros tipos de matéria orgânica. Os complexos orgânicos de chumbo são estáveis em pH 3 com crescente afinidade a pH mais baixo e decrescente afinidade com o aumento da dureza da água. No mar, a complexação e precipitação do chumbo com óxidos de Fe, Mn, argila e outros minerais aumenta com a redução do pH. A adsorção do chumbo em materiais particulados nas águas doces ou estuarinas é um importante processo de remoção desse metal do compartimento aquático (ATSDR 2007).

A Tabela 1 apresenta concentrações de chumbo obtidas em rios de diversas partes do mundo considerados não-contaminados. Os níveis de chumbo em oceanos são muito baixos e não se afetam diretamente por fontes significativas de emissão do metal. As concentrações de chumbo no oceano pacífico norte são inferiores às concentrações no Atlântico norte, conforme indica a Tabela 2.

Tabela 1 - Concentrações de chumbo dissolvido em rios considerados não-contaminados.

Sistema	Pb ng/L
Correntes montanhosas, Califórnia	1 a 24
Rio Manuherikia, Nova Zelândia	20 a 30
Valor de fundo (sedimento)	200
Média mundial	1.000

Fonte: adaptado de PAOLIELLO e CAPITANI 2003.

Tabela 2 - Concentração de chumbo em picomolar (pg/L) em águas de oceano.

Sistema	Águas superficiais	Águas profundas
Pacífico Norte	3 a 10	0,6 a 1,2
Atlântico Norte	20 a 30	4

Fonte: adaptado de PAOLIELLO e CAPITANI 2003.

1.1.4 Biodegradação e degradação abiótica

Uma vez lançado no ambiente, o chumbo pode ser transformado de uma espécie inorgânica para outra, ou de um tamanho de partícula para outro. Entretanto, como elemento não está sujeito à degradação. A transformação do chumbo inorgânico para o chumbo tetrametilado tem sido observada em sistemas aquáticos, particularmente nos sedimentos. Alguns autores postulam a biometilação, enquanto outros afirmam que esse processo é independente da presença de bactérias. Ainda não está claro se o chumbo tetrametilado formado é produzido abioticamente ou pela biota (WHO, 1995).

Cinética do chumbo no homem

1.1.5 Absorção

As principais vias de absorção do chumbo são o trato gastrointestinal e o sistema respiratório. A Figura 1 apresenta os principais aspectos da absorção do chumbo. A absorção pela via respiratória é afetada por condições como o tamanho da partícula ou a quantidade de ar inalado por dia. Partículas com tamanho de 5µm ou maior são depositadas no trato respiratório superior, englobadas pelo mecanismo mucociliar e deglutidas. Partículas com tamanho de 1µm ou inferior são depositadas na região alveolar, onde mais tarde serão absorvidas. Na via gastrointestinal, a absorção do chumbo ocorre através do mecanismo de absorção do cálcio. Nos adultos a taxa de absorção atinge cerca de 10% do total ingerido, enquanto que nas crianças esta taxa se eleva a 40% (SKERFVING, 1993).

1.1.6 Distribuição

A distribuição do chumbo é inicialmente dependente da taxa de liberação do metal através do fluxo sanguíneo para os órgãos. Uma subsequente redistribuição pode ocorrer, baseada na relativa afinidade dos tecidos pelo metal e da toxicodinâmica deste nos locais (ATSDR, 2007).

O chumbo absorvido chega à circulação sanguínea e será transportado através do plasma, onde se equilibra rapidamente com o fluido extracelular, ligado à proteínas plasmáticas, como a albumina. Do sangue o chumbo distribui-se para os tecidos moles e órgãos como o fígado e os rins. Este metal pode atravessar a barreira hematoencefálica, mas sua distribuição no sistema nervoso é irregular, concentrando-se em altos níveis no hipocampo e nas amígdalas. Após serem distribuídas pelos órgãos, as partículas de chumbo migram novamente para o plasma e se depositam no esqueleto, que constitui o principal compartimento de armazenamento (cerca de 90%) (SKERFVING, 1993).

1.1.7 Biotransformação e Eliminação

O íon chumbo não sofre metabolização ou biotransformação, mas forma complexos com proteínas, aminoácidos e tióis não-proteicos. Um desses complexos se forma no fígado com a conjugação do chumbo iônico com a glutathione (GSH), através de reações do tipo II, catalisada pela glutathione S-transferase (GST). Os compostos alquílicos de chumbo são ativamente metabolizados no fígado por desalquilação oxidativa catalisada pelo citocromo P-450 (HABIG, PABST, FLEISCHNER *et al.*, 1974; MOSER, OBERLEY, DAGGETT *et al.*, 1995).

As principais rotas de eliminação do chumbo são as fezes e a urina. A excreção pela urina se dá através da filtração glomerular, podendo ocorrer pequena reabsorção. O chumbo também é excretado pela bile e pelo suco pancreático seguindo para as fezes na forma de um complexo chumbo-glutation (SKERFVING, 1993).

Toxicodinâmica e principais sintomas no homem

O chumbo pode afetar uma série de sistemas cujos efeitos serão dependentes do nível e do tempo de exposição. A toxicidade está relacionada com quatro sistemas: hematopoiético, nervoso, renal e gastrointestinal além de efeitos cardiovasculares, mutagênicos e carcinogênicos. A diversidade de sistemas afetados gera uma vasta gama de sintomas que, reunidos, levam a um estado patológico denominado Saturnismo. O Saturnismo é uma doença de notificação compulsória arrolada nas listas de doenças profissionais. Seus principais sintomas se manifestam como dores intestinais que podem evoluir para dores abdominais acentuadas, gastrites e até úlceras. Outros sintomas podem ser mal-estar, insônia, perda de apetite, agitação, alucinações, vertigens, manias, confusão e por vezes o delírio (SKERFVING, 1993; PEIXOTO e MARTINS, 1996).

A exposição ao chumbo pode, por exemplo, causar danos ao sistema nervoso periférico, podendo, em raros casos, levar à uma neuropatia motora periférica com conseqüente paralisia. Isso se deve, principalmente, à desmielinização dos neurônios e à degeneração axonal. Mesmo casos onde essas neuropatias não são evidentes, um exame neurofisiológico pode revelar distúrbios na velocidade de condução motora e anormalidades eletromiográficas. É comum também haver dores nas extremidades, principalmente artralgia. Essas neuropatias são consideradas o princípio da patologia do chumbo e esses danos parecem ser parcialmente reversíveis (SKERFVING, 1993).

A exposição ao chumbo pode, ainda, causar um quadro patológico conhecido como encefalopatia. Isso ocorre, principalmente, em crianças com altos níveis de exposição (80µg/dl), mas pode, também, acometer adultos (CASARETT & DOULL'S, 1991).

1.1.8 Sistema Hematopoiético

O chumbo apresenta múltiplos efeitos hematológicos inibindo várias enzimas associadas à biossíntese do Heme, bloqueando a capacidade do organismo de produzir hemoglobina e afetando a morfologia eritrocitária. Esses efeitos são observados tanto em homens como em animais (MUSHAK, DAVIS, CROCETTI *et al.*, 1989; TERAYAMA, 1993).

A manifestação clínica e sintomática da exposição crônica do chumbo é a anemia microcítica e hipocrômica, induzida pelos danos no sistema hematológico em níveis de Pb-S acima de 40µg/dl. A relação dose-resposta entre níveis de Pb-S e hematócrito sugere que em crianças o limiar para esse efeito pode ser menor que 10µg/dl. (PIOMELLI, SIAMAN, ZULLOW *et al.*, 1982; SCHWARTZ, LANDRIGAN, BAKER JUNIOR *et al.*, 1990; CDC, 1991; JACOB, RITZ, HEINRICH *et al.*, 2000).

A biossíntese do Heme é feita à partir de oito moléculas de succinil coenzima A provenientes do ciclo do ácido cítrico e oito moléculas de glicina, formando o primeiro intermediário no interior da mitocôndria: o ácido delta aminolevulínico (ALA). Essa fase é catalisada pela ALA sintetase, que parece ser a enzima controladora da velocidade da síntese de porfirinas no fígado dos mamíferos. Posteriormente, no citoplasma, duas moléculas de ALA são condensadas pela enzima ALA desidratase formando porfobilinogênio (PBG). O PBG formado, depois de uma série de reações enzimáticas, vai gerar um núcleo tetra-pirrólico no interior da mitocôndria, que se une ao ferro formando o grupo Heme e que, juntamente com a globina, formará a hemoglobina (Figura 2).

O chumbo possui uma afinidade pelos grupos tióis oxidando-os e levando à inibição de várias enzimas de síntese do grupo Heme. O efeito mais sensível da exposição ao chumbo é a inibição da enzima ALAD, tendo como consequência um aumento significativo do nível de ALA no sangue, além de causar uma diminuição da meia vida da hemácia por um aumento da fragilidade eritrocitária. Existe também uma inibição da enzima coproporfirinogênio oxidase, resultando em um acúmulo de coproporfirina. A enzima ferroquelatase que catalisa a inserção do ferro na protoporfirina IX é também sensível ao chumbo e um decréscimo na atividade desta enzima resulta em um aumento de protoporfirina eritrocitária (EP) nas células vermelhas. Na ausência de ferro na hemoglobina, ocorre a inserção do zinco no centro da molécula, ocupando o lugar usualmente ocupado pelo ferro, formando assim a Zincoprotoporfirina (ZPP). Como consequência desta desordem há um aumento significativo no nível de ALA no sangue e na urina (JOHN, 1990; ATSDR 2007).

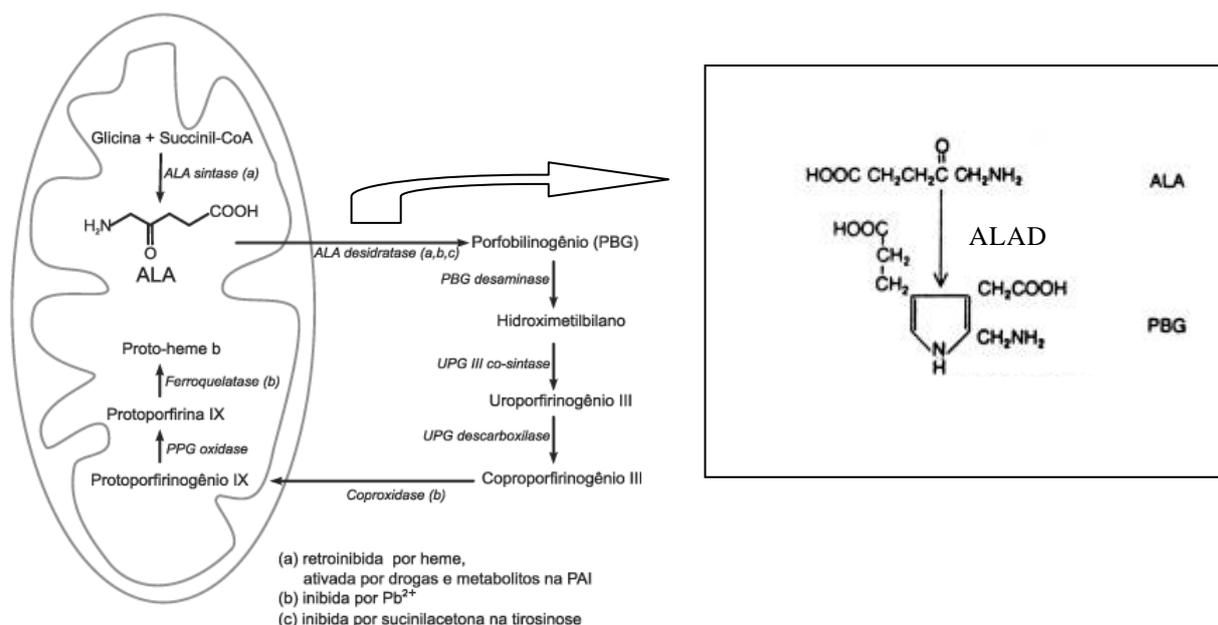


Figura 2 - Biossíntese do Heme.

Fonte: adaptado de DUTRA e BECHARA, 2005.

Um importante aspecto que deve ser levado em consideração em relação aos efeitos hematológicos é a reversibilidade de algumas destas alterações bioquímicas e funcionais induzidas pela exposição ao chumbo, que podem ser consideradas apenas como alterações homeostáticas reversíveis (SKERFVING, 1993).

1.1.9 Outros efeitos

Estudos realizados em animais de experimentação com o chumbo inorgânico com altas doses induziram o aparecimento de tumores no rim e no cérebro, levando à classificação do chumbo como um possível agente carcinogênico para humanos, embora estudos epidemiológicos realizados em trabalhadores expostos não comprovem esses dados (SKERFVING, 1993).

Alguns autores relatam um significativo aumento na frequência de aberrações cromossômicas, mas, em geral, experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, para testes de genotoxicidade, incluem o chumbo como um agente não causador de efeitos, sendo essa discrepância associada às diferenças de técnicas utilizadas e à diferentes níveis de exposição (APOSTOLI, LEONE e PORRU 1989). Alguns estudos demonstram a capacidade do chumbo de aumentar a excreção urinária do ácido aminobutírico, indicando um efeito sobre o metabolismo da timina. Além disso, alguns efeitos associados a abortos podem ser considerados de origem genotóxica (SKERFVING, 1993).

Compostos de chumbo têm sido classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como possíveis agentes carcinógenos humanos, grau B1, podendo ser genotóxico. A genotoxicidade está relacionada à capacidade de uma determinada substância química alterar a estrutura do DNA celular, como resultado de uma ou mais alterações, incluindo mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas (CLAYSON, IVERSON, NERA *et al.*, 1991; IARC, 1996).

A enzima Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ALAD) e os efeitos do chumbo

A enzima ALAD é a segunda enzima da via de biossíntese e Heme. Pode ser encontrada em animais vertebrados e em bactérias plantas e animais invertebrados, sendo também precursora de moléculas de clorofila (ICES, 2004).

Na via de síntese do Heme, a atividade catalítica da ALAD é a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta aminolevulínico com a formação de uma molécula de porfobilinogênio, primeiro precursor do Heme, conforme mostrado na Figura 2. A ALAD é uma enzima com oito subunidades idênticas e com peso molecular de 280 Kd. Cada monômero possui dois sítios catalíticos em sua superfície. A cada sítio ligam-se uma molécula de substrato e um íon zinco. A enzima possui ainda um domínio de ligação para o zinco, fora do sítio ativo, importante para a estabilidade de sua estrutura quaternária (WETMUR, BISHOP, CANTELMO *et al.*, 1986; DENT, BEYERSMANN, BLOCK *et al.*, 1990; ERSKINE, NEWBOLD, BRINDLEY *et al.*, 2001).

A ALAD humana, em comum com todas as desidratases de mamíferos, é sensível ao oxigênio e exige uma elevada concentração de tióis exógenos para a manutenção da plena atividade catalítica. Esse requisito está relacionado com a presença de 32 grupos de tióis reativos por octâmero, quatro por subunidade (GIBBS, GORE e JORDAN, 1985).

Existe, ainda, uma condição hereditária, um polimorfismo genético, que interfere na atividade da ALAD colocando determinados indivíduos mais vulneráveis à ação do chumbo. Essa enzima possui dois alelos co-dominantes, ALAD-1 E ALAD-2. Um raro alelo ALAD-2 tem sido associado com altos níveis de Pb-S, aumentando assim o risco de toxicidade ao metal (ONALAJA e CLÁUDIO, 2000; KELADA, SHELTON, KAUFMANN *et al.*, 2001).

A atividade da ALAD em eritrócitos humanos tem sido utilizada como uma indicação altamente específica e sensível às exposições ao chumbo, uma vez que a enzima tem alta afinidade *in vivo* às baixas concentrações de chumbo no sangue. Essa inibição ocorre devido à substituição de Zn^{++} por Pb^{++} na ligação aos radicais SH do sítio de ligação ao cofator metálico (HERNBERG e NIKKANEN, 1970; HAEGER-ARONSEN, ABDULLA e FRISTEDT, 1971; GOERING, 1993).

Além de uma ação direta na redução da atividade enzimática, de acordo com Wigfield e Farant (1981) a ação do chumbo sobre a enzima ALAD nos eritrócitos pode ainda se manifestar através de uma mudança no pH ótimo para valores mais baixos, reduzindo indiretamente sua atividade.

A inibição da enzima ALAD é um sensível indicador de efeito, sendo utilizada como uma ferramenta fundamental no diagnóstico de exposições ao chumbo. A atividade de ALAD é determinada pela quantidade de PBG formado por unidade de tempo. A inibição pode ser demonstrada a níveis muito baixos de Pb-S ($10\mu\text{g/dL}$), que corresponde a um nível de efeito não detectado clinicamente e diretamente paralelo às alterações de chumbo em sangue.

Alguns autores sugerem a utilização de um “artifício tecnológico” nas análises de determinação da atividade desta enzima com o objetivo de averiguar a real causa da inibição da enzima. Esse artifício seria a inclusão de uma etapa de ativação da enzima por ação de algumas substâncias (DTT, zinco entre outras) que deslocam o chumbo dos grupos sulfidrila necessários para a atividade da enzima. A recuperação da atividade da ALAD é então utilizada como um indicador (MATTOS, 2001). Sakai, Yanagihara e Koichio (1980) foram os precursores dessa metodologia, encontrando resultados bastante significativos.

Toxicocinética do chumbo no ecossistema aquático

É reconhecido que a presença de metais, como o chumbo, rompem o delicado balanço dos sistemas aquáticos (ADEYEYE, AKINYUGHA, FESOBİ *et al.*, 1996). Em organismos aquáticos a captação e acúmulo do chumbo da água e sedimentos são influenciados por vários fatores ambientais como temperatura salinidade e pH, além do conteúdo dos ácidos húmicos e algínicos. Em sistemas aquáticos contaminados, uma pequena fração do chumbo está dissolvida na água, pois a maior parte do metal encontra-se fortemente ligada ao sedimento (WHO 1995; PAOLIELLO e CHASIN, 2001). Estudos revelam que o sedimento é o maior sítio repositório nos sistemas aquáticos enquanto influências alóctonas ou autóctonas podem levar a um aumento na

concentração do metal alta o suficiente para se ter uma significância ecológica (ADEYEYE, FESOBI, AKINYUGHA *et al.*, 1996).

É pouco provável que o chumbo afete plantas aquáticas nos níveis encontrados no ambiente em geral. Nos ecossistemas de invertebrados aquáticos, entretanto, algumas populações são mais sensíveis que outras e a estrutura da comunidade pode ser adversamente afetada pela contaminação por chumbo. A captação de chumbo por peixes somente alcança um equilíbrio após algumas semanas de exposição. O chumbo acumula-se em tecidos como brânquias, fígado, rins e ossos. Os ovos dos peixes mostram um aumento dos níveis de chumbo com o aumento da concentração de exposição. As concentrações em alguns peixes marinhos são mais altas em brânquias e peles do que em outros tecidos, mas isto pode ocorrer em grande parte devido à adsorção. Os níveis no fígado aumentam significativamente com a idade (WHO, 1995; PAOLIELLO e CHASIN, 2001).

A bioacumulação e magnificação são capazes de levar à níveis tóxicos dos metais em peixes, mesmo em baixas concentrações. Peixes são notórios por bioacumular metais em diversos órgãos, afetando diversos sistemas, entre eles o hematopoiético (ADEYEYE, FESOBI, AKINYUGHA *et al.*, 1996).

Toxicodinâmica do chumbo em peixes

A exposição de peixes ao chumbo é constante e amplamente distribuída sendo reconhecidos vários efeitos adversos. Esse metal é capaz de causar mortalidade bem como mudanças sub-letais na reprodução, crescimento e comportamento. Podem ainda ocorrer outros sintomas de toxicidade, que incluem atrofia muscular, lordo-escoliose, paralisia, caudas negras, degeneração da nadadeira caudal, hiperatividade, natação errática e perda de equilíbrio (BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL, 1998).

Alves, Glover e Wood (2006) encontrou leves distúrbios fisiológicos em trutas juvenis alimentadas com uma dieta contendo até 520µg de chumbo/g de ração durante 21 dias. Esses distúrbios incluíram a redução nas taxas de Mg^{2+} e Ca^{2+} no plasma e o aumento corpóreo das taxas de influxo de Na^{+} . Em um outro experimento, traíras expostas ao chumbo através da alimentação mostraram fortes evidências de dano genético na porção inicial do rim, como quebras de cromátides, fragmentação de cromossomos e inversões pericêntricas. De acordo com os autores a frequência de aberrações cromossomiais aumentou ao longo da dieta, evidenciando-se danos ao DNA nas células sanguíneas pelo ensaio do cometa (CESTARI, LEMOS, RIBEIRO *et al.*, 2004).

O acúmulo do ALA, substrato da ALAD, pode causar dano oxidativo em virtude da produção de espécies reativas de oxigênio. (DEMASI, PENATTI, DELUCIA *et al.*, 1996; COSTA, MELA, ASSIS *et al.*, 2007)

O ICES (2004) aponta diversos trabalhos de utilização da ALAD na investigação de efeitos tóxicos do chumbo em diversas espécies de peixes, como por exemplo: truta (HODSON, 1976; HODSON *et al.*, 1977, 1978; ADDISON, FITZPATRICK e RENTON, 1990; BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL, 1998; SORDY & OSTERLAND, 1990 apud ICES, 2004), linguado (BOGOVSKI, *et al.*, 1998 apud ICES, 2004) e carpa (NAKAGAWA *et al.*, 1997b apud ICES, 2004).

Utilização de Indicadores Biológicos na Exposição ao Chumbo

Indicadores biológicos são ferramentas de fundamental importância na avaliação dos danos causados pela exposição à substâncias químicas (AITIO e KALLIO, 1999).

Indicadores biológicos nas pesquisas ecotoxicológicas, pois fornecem informações das funções de espécies receptoras, demonstrando uma exposição ambiental a estressores que pode ser relacionada como efeitos adversos das atividades humanas (ADAMS, GIESY e TREMBLAY, 2001). Os indicadores biológicos podem se subdividir em diversas classes e subtipos podendo variar quanto à complexidade como demonstrado na Figura 3.

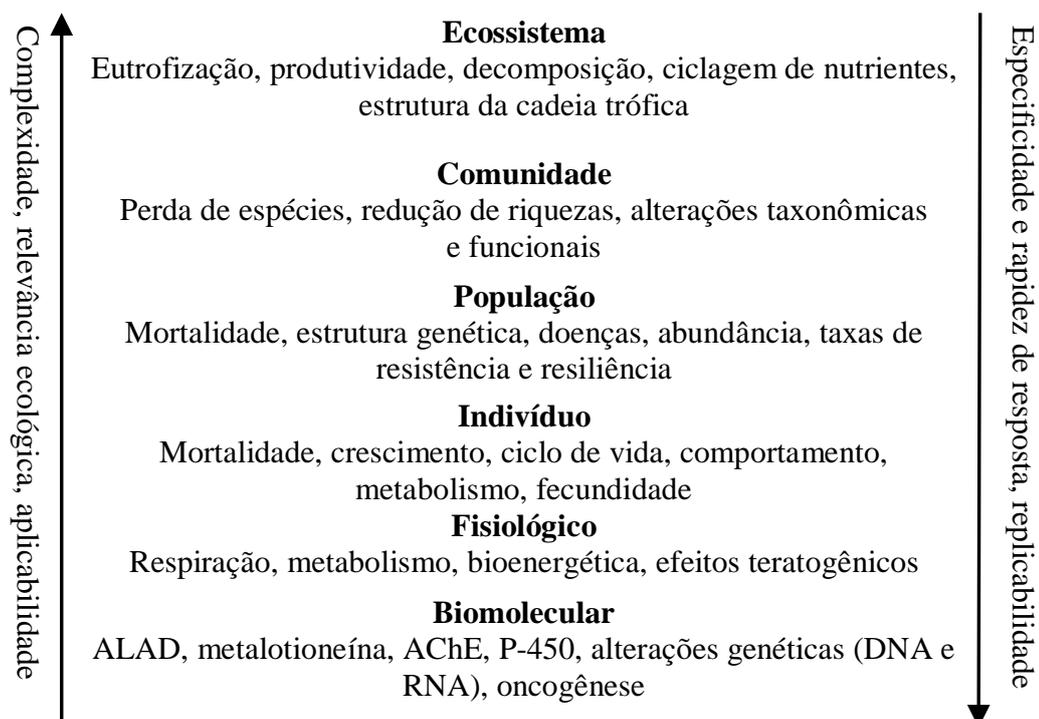


Figura 3 - Complexidade dos Indicadores Biológicos.

1.1.10 Indicadores de dose interna

Os indicadores de dose interna são indicadores que representam a medição da substância ou de seus metabólitos na própria matriz biológica, sendo os mais comumente utilizados as concentrações de chumbo em sangue (Pb-S), na urina (Pb-U) entre outros (MAHAFFEY, McKINNEY e REIGART, 2000).

As concentrações de Pb-S refletem a dose de chumbo absorvido, contudo a interpretação de seus níveis depende do conhecimento da história passada da exposição ao chumbo, sendo um bom indicador apenas para exposições recentes. Já os níveis de Pb-U têm sido usados como indicador de dose interna para exposições contínuas, particularmente no monitoramento biológico de exposições ocupacionais (SCHÜTZ, SKERFVING, RANSTAN *et al.*, 1987; SKERFVING, 1993; SAKAI e MORITA, 1996).

1.1.11 Indicadores de efeito

Os indicadores de efeito refletem alterações bioquímicas, fisiológicas ou estruturais, provenientes da interação entre a substância e o organismo e evidenciam, com mais clareza, a relação exposição X doença. O seu uso na avaliação da exposição às substâncias químicas vem crescendo bastante, pois estes indicadores podem servir, em alguns casos, como indicadores de dose interna por se relacionarem diretamente com a exposição e não somente com o efeito (LOWRY, 1995; MAHAFFEY, McKINNEY e REIGART, 2000).

Os indicadores de efeito mais comumente utilizados para quantificação da exposição ao chumbo são a determinação da concentração do Ácido delta aminolevulínico na urina (ALA-U), no plasma (ALA-P), Zincoprotoporfirina (ZPP) e determinação da atividade da ALAD (MAHAFFEY, McKINNEY e REIGART, 2000).

1.1.12 Indicadores de Susceptibilidade

Atualmente, a maioria dos autores inclui em suas classificações uma nova classe, o indicador de susceptibilidade que se refere a limitações inerentes ou adquiridas do organismo que influenciam na sua habilidade de responder a mudanças de exposição a uma determinada substância alterando a resposta biológica e os efeitos individuais (SCHULTE, 1991; BERTAZZI, TOFFOLETTO e PESATORI, 2000).

1.1.13 Bioindicadores

No início dos estudos de monitorização ambiental, a maioria dos trabalhos consistia na avaliação de parâmetros físicos e químicos dos compartimentos. Desta forma eram rotineiras avaliações de variáveis como, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, nutrientes, quantificação do agente químico diretamente no compartimento entre outros. Tais avaliações, apesar de conterem importantes informações, não avaliavam o real impacto destes contaminantes na biota. Desta forma era necessário quantificar o verdadeiro efeito dos xenobióticos no ecossistema e para tanto se passou a analisar mudanças que por ventura ocorresse em um organismo, ou na população do compartimento ambiental (ADAMS, GIESY, TREMBLAY *et al.*, 2001).

O conceito de bioindicador é pouco preciso e pode ser entendido como entidades estruturais (espécie-sentinela) ou mudanças nos níveis de organização do ecossistema, isto é, entende-se como bioindicador a análise biológica de um único indivíduo do ecossistema ou da mudança de comportamento dos indivíduos de uma população. Para a análise biológica de um organismo, no caso um bioindicador, são avaliados diversos parâmetros, bioquímicos, celulares ou fisiológicos. Neste caso estes parâmetros são denominados indicadores de efeito do bioindicador uma vez que estas variáveis irão refletir alterações provenientes da interação entre o xenobiótico e o bioindicador (ADAMS, GIESY, TREMBLAY *et al.*, 2001).

Assim estudos que avaliem o impacto de xenobióticos, como o chumbo, no ambiente utilizando bioindicadores e quantificando o efeito deste impacto através de indicadores biológicos são importantes, pois podem representar a real contaminação, e servindo como ferramentas de monitorização ambiental (BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL, 1998).

Estabelecimento da *Oreochromis niloticus* Linnaeus (Tilápia) como bioindicador em contaminações ambientais por chumbo

Atualmente vêm ocorrendo uma rápida expansão do cultivo de peixes, especialmente em países de clima tropical. Esta expansão acontece visando uma alternativa alimentícia e uma contenção de pesca predatória, preservando a biodiversidade. Isto levou a um aumento da importância econômica de diversas espécies de peixes (GRAAF, VAN ZWIETEN, MACHIELS *et al.*, 2006; AL-SHAMSI, HAMZA e EL-SAYED, 2006).

Uma destas espécies trata-se da espécie *Oreochromis niloticus* Linneaus. Conhecida como a tilápia do Nilo, originária da África, é uma espécie de peixe cujo cultivo, bem como sua importância, vem crescendo, sendo atualmente uma das mais importantes aquaculturas do mundo atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. Esta espécie de tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a mais importante espécie de tilápia cultivada, representando mais de 80% da produção total de tilápia (MOUSA e MOUSA, 1999; AL-SHAMSI, HAMZA e EL-SAYED, 2006).

Esta espécie, que é primariamente, porém não estritamente herbívora, teve sua cultura favorecida em virtude de características como rápido crescimento, grande resistência às condições adversas e a doenças, adaptabilidade à diversos tipos de meios e ambientes, entre outros (CHARO-KARISA, KOMEN, REZK *et al.*, 2006; PONCE-MARBÁN, HERNÁNDEZ e GASCA-LEYVA, 2006).

Outra característica que torna vantajosa a criação de tilápia seria a capacidade deste animal obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica o que diminui o custo de manutenção per capita. Estudos demonstram que a tilápia possui uma grande resistência à ação de xenobióticos, podendo habitar diversos sítios possivelmente contaminados por metais pesados. Alguns trabalhos demonstraram ainda uma capacidade da tilápia em remover detritos e contaminantes orgânicos através de uma acumulação destes resíduos (PONCE-MARBÁN, HERNÁNDEZ e GASCA-LEYVA, 2006).

Estudos têm sido conduzidos na avaliação da resposta de espécies de tilápia a diferentes estressores objetivando sua utilização como espécie-sentinela. Van Dyk, Pieterse e Van Vuren (2007) em um trabalho com uma espécie de tilápia encontraram alterações na histologia hepática em exposições à metais como zinco e cádmio.

Em um outro estudo Wu e Deng (2006) avaliaram o impacto do cádmio nas funções hematológicas de tilápia, encontrando reduções na oxi-hemoglobina no grupo tratado.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo é determinar o potencial de uso da atividade da enzima ALAD de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento da contaminação da água pelo chumbo.

Objetivos específicos

1. Padronização de uma metodologia para dosagem de ALAD em sangue e fígado de tilápia.
 2. Efeitos da exposição de tilápia ao acetato de chumbo nos níveis de ALAD de fígado e sangue.
 3. Avaliação do tempo de recuperação da atividade de ALAD de tilápia exposta ao acetato de chumbo.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

Material

3.1.1 Reagentes

ALA cloridrato - Sigma-Aldrich A 3785; Ditioneitol - Sigma-Aldrich - D 5545; Cloreto de mercúrio - Sigma-Aldrich M 6529; Ácido tricloroacético - Sigma-Aldrich T 6399; Triton X-100 - Merck ou Sigma-Aldrich T 9284; Dimetilaminobenzaldeído - Merck; Heparina Sódica (5000UI) - Heptar Eugenol; Acetato de chumbo - Merck. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

3.1.2 Equipamentos

- ♦ Agitador de tubos tipo Vortex
- ♦ Banho-Maria
- ♦ Espectrofotômetro Shimadzu - UV visível, modelo UV 160A Duplo feixe.
- ♦ Centrífuga marca Hitachi
- ♦ Potenciômetro
- ♦ Pipetadores automáticos
- ♦ Vidraria de uso laboratorial.
- ♦ Homogeneizador Turrax
- ♦ Aerador

3.1.3 Animais

Para condução dos experimentos foram utilizados peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Figura 4), conhecida como tilápia, que são animais amplamente cultivados no Estado do Rio de Janeiro. Exemplares machos de tilápia foram obtidos na Fazenda Morro Grande, município de Guapimirim RJ, distante cerca de 100km do laboratório. Os animais, com pesos entre 150 e 200 gramas, foram aclimatados durante cerca de 24 horas em dornas de plástico previamente lavadas contendo 50 litros de água potável de abastecimento público previamente purificada pela passagem por filtro de celulose e carvão ativado (Figura 5). A água de cada dorna foi trocada a cada 24 horas. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob a licença nº L 0033/08.

Métodos

3.1.4 Lavagem e descontaminação da vidraria

As vidrarias utilizadas tanto no preparo dos reagentes quanto na realização dos ensaios foram lavadas em solução de detergente Extran 2% e deixadas de molho por 24 horas. Em seguida, foram cuidadosamente enxaguadas com água corrente e com água ultra-pura (MilliQ), para a retirada de todo o detergente. A vidraria foi então descontaminada em uma solução de ácido nítrico 10% por 48 horas, para retirada de qualquer traço de chumbo, pois o metal é solúvel neste ácido e, portanto, qualquer resíduo na vidraria será eliminado. Em seguida água ultra-pura (MilliQ) foi utilizada no enxágüe.

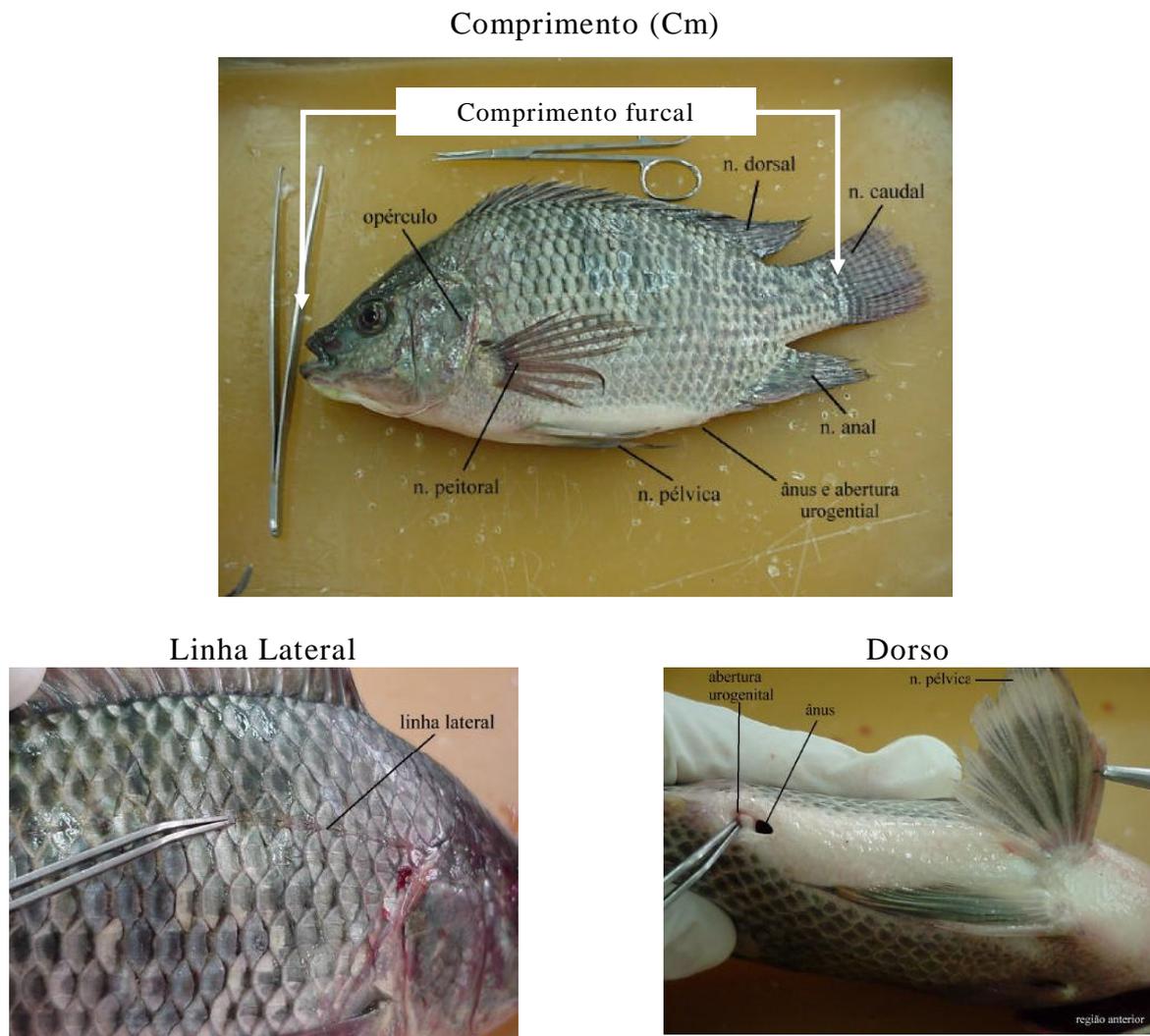
3.1.5 Exposição

Para exposição os animais foram inicialmente anestesiados em um recipiente contendo eugenol e água potável à concentração de 30µL/L (WATERSTRAT e PINKHAM 2005) a partir de uma solução de eugenol 50% (v/v) em etanol hidratado. Os peixes foram considerados anestesiados quando sua posição na água se tornou aleatória com prevalência da posição dorsal sem resposta a estímulos externos. Depois de pesados, os peixes foram expostos por uma injeção intraperitoneal, dose única, de diferentes concentrações de uma solução de acetato de chumbo em glicose 0,24M.

3.1.6 Coleta dos Tecidos

As matrizes biológicas coletadas foram o sangue e fígado dos peixes 24 horas após a exposição. Para a coleta de sangue, os peixes foram anestesiados com eugenol, conforme descrito anteriormente e puncionados através da veia caudal utilizando heparina como anticoagulante. Para a medida da concentração de Pb-S, uma alíquota do sangue foi acondicionada em tubos a vácuo. Para a coleta do fígado, os peixes foram sacrificados por secção da medula sendo medidos o peso e comprimento furcal¹, conforme descrito na Figura 4. Antes da homogeneização os fígados foram lavados em solução salina contendo 1U/mL de heparina retirando-se o excesso com papel de filtro antes da pesagem. Para o descarte os peixes foram depositados em sacos para resíduos biológicos e encaminhados para o lixo de resíduos biológicos da Fiocruz. As soluções contendo chumbo foram descartadas em uma bombona de rejeito químico para posterior incineração.

¹ Foi adotado como comprimento, todas as vezes que for mencionado, a definição descrita na Instrução normativa do IBAMA nº 53, de 22 de novembro de 2005 para o comprimento furcal.

Figura 4 - Características anatômicas da tilápia².**Figura 5** - Sistema de manutenção e exposição dos peixes.

² Bossolan, N.R.S., 2001. Atlas de Dissecção de Vertebrados, Instituto de Física de São Carlos - USP

3.1.7 Determinação da atividade de ALAD

A atividade enzimática da ALAD foi determinada seguindo-se o protocolo estabelecido pelo CESTEH tendo por base uma modificação do método de Sakai (SAKAI, YANAGIHARA e USHIO, 1980). Este protocolo envolve: (1) lise celular por Triton 0,1%; (2) reativação de uma alíquota da amostra por ditioneitol 50mM; (3) incubação por uma hora a 37°C na presença do substrato (ácido delta-aminolevulínico ALA 16mM); (4) paralisação da reação por adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,37M/ Cloreto de mercúrio (HgCl) 0,059M; (5) centrifugação, coleta do sobrenadante, adição de reativo de Erlich, leitura da absorvância a 555nm. Este protocolo foi utilizado recentemente na padronização de um micrométodo para sangue humano (SANTOS, 2004). Os resultados de atividade de ALAD sangüínea foram normalizados pelo valor do hematócrito. Os fígados foram homogeneizados em aparelho tipo *TURRAX* a 3000 rpm por dois minutos. O homogeneizado foi imediatamente centrifugado (4000g/10min/4°C) utilizando-se alíquotas do sobrenadante para a determinação da atividade de ALAD.

4 RESULTADOS

Padronização da coleta do sangue de tilápia

Para a padronização da concentração do anticoagulante, atividades de ALAD em sangue de voluntários humanos foram determinadas na presença de diferentes concentrações de heparina, conforme Tabela 3. A dispersão destes resultados, com coeficiente de variação (CV) de 11% para ambas as alíquotas inativadas e ativadas o que indica, claramente, que é possível usar qualquer das concentrações de heparina que foram testadas. Foi descartado os resultados do voluntário 1 por apresentar alto índice de recuperação o que pode indicar alguma patologia. Este teste foi necessário, pois a forma de coleta anteriormente padronizada para pacientes humanos usa tubos à vácuo para coleta de sangue especialmente tratados para determinações de metais (marca Vacutainer Metal-traço, tampa azul) que não podem ser usados na coleta de sangue de peixes. Optou-se, em função destes resultados, pelo uso de uma solução de heparina a 25U/mL em salina utilizada na proporção de 100 μ L por cada 900 μ L de sangue.

Tabela 3 - Níveis de ALAD em sangue de voluntários humanos sadios em função da concentração de heparina como anticoagulante.

CONDIÇÃO	ALAD Unid		%
	Inativada	Ativada	
Voluntário 1			
Vacutainer	1312	1935	48
850 μ L de Sangue + 150 μ L de Heparina Pura	1229	1757	43
850 μ L de Sangue + 150 μ L de Heparina 10%	1174	1693	44
875 μ L de Sangue + 125 μ L de Heparina 10%	1237	1696	37
Voluntário 2			
Vacutainer	1397	1727	24
900 μ L de Sangue + 100 μ L de Heparina 10%	1293	1565	21
925 μ L de Sangue + 75 μ L de Heparina 10%	1297	1621	25
Voluntário 3			
Vacutainer	1765	2153	22
900 μ L de Sangue + 100 μ L de Heparina 5%	1541	1844	20
900 μ L de Sangue + 100 μ L de Heparina 10%	1440	1840	28
900 μ L de Sangue + 100 μ L de Heparina 30%	1549	1824	18
MD	1385	1787	30
DP	176	162	11
CV%	13	9	37

ALAD Unid = Atividade de ALAD expressa em μ mol de porfobilinogênio por hora por litro de eritrócito corrigida pelo hematócrito; Inativada = ALAD Unid endógena; ALAD; Ativada = ALAD Unid reativada por DTT; % - Recuperação de ALAD Unid em relação à atividade endógena.

Optou-se, inicialmente pela coleta de sangue através da punção da artéria dorsal acessada pelo flanco do animal na altura da coluna vertebral, abaixo da linha lateral (Figura 4). Entretanto, verificou-se uma grande dificuldade no acesso e na obtenção de sangue por essa via, optando-se pela punção da veia caudal logo após o orifício anal (Figura 4).

A utilização de uma seringa de vidro com uma agulha de 25 x 0,8, normalmente empregada para a punção de veias humanas, levou ao rompimento da veia caudal e ao extravasamento do sangue para os tecidos, impedindo a coleta. Optou-se pelo uso de uma seringa de insulina (13 x 0,45), previamente lavada com a solução de heparina. Este procedimento garantiu maior precisão, a coleta de maiores quantidades de sangue e a eliminação da necessidade de lavagem da seringa, pois a mesma foi descartada ao final da coleta.

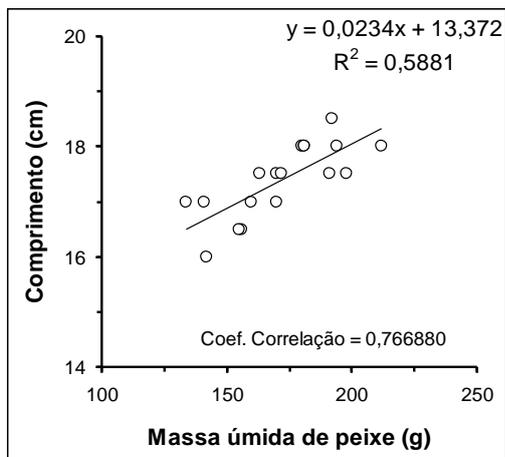
Todos os testes para a padronização da coleta de sangue foram realizados em animais não expostos, coletados e transportados como descrito anteriormente, tendo sido sacrificados, por secção da medula, cerca de 20 animais nesta etapa do trabalho.

Padronização da determinação de ALAD em sangue e fígado de tilápia

As medidas do comprimento e do peso úmido do peixe no momento do sacrifício estão descritas na Figura 6. A análise da relação massa-comprimento dos animais utilizados nesta etapa apresentou um coeficiente de correlação de 0,766880, que foi considerado satisfatório para amostras de tilápia vindas de um mesmo tanque de cultivo (PACKARD e BOARDMAN, 1999; SILVA FILHO, 2004). Com base nestes resultados, a relação massa/comprimento passou a ser usada como critério de homogeneidade de um grupo de animais a ser usado em um experimento.

A Tabela 4 descreve os resultados de um teste de inibição de ALAD de sangue e fígado de tilápia depois da exposição ao acetato de chumbo. Não foram encontrados trabalhos com doses letais 50% (DL_{50}) na exposição ao chumbo para tilápias. Assim sendo, foi determinado como dose uma extrapolação da DL_{50} de ratos ao chumbo tetrametilico, da ordem de 105mg/kg de animal (IPCS 1994; NIOSH 1995), sendo este valor reduzido para 100mg/kg. Como pode ser facilmente deduzido, a atividade de ALAD inativada não foi ativada com o uso de DTT. É necessário ressaltar que para o sangue de voluntários humanos sadios, 2 e 3, (Tabela 3) foi encontrada uma recuperação média de cerca de 22%, o que é normal para esta determinação. No sentido de melhor avaliar esta não ativação, foi conduzido um experimento *in vitro* de inibição e recuperação de ALAD de sangue de tilápia (Tabela 5). Os resultados,

mais uma vez, indicam que o DTT não ativa a ALAD de tilápia depois de uma inibição por chumbo.



Comprimento (cm) = Comprimento furcal³ ou a distância tomada entre a ponta do focinho até a furca da nadadeira caudal; Massa úmida de peixe (g) = Massa do peixe no momento do sacrifício

Figura 6 - Biometria dos animais usados para os testes iniciais de determinação de ALAD em sangue de tilápias.

Tabela 4 - Determinação de ALAD em sangue e fígado de tilápias expostas ao acetato de chumbo.

Dose	Peixe		Fígado g	Sangue HT	ALAD Unid					
	g	cm			Sangue		%	Fígado		%
					Inativada	Ativada		Inativada	Ativada	
0	198	18	4,91	32	2249	2340	4	435	471	8
0	212	18	2,27	30	1858	1886	2	395	359	-9
100	194	18	3,80	28	507	330	-35	34	46	35
100	180	18	3,15	34	395	399	1	158	216	37

4 animais foram expostos ao acetato de chumbo em solução isotônica de glicose, por uma única dose, e analisados após 24 horas; Dose = mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe; Peixe g e cm = Biometria dos animais; Sangue Ht = Hematócrito; ALAD Unid = Atividade de ALAD expressa em μmol de porfobilinogênio por hora por litro de eritrócito corrigida pelo hematócrito para sangue e por quilograma de tecido úmido para fígado; Inativada = ALAD Unid endógena; ALAD; Ativada = ALAD Unid reativada por DTT; % - Recuperação de ALAD Unid em relação à atividade endógena.

³ Foi adotado como comprimento, todas as vezes que for mencionado, a definição descrita na Instrução normativa do IBAMA nº 53, de 22 de novembro de 2005 para o comprimento furcal

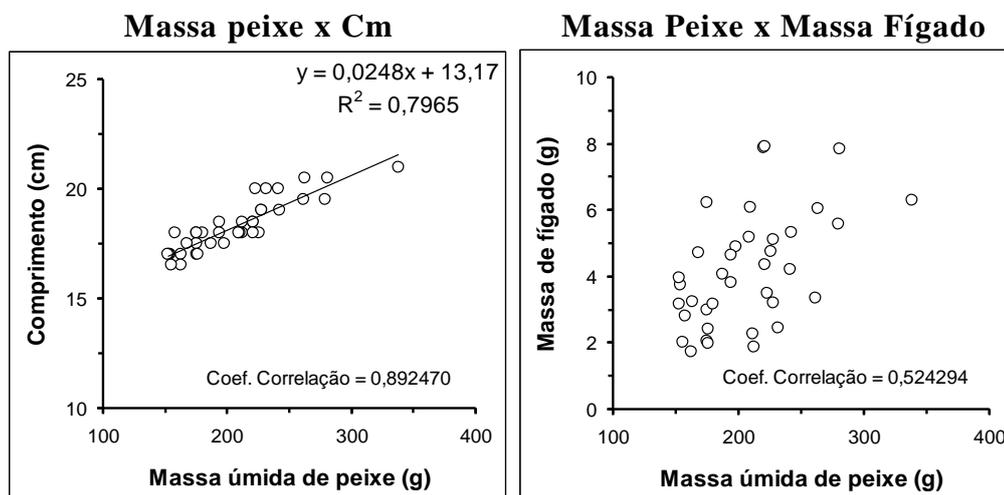
Tabela 5 - Inibição *in vitro* de ALAD de sangue de tilápia por chumbo.

Dose	Peixe		Sangue HT	ALAD Unid		%
	g	cm		Inativada	Ativada	
0	161	17	30	2277	2292	1
25				348	336	-3
0	156	17	30	2589	2566	-1
2500				20	152	660

15 animais foram puncionados, 8 para a dose 25 e 7 para a dose 2500, juntando-se todo o sangue coletado, que foi dividido em duas alíquotas, uma para o controle e outra para a exposição; Dose = nM de chumbo no ambiente de exposição da enzima; Demais informações conforme Tabela 4.

Exposição de tilápias a diferentes concentrações de acetato de chumbo

O estudo da relação massa-comprimento nesse grupo de animais apresentou um coeficiente de correlação de 0,892470, como apresentado na figura 7, que foi considerado satisfatório para amostras de tilápia vindas de um mesmo tanque de cultivo. Vale ressaltar que as regressões entre comprimento e massa para os dois grupos experimentais (Figuras 6 e 7) foram muito próximas. Mas, de outro lado, a biometria do fígado (Figura 7) não apresentou boa correlação com a massa total do animal nesse grupo experimental.



Comprimento (cm) = Comprimento furcal; Massa úmida de peixe (g) e de fígado (g) = Massa do peixe e do fígado no momento do sacrifício.

Figura 7 - Biometria das tilápias usadas para os testes de exposição a diferentes concentrações de acetato de chumbo.

A Tabela 6 descreve os resultados individuais obtidos para cada grupo experimental nas concentrações ao chumbo. Novamente a maior dose utilizada foi o valor de DL_{50} para ratos, como descrito anteriormente, trabalhando-se com diluições de 10 e 100 vezes para as menores doses. Foi verificado que nas concentrações de 10 e 100mg/kg, os animais apresentavam-se mais letárgicos e que na concentração de 100mg/kg não consumiram a ração fornecida depois de 24 horas de exposição (Figura 8). Tendo por base a média das atividades de ALAD, expressas na Tabela 6, foram calculados os valores da Concentração Inibitória de 50% da Atividade de ALAD (IC50), em sangue e fígado, depois de uma exposição por 24 horas ao acetato de chumbo administrado por via intraperitoneal (IC50). A Figura 9 e a Tabela 7 mostram os parâmetros das regressões lineares, os cálculos e os resultados finais para essa constante, tanto para acetato de chumbo como para chumbo. Os resultados demonstram que em tilápia a ALAD de eritrócito é cerca de 75 vezes mais exposta ao chumbo do que a de fígado (Tabela 7) depois de uma exposição ao chumbo por via intraperitoneal.

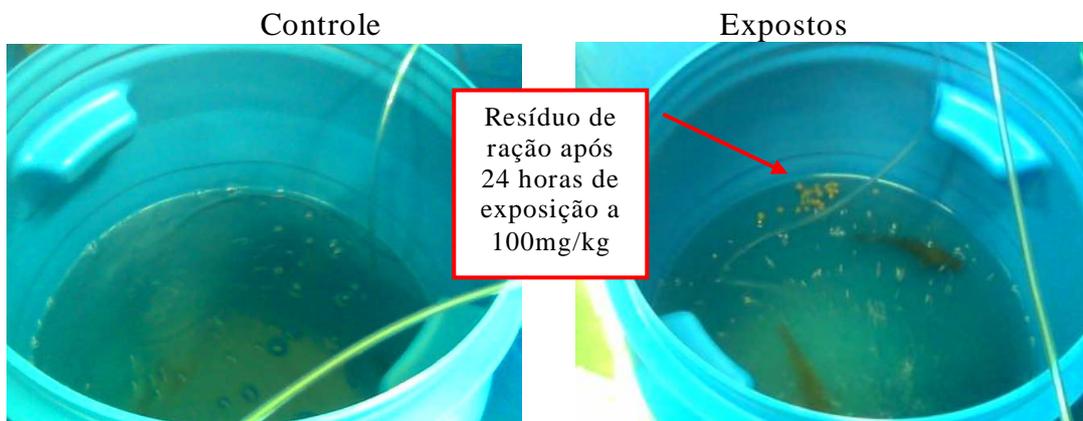
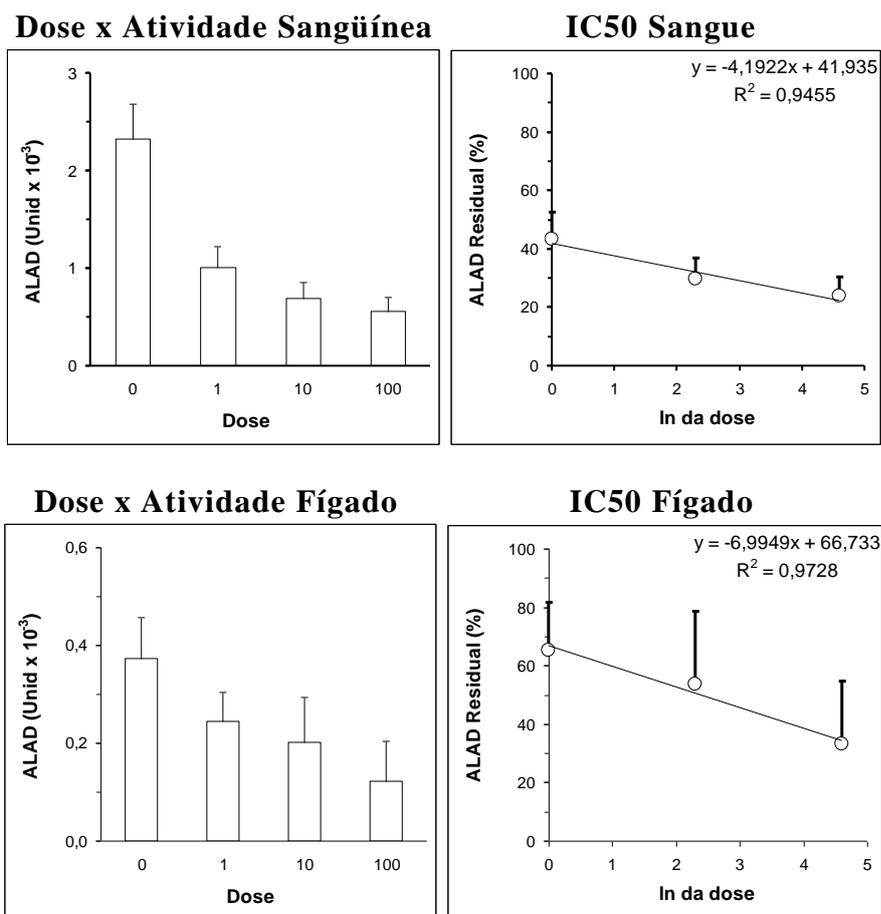


Figura 8 – Efeito da exposição ao chumbo no consumo de ração por peixes.

Tabela 6 - Dados individuais da exposição de tilápias a diferentes concentrações de acetato de chumbo.

Dose	Peixe		Fígado	Sangue	ALAD Unid	
	g	cm	g	HT	Sangue	Fígado
0	212	18	2,27	25	2230	375
0	198	18	4,91	32	2249	435
0	158	18	2,79	24	2679	277
0	163	17	1,72	24	2255	363
0	175	18	2,98	24	1568	305
0	232	20	2,46	24	1970	482
0	262	20	3,33	25	2669	482
0	228	19	3,20	24	2840	435
0	242	19	5,31	28	2419	395
0	241	20	4,22	24	2204	336
0	281	21	7,85	33	2517	232
MD	217	19	3,73	26	2327	374
DP	40	1	1,75	3	359	82
CV%	19	6	47	13	15	22
N	11	11	11	11	11	11
1	339	21	6,31	34	605	309
1	226	18	4,74	36	1024	307
1	263	21	6,03	27	1250	280
1	221	19	7,87	36	1075	194
1	175	17	6,24	34	1025	183
1	221	19	7,91	35	1063	191
MD	241	19	6,52	34	1007	244
DP	55	2	1,21	3	214	61
CV%	23	8	19	10	21	25
N	6	6	6	6	6	6
10	228	19	5,09	24	788	292
10	221	18	4,35	24	840	95
10	163	17	3,23	24	544	189
10	154	17	3,73	27	805	299
10	194	19	4,62	33	468	131
MD	192	18	4,21	26	689	201
DP	33	1	0,73	4	170	93
CV%	17	6	17	15	25	46
N	5	5	5	5	5	5
100	223	20	3,49	25	nd	133
100	194	18	3,80	28	507	34
100	180	18	3,15	34	395	75
100	188	18	4,08	27	573	63
100	175	18	2,06	30	756	177
100	213	19	1,87	20	nd	109
100	176	17	2,39	23	nd	273
MD	193	18	2,98	27	558	123
DP	19	1	0,87	5	151	81
CV%	10	5	29	17	27	66
N	7	7	7	7	4	7

29 animais foram expostos ao acetato de chumbo em solução isotônica de glicose, por uma única dose, e analisados após 24 horas; Dose = mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe; MD = Média aritmética; DP = desvio Padrão; CV% = Coeficiente de Variação; nd = não determinado; Demais informações conforme Tabela 4.



Dados retirados da Tabela 6 e regressões lineares para cálculo do IC50. ALAD Residual = (Média da atividade nos animais expostos / Média da atividade nos controles, conforme Tabela 6) x 100.

Figura 9 - Cálculo do IC50 - 24 horas *in vivo* para ALAD de sangue e de fígado de tilápias expostas ao acetato de chumbo.

Tabela 7 - Memória de cálculo dos valores do IC50 - 24 horas.

Tecido	Constantes	Inclinações	IC50 24 horas		Variação
			Acetato	Chumbo	
Sangue	41,935	-4,192	0,1461	0,1137	75
Fígado	66,733	-6,995	10,9345	8,5114	

Constantes e Inclinações = Dados das regressões das Figuras 6b e 6d; Acetato = Acetato de Chumbo; Chumbo = Pb; Variação = IC50 para Chumbo em fígado / IC50 para chumbo em sangue.

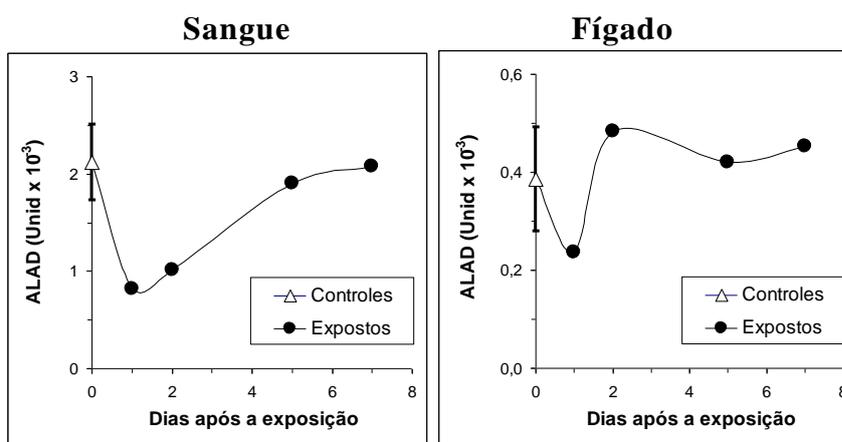
Cinética da atividade da ALAD de sangue e fígado de tilápias

O ensaio foi realizado ao longo de 7 dias com a menor concentração utilizada no estudo anterior (1mg/kg). A atividade enzimática foi avaliada no sangue e no fígado nos dias 1, 2, 5 e 7 depois da exposição. Os resultados deste ensaio encontram-se descritos na Tabela 8 e na Figura 10.

Tabela 8 - Dados individuais da recuperação da atividade de ALAD de tilápias depois da exposição ao acetato de chumbo.

Dose	Dias	Peixe		Fígado	Sangue	ALAD Unid	
		g	cm	mg	HT	Sangue	Fígado
0	1	210	18	6.09	25	1864	237
0	2	176	18	1.98	24	2216	484
0	5	156	17	2.03	21	1774	420
0	7	209	18	5.18	26	2630	402
	MD	188	18	3.82	24	2121	386
	DV	27	1	2.13	2	389	105
	CV%	14	4	56	9	18	27
	N	4	4	4	4	4	4
1	1	153	17	3.97	24	819	237
1	2	168	18	4.70	25	1017	484
1	5	153	17	3.15	20	1903	420
1	7	280	20	5.58	21	2079	453
	MD	188	18	4.35	23		
	DV	61	1	1.03	2		
	CV%	33	7	24	11		
	N	4	4	4	4		

8 animais foram expostos ao acetato de chumbo em solução isotônica de glicose, por uma única dose, e analisados nos tempos indicados; Dose = mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe; MD = Média aritmética; DP = desvio Padrão; CV% = Coeficiente de Variação; Demais informações conforme Tabela 4.



Figuras construídas com os dados expressos na Tabela 8. O tempo zero representa a média e um desvio padrão dos controles. Os demais dados foram obtidos em um único animal.

Figura 10 - Recuperação da atividade de ALAD de tilápias depois da exposição ao acetato de chumbo.

Níveis de chumbo no sangue (Pb-S)

Os níveis de Pb-S foram determinados em amostras do experimento de exposição (Tabela 6). Os resultados estão descritos na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9 - Níveis de chumbo no sangue (Pb-S) de tilápias expostas ao acetato de chumbo via intraperitoneal.

Dose em mg / kg peixe		Pb-S µg/L		
Acetato de Chumbo	Chumbo	N	Média	DP
0	0	9	19,7	4,0
1	0,78	6	276,1	144,1
10	7,78	<i>pool</i>	4917,0	
100	77,84	nd		

pool = juntada do sangue de dois animais; N = Número de animais testados; Média = Média aritmética; DP = Desvio padrão; Demais informações conforme Tabela 6; nd = não determinado.

5 DISCUSSÃO

Padronização dos métodos

O transporte dos animais da fazenda até o laboratório em água saturada com oxigênio garantiu uma sobrevivência ao redor de 90%, especialmente se os animais não ultrapassassem 200g. O acondicionamento no laboratório de mais de quilograma de massa úmida de peixe em 50 litros de água potável aerada levou a muitas mortes e a alterações comportamentais. Além disso, obrigou a uma maior troca da água, já que o sistema de acondicionamento dos peixes não possui filtros para limpeza. Assim, foi estabelecido um máximo de 600g de massa úmida de peixe por dorna o que representa, em média, 3 peixes por dorna.

A exposição de peixes usualmente é feita pela água ou pela alimentação (SHAW e HANDY, 2006; ATLI e CANLI, 2007). Mas, tendo em vista as dificuldades para descarte dos resíduos de água e para preparação das rações contaminadas, optou-se pela injeção intraperitoneal como forma de exposição. A injeção utilizando seringa de plástico descartável com agulha de 25 x 0,8 resultou em uma grande área lesionada no peixe o que nos levou a usar seringas descartáveis para administração de insulina (13 x 0,45) com capacidade de 1mL, reduzindo significativamente as lesões e as possíveis alterações dela oriundas.

Outra questão que foi observada foi a necessidade de uma rápida recuperação do animal depois da exposição. Para isso, após a anestesia e a injeção, os animais eram acondicionados em um recipiente contendo aproximadamente 10L de água potável filtrada e largamente aerada, aguardando-se o pleno restabelecimento do animal que deveria ser capaz de se soltar sozinho estando contido pela nadadeira caudal. Verificado o restabelecimento de um comportamento natatório normal, o peixe era transferido para a dorna correspondente.

Para a coleta de sangue foi verificado que a utilização de uma seringa de vidro com uma agulha de 25 x 0,8 levava ao rompimento da veia e ao extravasamento de sangue para os tecidos, com esvaziamento da veia, o que impedia a coleta de sangue. Além disso, usando seringa de vidro haveria necessidade da lavagem em solução de HNO₃ para descontaminação. Para contornar estes problemas, tanto a injeção para exposição quanto a coleta de sangue, foram feitas com seringa descartável para administração de insulina (13 x 0,45). Para evitar a coagulação, as seringas e agulhas foram previamente lavadas com uma solução de Heparina a 5% em NaCl 0,9% (salina).

A sangria de peixes pode ser feita de várias maneiras sendo a mais usual a punção da veia caudal⁴. Inicialmente utilizamos a punção da artéria dorsal pelo flanco do animal, abaixo da linha lateral (Figura 4). Entretanto, verificou-se uma grande dificuldade no acesso e na obtenção de sangue por essa via. A punção da veia caudal, entre o orifício urogenital e a base da nadadeira caudal (Figura 4) foi a melhor opção para a punção da tilápia. Esta forma de coleta levou a uma maior precisão e à coleta de maiores quantidades de sangue além de eliminar a necessidade de descontaminação da seringa, pois a mesma era descartada ao final da coleta.

Como anticoagulante foi utilizada a heparina sódica. O EDTA não foi utilizado em virtude de tratar-se de um agente quelante que poderia retirar o chumbo da enzima reativando-a e comprometendo a avaliação da inibição da atividade da ALAD pelo chumbo. Além disso, em altas concentrações o EDTA pode levar à deterioração das células vermelhas do sangue e à quelação do zinco, metal necessário para a atividade da ALAD (KIRÉS, 1977; SAXENA e FLORA, 2004). Na Tabela 3 observa-se que as diferentes concentrações de heparina testadas pouco alteraram a atividade de ALAD de sangue de voluntários humanos. O resultado do voluntário 1 pode ser explicado por patologias como porfirias, encontrando-se a ALAD inibida neste tipo de quadro. A enzima é então ativada por um reativador apresentando um alto percentual de recuperação. Desta forma descartou-se os valores obtidos para este voluntário. Assim sendo, para a condução do presente estudo, optou-se pelo uso da menor quantidade de heparina. Como as determinações de ALAD no sangue precisam ser feitas no mesmo dia, a quantidade final de heparina, 25U/mL, foram suficientes para evitar a coagulação. No entanto, amostras conservadas em geladeira para a determinação de Pb-S coagularam e tiveram que ser homogeneizadas antes da análise de metais. Dessa forma, o tipo e a concentração de anticoagulante precisam ser estudados caso a caso.

O DTT foi capaz de reativar a ALAD de sangue de voluntários humanos (Tabela 3), como amplamente descrito na literatura (SAKAI, YANAGIHARA e USHIO, 1980; ROMIEU, LACASANA e McCONNELL 1997; MATTOS, 2001). Nossos resultados estão dentro de uma mesma ordem de grandeza daqueles encontrados na literatura para a atividade de ALAD de eritrócitos. Ajustadas as unidades empregadas pelos autores para a unidade utilizada no presente trabalho,

⁴ Maiores informações em:

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/ETCC/dfo/4_Blood_Sampling_of_Finfish.pdf

<http://www.uoguelph.ca/%7Eaqualab/forms/fishbloodsamplingSOP.pdf>

<http://research.qlogics.com/ethics/SOPs/Aquatics/SOP%20Blood%20sampling%20of%20fish%20Apr%202005.pdf>

valores de 3270 ALAD Unid, com CV% de 18% para 113 determinações em adultos (SIQUEIRA, MAIA, OLIVEIRA *et al.*, 2003), e de 1451 ALAD Unid, com CV% de 19% para 15 determinações em pacientes hospitalares (GEISSE, BRÜLLER e DOSS, 1983), podem ser encontrados na literatura. Para comparação, nos testes realizados com amostras de sangue humano de três voluntários, valores da ordem de 1385 ALAD Unid foram encontrados para a atividade de ALAD em eritrócitos (Tabela 3).

Contudo, como é possível observar na Tabela 4, o DTT, da mesma partida de reagente usada para humanos, não foi capaz de reativar a ALAD de tilápias expostas ao acetato de chumbo. A Tabela 5, com os resultados de um ensaio de exposição *in vitro*, corrobora esta característica da ALAD de tilápia. A ALAD hepática (Tabela 4), embora tenha recuperado parte de sua atividade pelo tratamento com DTT, ainda apresentou atividade nos peixes expostos muito inferior aos controles, quando era esperada a total recuperação ou atividade próxima às dos controles.

O protocolo padrão para humanos geralmente utiliza a diferença entre a alíquota com grau de atividade endógena (inativada) e a alíquota tratada com o reativador (ativada), expressando o resultado em percentual de recuperação enzimática (SAKAI, YANAGIHARA e USHIO, 1980; WIGFIELD e FARANT, 1981). Isso tem por finalidade tornar o indivíduo controle dele mesmo, não sendo necessário validar valores normais para o indicador biológico, observando-se a presença do chumbo pela percentagem de reativação. Mesmo para indivíduos não-expostos, valores de ativação ao redor de 30% podem ser encontrados (GEISSE, BRÜLLER e DOSS, 1983). Os resultados obtidos para a ALAD de tilápia, que parece não ser reativada por DTT, indicam, entretanto, a necessidade de padronização de valores normais para a atividade dos animais não-expostos ou controles. Outra possibilidade seria a busca de outro reativador tal como: calor, zinco, magnésio ou manganês (SAKAI, YANAGIHARA e USHIO, 1980; CONNER e FOWLER, 1994; KUTLU e SÜMER, 2008).

Todavia, autores que utilizam ALAD de animais aquáticos como indicador biológico para chumbo normalmente não usam qualquer tipo de reativador, baseando-se exclusivamente na diferença de atividade entre animais expostos e não-expostos para concluir pela presença ou ausência de chumbo no ambiente (ADDINSON, FITZPATRICK e RENTON 1989; RODRIGUES, BELLINASSO e DICK 1989; BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL, 1998). Os resultados obtidos corroboram esta prática, indicando claramente que a ALAD de tilápia, quando inibida por chumbo, não recupera sua atividade pelo tratamento com DTT.

Desta forma, descartou-se a reativação por DTT optando-se pela tentativa de padronização de valores normais de atividade enzimática em cada tecido. Para tanto, foram considerados como não expostos os peixes vindos diretos dos tanques de cultivo e mantidos no laboratório por no máximo uma semana em água potável, alimentados com ração comercial específica para peixes.

Para este trabalho optou-se por uma normalização da atividade da ALAD sanguínea pelo hematócrito, como descrito na metodologia para humanos (SAKAI, YANAGIHARA e USHIO, 1980). A expressão da atividade da ALAD hepática foi efetuada por grama de tecido. A eliminação da determinação de proteínas totais como agente normalizador para a determinação em fígado pode induzir a um erro na medida em haja um aumento de concentrações de outras proteínas que não a da enzima de interesse. Além disso, a determinação de proteínas totais é um método indireto e sujeito a um alto erro experimental quando realizada em amostras com tecido em suspensão.

Os resultados obtidos para os peixes usados como controle na determinação da sensibilidade da ALAD de sangue e fígado ao chumbo, descritos na Tabela 6, mostram que a metodologia adotada nesse trabalho apresentou pouca variação, tanto em sangue quanto em fígado. No sangue, a atividade foi da ordem de 2327 ALAD Unid. por litro de eritrócito, corrigidas pelo Hematócrito, com um CV% de 15% para 11 animais testados. No fígado, esta atividade foi de 374 ALAD Unid. por quilograma de tecido, com um CV% de 22% para os mesmos 11 animais. Nesse trabalho, 1 ALAD Unid. é a quantidade de enzima que é capaz de formar 1 μ mol de PBG por hora, a 37°C, nas condições descritas anteriormente. A dispersão dos dados de um mesmo grupo experimental, expressos pelo CV%, mostra que a metodologia empregada e os níveis de ALAD em sangue e fígado de tilápias podem ser considerados satisfatórios para trabalhos utilizando indicadores biológicos destes animais. Desta forma, mesmo sem o uso de DTT, a ALAD de peixe pode ser empregada como indicador de exposição ao chumbo.

Em uma análise da ALAD hepática de trutas não expostas, foram obtidos valores de atividade de enzima correspondentes a 94.000 ALAD Unid. por quilograma de fígado por hora (ADDINSON, FITZPATRICK E RENTON 1989). Burden, Sandheinrich e Caldwell (1998), trabalhando com homogeneizados totais de alevinos de truta, encontraram valores da ordem 2100nmol de PBG/mg de tecido/h para os controles. Passando estes resultados para a ALAD Unid definida no presente trabalho, a quantidade de ALAD no corpo deste peixe seria de 2,1x10⁶ ALAD Unid

por quilograma de massa tecidual. Como já descrito em outros artigos, o uso da reativação por DTT implica em considerar o animal como controle de si mesmo sem necessidade de expressão dos resultados em Unidades Internacionais de enzima. Este é um exemplo claro já que os resultados destes autores, na ordem de 10^3 a 10^6 Unidades, são muito elevados e devem significar algum engano na quantificação. Mas, considerando a inibição em relação aos controles, depois de 29 dias de exposição de trutas a uma concentração mantida constante em $201\mu\text{g/L}$ de chumbo na água, a inibição de ALAD foi da ordem de 23% (BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL, 1998). Este resultado, resguardada as diferenças em Unidades, indicam que a inibição da ALAD total no corpo da truta não é muito significativa quando de exposições através da água da ordem de $200\mu\text{g/L}$, cerca de 200 vezes o valor médio para águas continentais não-expostas (Tabela 1).

Alves e Wood (2006) estudaram o efeito da administração do cálcio e do chumbo em trutas. Seus resultados indicam uma atividade de 447nmol de PBG por grama de eritrócito por hora para os peixes tratados apenas com 20mg de cálcio. Esta forma de expressão leva a uma Unidade para a atividade de ALAD equivalente a utilizada no presente trabalho. Considerando que esses animais foram expostos ao cálcio, não é possível comparar estes dados com os obtidos neste trabalho, que indica o valor médio de $2327\mu\text{mol}$ de PBG/hora/litro de eritrócitos, ou seja, cerca de cinco vezes maior. De qualquer forma, a ordem de grandeza da determinação de ALAD indicada pelos autores pode ser considerada próxima aos resultados obtidos no presente trabalho.

É preciso destacar que, embora a ALAD esteja presente em todos os animais, esta enzima possui uma filogenia e uma evolução. De acordo com alguns autores (CONNER e FOWLER, 1994; KUTLU e SÜMER, 2008), a ALAD, em função de fatores como pH ótimo, peso molecular, afinidade aos metais e susceptibilidade ao EDTA, pode ser classificada em dois grupos. O primeiro grupo abrange a enzima presente em mamíferos e aves, com atividade ótima ocorrendo na presença de zinco e em pH entre 6,3 e 7,1. O segundo grupo inclui a ALAD de bactérias e leveduras com pH ótimo entre 8,0 e 8,5, não sendo, em geral, ativada pelo zinco ou sensível à reativação por DTT. Conner e Fowler (1994) verificaram que a ALAD hepática de peixes da espécie *Ictalurus punctatus*, embora seja sensível ao chumbo e possua faixas de pH ótimo próximo aos da ALAD humana, não foi reativada na presença de zinco ou DTT. Chang, Sassa e Doyle (1984), demonstraram que embora existam

similaridades, como peso molecular e estrutura terciária, a ALAD pode diferir imunologicamente entre as diversas espécies de mamíferos testadas.

Outro ponto que necessitou de padronização foi o grau de maturação dos peixes utilizados em diversos experimentos ao longo do ano. Tanto a massa como o comprimento podem ser usados nessa normalização, mas a relação massa/comprimento vem se mostrando como um parâmetro que permite garantir um mínimo de homogeneidade e de aproveitamento dos animais que são fornecidos pelo criador com um máximo de aproveitamento dos animais. Essa medida, já descrita na literatura (PACKARD e BOARDMAN, 1999; SILVA FILHO, 2004), foi utilizada na avaliação das partidas de peixes que foram empregadas nesse trabalho. Os conjuntos de animais utilizados nos experimentos de padronização dos métodos (Figura 6) e de exposição ao acetato de chumbo (Figura 7) revelaram uma boa correlação entre massa e comprimento, com correlação e regressões lineares muito semelhantes, o que confirma o potencial desse parâmetro como agente normalizador de estágio de maturação.

Efeitos da exposição intraperitoneal de acetato de chumbo nos níveis de ALAD de sangue e fígado de tilápias

Como veículo para o acetato de chumbo foi testado inicialmente uma solução de NaCl 0,9%, como utilizado por Campana, Sarasquete e Blasco (2003). Todavia, o acetato de chumbo reagiu com o NaCl gerando um precipitado de cloreto de chumbo. Decidiu-se então pela utilização de uma solução de glicose 0,24M como veículo para o acetato. A exposição através da água foi descartada, pois resultaria na necessidade de tratamento para purificação e complexação do chumbo. Além disso, o chumbo poderia aderir na superfície da dorna reduzindo, nos ensaios iniciais, as doses à que os animais estariam efetivamente expostos. A exposição através da alimentação, além da necessidade de preparo da ração, impossibilitaria o acompanhamento individual do consumo de ração. Outro fator, que foi detectado nesse trabalho, é a possível rejeição da ração por parte dos animais, como foi observado nos ensaios de peixes expostos a doses de 100mg de acetato de chumbo/kg (Figura 8). Assim sendo, ficou decidido que a via intraperitoneal era a mais adequada na condução desse trabalho.

Tendo em vista a necessidade de garantir resultados dentro do cronograma proposto, optou-se por uma exposição única e com um intervalo de 24 horas para o sacrifício, pois havia dúvida quanto à sobrevivência do animal nas condições estabelecidas. Além disso, as condições para manutenção dos animais, utilizando dornas de plástico com água potável aerada sem purificação durante o

acondicionamento, pode levar a efeitos provocados pelas excreções dos peixes. Para reduzir esse risco, a água foi trocada a cada 24 horas e sempre tratada por filtração e adsorção em carvão ativado e aerada por no mínimo 24 horas para a eliminação do cloro ativo.

A medida da inibição da ALAD de sangue e fígado de tilápia por chumbo revelou que a enzima de sangue é pelo menos 75 vezes mais exposta ao chumbo do que a enzima de fígado (Figura 9 e Tabela 7). Esse resultado aponta claramente para a utilização do sangue como compartimento quando da utilização de tilápias no monitoramento de chumbo. É necessário ressaltar que, mesmo com problemas que possam existir na normalização dos dados, que em sangue usa o Hematócrito e em fígado a quantidade de tecido no homogeneizado, o fígado possui muito menos atividade de ALAD (Tabela 6). Mesmo assim, a inibição da enzima eritrocitária é maior, o que implica em dizer que deve haver uma bioconcentração do chumbo administrado no eritrócito. Essa maior concentração de chumbo no eritrócito, com certeza, favorece que a enzima presente nesse tecido apresente maior sensibilidade ao chumbo administrado, conforme indicam os valores de IC50 obtidos para as duas fontes de ALAD de tilápia (Tabela 7). A concentração de Pb-S, expressa na Tabela 9, indica que 24 horas depois da administração de uma dose de 780µg de Pb/kg esse compartimento ainda possui 35% da concentração esperada se a distribuição da dose fosse uniforme em todos os tecidos. Vale ressaltar que essa foi a menor dose testada (1mg de acetato de chumbo/kg). Esse valor para Pb-S, 276µg/L, é cerca de 2,42 vezes o valor do IC50 que foi calculado com os resultados da exposição da tilápia ao chumbo. Muitos desses cálculos são aproximados já que estão considerando que 1 litro de sangue é equivalente a 1 quilograma de tecido.

Rodrigues, Bellinaso e Dick (1989) estudaram a inibição *in vitro* da ALAD hepática e sanguínea de um tipo de bagre, *Pimelodus maculatus*, por chumbo. Nesse trabalho, o IC50 para a enzima de eritrócito foi 1036µg/L e para a enzima de fígado foi 2072µg/kg. Essa é uma possível explicação para as diferenças encontradas em nosso trabalho, ou seja, que a ALAD expressa no fígado possa ser menos inibida pelo chumbo. Mas, também é preciso considerar a acumulação de chumbo nos eritrócitos (ALVES, WOOD e GLOVER, 2006), e até mesmo, o somatório dos dois efeitos como parte da justificativa para a exposição tão mais alta da ALAD de eritrócito ao chumbo administrado por via intraperitoneal.

Em outro trabalho Alves e Wood (2006) estudaram a distribuição tecidual de chumbo oferecido na dieta de alevinos de truta. Os autores verificaram que a carcaça

acumula cerca de 80% do chumbo ingerido, o que se justifica por esse compartimento representar 85 a 90% da massa total do animal. Os restantes 20% se distribuíram 10% no intestino e 10% entre a brânquia, o rim e o fígado. Na maior dose administrada, que foi de 21 dias com uma ração contendo 520 μ g de Pb/g de massa seca de ração, 99% do chumbo estava acumulado nos eritrócitos. Dessa forma, as concentrações de Pb nos demais tecidos precisam ser normalizadas com as concentrações de Pb no sangue residual de cada tecido. Os níveis de Pb nos eritrócitos, nessa mesma dose, atingiram 1,5 μ g/g, valor 105 vezes maior do que o encontrado no plasma. Esses resultados indicam, claramente, que o acúmulo de chumbo nos eritrócitos é a principal razão da maior exposição da ALAD ao chumbo quando comparamos os resultados de IC50 obtidos no presente trabalho (Tabela 7).

Recuperação da atividade da ALAD de sangue e fígado de tilápia depois da exposição ao chumbo

Não foi possível encontrar dados sobre a recuperação de ALAD de tilápia depois de uma exposição ao chumbo. Mesmo uma busca por outros peixes não permitiu obter dados para a comparação com esse trabalho. Além disso, para os resultados obtidos com tilápia foram usados somente 8 animais o que não permite uma conclusão precisa. De qualquer modo, a Figura 8 mostra claramente que a atividade de ALAD foi inibida nas primeiras 24 horas, na dose mais baixa experimentada nesse peixe – 1mg de acetato de chumbo por quilograma de peso – e que a mesma atividade dos controles foi alcançada sete dias depois da exposição para o sangue e 2 dias para o fígado. É preciso ressaltar que a atividade de ALAD em fígado é muito menor do que em eritrócito e que a capacidade de síntese de proteínas na célula hepática deve ser bem mais desenvolvida. Além disso, como já descrito anteriormente, o eritrócito é o compartimento que mais acumula chumbo durante uma exposição. Neste estudo a exposição foi feita por uma única dose o que leva a ter que ser considerado os níveis de eliminação e de biotransformação na avaliação das diferenças encontradas entre esses dois tecidos.

Berglind, Dave e Sjöbeck (1985) em um trabalho com *Daphnia magna* obteve recuperações totais de ALAD após 4 dias para animais expostos na água à doses de 4-16 μ g Pb /L e após 10 dias para animais expostos à 64-256 μ g Pb/L. Entretanto, este estudo utiliza um microcrustáceo, assim deve-se ter cautela na extrapolação do tempo de recuperação destes animais para peixes.

Outro ponto que precisa ser destacado é a vida média do eritrócito. Em células de mamíferos é normal encontrarmos valores da ordem de 120 dias para a vida média

do eritrócito⁵. Não foi possível encontrar informações sobre o tempo de sobrevivência de uma célula eritrocitária da tilápia. Mas, considerando que essas células são nucleadas e com alta capacidade metabólica, é possível concluir que essa recuperação, mesmo no eritrócito, esteja ocorrendo por síntese de novas moléculas da enzima. Mas, de qualquer forma, a possibilidade de algum mecanismo de biotransformação no interior dos eritrócitos também precisa ser considerada.

⁵ Maiores informações em:
www.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/met_eritr.pdf

6 CONCLUSÕES

A crescente industrialização de diversas regiões no Brasil pode representar uma situação potencialmente perigosa para o meio ambiente, uma vez que os compartimentos ambientais são o destino, voluntariamente ou não, de muitos produtos ou rejeitos da indústria, tal como o chumbo.

O chumbo, ao atingir o meio ambiente, pode interferir nos ecossistemas existentes levando a alterações que podem ser reversíveis ou não. Esses impactos podem ter conseqüências dramáticas para diversas espécies e, estando o homem inserido nesse mesmo ecossistema, esse desequilíbrio pode atingi-lo direta ou indiretamente. Dessa forma, é de fundamental importância o permanente monitoramento da presença de chumbo no ambiente. Os resultados desse trabalho permitiram concluir que:

1. A ALAD de tilápia não é reativada por DTT;
 2. A ALAD de tilápia possui sensibilidade ao chumbo;
 3. A ALAD de eritrócitos de tilápia é 75 vezes mais exposta ao chumbo do a ALAD hepática
-

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S. M.; GIESY, J. P.; TREMBLAY, L. A.; EASON, C. T. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. **Biomarkers**, v. 6, n. 1, p. 1-6, jan. 2001.
- ADDISON, R. F.; FITZPATRICK, D.; RENTON, K. W. Distribution of δ -Aminolevulinic Acid Synthetase and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase in Liver and Kidney of Rainbow Trout (*Salmo Gairdnerii*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 95B, n. 2, p. 317-319, 1990.
- ADEYEYE, E. I.; AKINYUGHA, N. J.; FESOB, M. E.; TENABE, V. O. Determination of some metals in *Clarias gariepinus* (Cuvier and Valenciennes), *Cyprinus carpio* (L.) and *Oreochromis niloticus* (L.) fishes in a polyculture fresh water pond and their environments. **Aquaculture**, v. 147, n. 3, p.205-214, dez. 1996.
- AITIO, A.; KALLIO, A. Exposure and Effect Monitoring: A Critical Appraisal of their Practical Application. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 2, p. 137-147, set. 1999.
- AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquat. Ecosyst. Health Manag.**, v. 9, p. 447-455, 2006.
- ALVES, L. C.; GLOVER, C. N.; WOOD, C. M. Dietary Pb Accumulation in Juvenile Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 51, n.4, p. 615-625, nov. 2006.
- ALVES, L. C.; WOOD, C. M. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 3, p. 217-232, jun. 2006.
- APOSTOLI, P.; LEONE, R.; PORRU, S. *et al.* Urinary Mutagenicity Tests in Lead-exposed Workers. **Mutat. Res.**, v. 222, p. 245-251, 1989.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, v. 145, p. 282-287, 2007.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology and Environmental Medicine. **Toxicological Profile for Lead**, Atlanta, Georgia, 2007. 582 p.
- BERGLIND, R.; DAVE, G.; SJÖBECK, M.-L. The Effects of Lead on δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity, Growth, Hemoglobin Content, and Reproduction in *Daphnia magna*. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 9 p.216-229, 1985.
- BERTAZZI, P. A.; TOFFOLETTO, F.; PESATORI, A.C. **Problemi Etici Del Monitoraggio Biológico in Advances in Occupational Medicine (Aggiornamenti in Medicina Occupazionale)**. Pavia, Maugeri Foundation Books, 2000.
- BOSSOLAN, N. R. S. **Atlas de Dissecção de Vertebrados**. Aulas Práticas. São Paulo: USP, Instituto de Física de São Carlos, 2001. 3 fotografias, color.
-

- BURDEN, V. M.; SANDHEINRICH, M. B.; CALDWELL, C. A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, v.101, p. 285-289, 1998.
- CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO J. Effect of lead on ALA-D activity,metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood,kidney,and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 55, p. 116-125, 2003.
- CASARETT & DOULL'S. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 4 ed. Editora Pergamon, 1991.
- CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL. USA Dept. of Health and Human Services. **Preventing Lead Poisoning in Young Children**. Atlanta, GA, 1991.
- CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genet. Mol. Biol.**, v.27, n. 2, p. 270–274, 2004.
- CHANG, C. S.; SASSA, S.; DOYLE, D. An Immunological Study of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Specificity Consistent with the Phylogeny of Species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 797, n. 3, p. 297-301, mar. 1984.
- CHARO-KARISA, H.; KOMEN, H.; REZK, M. A.; PONZONI, R. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. **Aquaculture**, v. 261, p. 479-486, 2006.
- CLAYSON, D.B.; IVERSON, F.; NERA, E. A.; LOK, E. Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation. **Mutat Res.**, v. 248, n. 2, p. 321-31, 1991.
- CONNER, E. A.; FOWLER, B. A. Biochemical and immunological properties of hepatic δ -aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 28, p. 37-52, 1994.
- COSTA, J. R. M. A.; MELA, M.; ASSIS, H. C. S.; PELLETIER, E.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- DEMASI, M.; PENATTI, C. A. A.; DELUCIA, R.; BECHARA, E. J. H. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. **Free Radical Biol. Med.**, v. 20, n. 3, p. 291–299, 1996.
- DENT, A. J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; HASNAIN, S. S. Two Different Zinc Sites in Bovine 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase Distinguished by Extended X-Ray Absorption Fine Structure. **Biochems.**, v. 29, n. 34, p.7822–7828, 1990.
- DUTRA, F.; BECHARA, E. J. H. Bioquímica e Ação Citotóxica de α -Aminocetonas Endógenas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 483-491, 2005.
-

ERSKINE, P. T.; NEWBOLD, R.; BRINDLEY, A. A. *et al.* The X-Ray Structure of Yeast 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase Complexed with Substrate and Three Inhibitors. **J. Mol. Biol.**, v. 312, p. 133–141, 2001.

GALVÃO, L. A.; COREY, G. Plomo: Série Vigilância. OMS, OPS, **Centro Americano de Ecologia Humana y Salud**, México, v. 8, p.103, 1989.

GEISSE, S.; BRÜLLER, H.-J.; DOSS, M. Porphobilinogen synthase (δ -aminolevulinic acid dehydratase) activity in human erythrocytes: reactivation by zinc and dithiothreitol depending on influence of storage. **Clinica Chimica Acta**, v. 135, p. 239-245, 1983.

GIBBS, P. N. B.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase. **Biochem. J.**, v. 225, n. 3, p. 573-850, fev. 1985.

GOERING, P. L. Lead Protein Interaction as a Basis for Lead Toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 2-3, p. 45-60, 1993.

GRAAF, M. de; VAN ZWIETEN, P. A. M.; MACHIELS, M. A. M.; LEMMA, E.; WUDNEH, T.; DEJEN, E.; SIBBING, F. A. Vulnerability to a small-scale commercial fishery of Lake Tana's (Ethiopia) endemic *Labeobarbus* compared with African catfish and Nile tilapia: An example of recruitment-overfishing?. **Fisheries Research**, v. 82, p. 304-318, 2006.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B. The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 31, n. 10, p. 3879–3882, 1974.

HAEGER-ARONSEN, B.; ABDULLA, M.; FRISTEDT, B. I. Effect of lead on δ -aminolevulinic acid dehydrase activity in red blood cells. **Arch. Environ. Health**, v. 23, n. 440-445, dez. 1971.

HERNBERG, S.; NIKKANEN, J. Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions, **Lancet**, v. 1, n. 7637, p. 63-64, jan. 1970.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. vol. 65, 1996.

ICES - INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA. Biological effects of contaminants: Quantification of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood. By K. Hylland. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, Copenhagen, n. 34, 9 p., mar. 2004.

IPCS - INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. Environmental Health Criteria 165. **Inorganic Lead**. Geneva, 1995.

_____ - INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. Lead, organic. **IPCS**, Geneva, Maio 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/organlea.htm>>. Acessado em: 03 mar. 2007.

- JACOB, B.; RITZ, B.; HEINRICH, J.; HOELSCHER, B.; WICHMANN, H. E. The Effect of Low-Level Blood Lead on Hematologic Parameters in Children. **Environ. Res.**, v. 82, n. 2, p. 150-159, fev. 2000.
- JOHN, W. Micro Assay Urinary d-Aminolevulinic Acid and Porphobilinogen by HPLC with Precolumn Derivation. **J. Chrom.**, v. 527, p. 134-139, 1990.
- KELADA, S. N.; SHELTON, E.; KAUFMANN, R. B.; KHOURY, M. J. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A Huge Review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 154, n.1, p.1-13, jul. 2001.
- KIEREŚ, H. Effect of EDTA on the activity of aminolevulinic dehydratase in vitro and in vivo. **Med. Pr.**, v. 28, n. 3, p.201-205, 1977.
- KUTLU, M.; SÜMER, S. Some biochemical properties of d-aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex* Food Chem. **Toxicol.**, v. 46, p. 115-118, 2008.
- LANDRIGAN, P.J.; GEHLBACH, S.H.; ROSENBLUM, B.F. *et al.* Epidemic Lead Absorption Near an ore Smelter: The Role of Particulate Lead. **The New England Journal of Medicine**, v.292, p.123-129, 1975.
- LOWRY, L. K. Role of Biomarkers of Exposure in The Assessment of Health Risks. **Toxicol. Lett.**, v.77, p.31-38, 1995.
- MAHAFFEY, K.; MCKINNEY, J.; REIGART, J. R. Lead and Compouds. In: LIPPMANN, M. **Environmental Toxicants, Human Exposures and Their Health Effects**. 2. ed. New York: Jon Wiley and Sons. Inc., 2000. p. 481-521.
- MATTE, T. D.; FIGUEROA, J. P. ; OSTROWSKI, S. *et al.* Lead Poisoning among Household Members Exposed to Lead – Acid Battery Repair Shops in Kingston, Jamaica. **Int. J. Epidemiol**, v. 18, n. 4, p. 874-881, 1989.
- MATTOS, R. de C. O. da C. **Estratégias para a avaliação da exposição ao chumbo: estudos comparativos dos indicadores biológicos e efeitos relacionados**. 2001. 141 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.
- MOSER, R.; OBERLEY, T. D.; DAGGETT, D. A.; FRIEDMAN, A. L.; JOHNSON, J. A.; SIEGEL, F. L. Effects of Lead Administration on Developing Rat Kidney. I. Glutathione S-Transferase Isoenzymes. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 131, n. 1, p. 85-93, 1995.
- MOUSA, M. A; MOUSA, S.A. Immunocytochemical Study on the Localization and Distribution of the Somatolactin Cells in the Pituitary Gland and the Brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General Comp. Endoc.**, v. 113, p. 197-211, 1999.
- MUSHAK, P.; DAVIS, M.; CROCETTI, A. F. *et al.* Review: Prenatal and Postnatal Effect of Low Level Lead Exposure: Integrated Summary of a Report to the USA Congress on Childhood Lead Poisoning. **Environ. Res.** v. 50, p. 11-36, 1989.
- NEEDLEMAN, H. L. **Low Level Lead Exposure: The Implications of Current Research**, Ed Raven Press, 1980.
-

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. Documentation for Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH): NIOSH Chemical Listing and Documentation of Revised IDLH Values (as of 3/1/95). Tetramethyl lead (as Pb). **NIOSH**, EUA, Maio 1994. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/NIOSH/IDLH/intridl4.html>>. Acesso em : 02 mar. 2007.

ONALAJA, A. O.; CLAUDIO, L. Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. **Environ. Health Perspect.**, v. 108, supl. 1, p. 23-28, mar. 2000.

PACKARD, G. C.; BOARDMAN, T. J. The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? **Comp. Biochem. Physiol., Part A**, v. 122, p. 37-44, 1999.

PAOLIELLO, M. M. B.; CAPITANI, E. M. de. Chumbo. In: AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 12.

_____. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmental Research**, v. 103, p. 288-297, 2007.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do Chumbo e seus Compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, v. 3, 2001. 144p.

PEIXOTO, M. J.; MARTINS, T. Saúde Ocupacional. Saturnismo. **Revista Técnica de Enfermagem Nursing**, ano 9, n. 99, p. 10-13, abr. 1996.

PIOMELLI, S.; SIAMAN, C.; ZULLOW, D. *et al.* Threshold for Lead Damage to Heme Synthesis in Urban Children. **Proc. Natl. Acad. Sci., LOCAL**, v. 7, p.3335-3339, 1982.

PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of Nile tilapia and Australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, p. 151-159, 2006.

QUITERIO, S.L.; VAITSMAN, D.S.; SILVA, C.R.S.; MARTINHON, P.T.; MOREIRA, M. de F.R.; ARAÚJO, U.C.; MATTOS, R.; SANTOS, L.C.C. Uso da poeira e do ar como indicadores de contaminação ambiental em áreas circunvizinhas a uma fonte de emissão estacionária de chumbo. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 501-508, 2001.

RODRIGUES, A. L.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect Of Some Metal Ions On Blood And Liver Delta-Aminolevulinate Dehydratase Of *Pimelodus Maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94B, n. 1, p. 65-69, 1989.

ROMIEU, I.; LACASANA, M.; McCONNELL, R. Lead Exposure in Latin America and the Caribbean. **Environ Health Perspect**, v. 105, n. 4, p. 398-405, 1997.

SAKAI, T.; MORITA, Y. d-Aminolevulinic in Plasma or Whole Blood as a Sensitive Indicator of Lead Effects, and it's Relation to the Others Heme Related Parameters. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 68, n. 2, p. 126-132, 1996.

SAKAI, T.; YANAGIHARA, S.; USHIO, K. Restoration of Lead Inhibited 5-Aminolevulinate Dehydratase Activity in Whole Blood by Heat, Zinc Ion and (or) Dithiothreitol. **Clin. Chem.**, v. 26, p. 625-628, 1980.

SÁNCHEZ-GALÁN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.; GARCÍA-VÁSQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, v. 412, n. 3, p. 219-225, fev. 1998.

SANTOS, C. R. **Padronização de micrométodo para a dosagem de ALA-D em sangue como indicador na exposição ao chumbo**. 2004. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SAXENA, G.; FLORA, S. J. Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 18, n. 4, p. 221-33, 2004.

SCHULTE, P. A. Contribution of Biological Markers to Occupational Health. **Am. J. Ind. Med.**, v. 20, p. 435-446, 1991.

SCHÜTZ, A.; SKERFVING, S.; RANSTAN, J. *et al.* Kinetics of Lead in Blood After the End of Occupational Exposure. **Scand. J. Work Environ. Health**, v. 13, p. 221-231, 1987.

SCHWARTZ, J.; LANDRIGAN, P. J.; BAKER JUNIOR, E. L.; ORENSTEIN, W. A.; von LINDERN, I. H. Lead-induced Anemia: Dose response Relationship and Evidence for a Threshold. **Am. J. Publ. Health**, v. 80, n. 2, p.165–168, 1990.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aqua. Toxicol.**, v. 76, p. 111-121, 2006.

SILVA FILHO, M. V. **Sensibilidade in vitro da acetilcolinesterase cerebral ao metil-paraoxon como critério de avaliação toxicológica em peixes**. 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SIQUEIRA, M. E. P. B. de; MAIA, P. P.; OLIVEIRA, D. P. de; LUENGO, D. M. L. Delta- Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in the General Population of Southern Minas Gerais, Brazil. **Industrial Health**, v. 41, p. 19-23, 2003.

SKERFVING, S. Inorganic Lead. In: BEIJE, B; LUNDBERG, P; eds. **Criteria Documents from the Nordic Expert Group**. 1992. Sweden, Stockholm: Arbete och Hälsa, 1993. p. 125-238.

TERAYAMA, K. Effects of Lead on Electrophoretic Mobility, Membrane Sialic Acid, Deformability and Survival of Rat Erythrocytes. **Ind. Health**, v. 31, p.113–126, 1993.

TONG, S.; SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTOL, T. Environmental Lead Exposure: A Public Health Problem of Global Dimensions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1068–1077, 2000.

VAN DYK, J.C.; PIETERSE, G.M.; VAN VUREN, J.H.J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 432–440, 2007.

WATERSTRAT, P. R.; PINKHAM, L. Evaluation of Eugenol as an Anesthetic for the American Lobster *Homerus americanus*. **Journal of The World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 420-424, set. 2005.

WETMUR, J. G.; BISHOP, D.; CANTELMO, C.; DESNICK, R. J. Human d-Aminolevulinate Dehydratase: Nucleotide Sequence of a Full-length cDNA Clone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 7703-7701, 1986.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report 1995: Bridging the gaps**, Switzerland, Geneva, 1995. 123p.

WIGFIELD, D. C.; FARANT, J. P. Assay of d-Aminolevulinate Dehydratase in 10ml of Blood. **Clinical Chems.**, v. 27, n. 1, p. 100-103, 1981.

WU, S. M.; DENG, A.-N. Effect of Cadmium on Hematological Functions in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 76, p. 891-898, 2006.