

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA**

**RATO COMO MODELO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A EFLUENTES DE CURTUMES:
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

Felipe dos Santos Moysés

Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para
obtenção do Título de Mestre.

Porto Alegre

2010

...eu venho a tempos de lua
minguando sonhos assim:
Os que eu posso, sonho aos poucos
os que eu não posso, dou fim...

(Gujo Teixeira)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Ionara Rodrigues Siqueira que foi mais que orientadora ao me acolher no seu laboratório. Nos conhecemos num dos momentos mais complicados da minha vida, e devido ao seu incentivo hoje estou aqui. Além disso, sempre foi um exemplo de profissional e de pessoa.

Ao Prof. Marco Antônio Siqueira Rodrigues, pois sua ajuda e disponibilidade foi fundamental para que este trabalho tenha sido cumprido.

Ao Prof. Carlos Alexandre Netto pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

À Marta, Fabíola, Caroline e ao Eduardo que sempre auxiliaram da melhor forma possível. Pela atenção e comprometimento de vocês com o nosso grupo.

À Profa. Iraci Torres e ao Prof. Cláudio Natalini que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao Prof. Marcelo Grillo que foi muito importante na minha orientação no estágio didático. A sua amizade e confiança deixou-me mais seguro nessa etapa da minha formação.

Aos colegas de laboratório, que antes de qualquer coisa sempre foram grandes amigos. Karine, Vivi, Jupi, Eduardo, Daia, Chris, Mari, Lucas, Gisele, Nanis, Cláudia, Paula, Fran, Pedro, Liciane e Joana. A ajuda e o companheirismo de vocês foi o que mais me motivou e me deu força nesta jornada.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), em especial às Profas. Ilma e Maria Flávia.

Aos professores do Departamento de Fisiologia que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Às secretarias do Curso de Pós-Graduação Alice e Sílvia e ao Lucas.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia Ângela e Jane, que juntamente com a Ieda sempre estiveram dispostas a ajudar.

Aos meus colegas de mestrado.

Ao meu pai, Bady, e minha mãe, Patrícia, que sempre estiveram ao meu lado mesmo fisicamente estando distantes. Por me ensinarem que, com persistência e perseverança se alcança tudo na vida.

À Ana Laura, ao Brae e ao Eduardo, por serem meus “pilares” nas horas em que mais precisei.

Aos meus avôs Ciro, Taís, Bady e Emara, pois a vocês devo tudo do que sou hoje. Vocês sempre serão exemplos pra mim.

À Érica, com seu carinho apoio foi a pessoa que mais me ajudou e me motivou no período de “maior turbulência” nestes dois anos.

Ao tio Bira, à tia Neca por terem me acolhido e me ajudado no início de minha “vida” em Porto Alegre.

Aos meus tios e tias, que de uma forma ou de outra sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus primos, em especial Thyago e Fernanda vocês foram e sempre serão muito especiais na minha vida.

Ao Beto e ao Birinha que me deram oportunidades aqui em Porto Alegre. Se não fosse por vocês tudo seria mais difícil.

À todos os meus amigos, em especial, Karine, Vivi, Antônio, Ana Paula, Athos, Bebel, Musa, Gui Goulart, Camila, Gui Lazaroto , Eduardo, Vanessa, Ivan, Gustavo, Rafa, Nádia, Lidi, Tainá, Zidane, Victor, Régis, Eliete e Pati. Minha gratidão a vocês é eterna.

À Lara pelas suas excelentes aulas de inglês, sua disponibilidade e amizade.

A CAPES, pela Bolsa.

A todos que de contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. EFLUENTES DE CURTUME	3
1.2. TRATAMENTO FOTOELETROQUÍMICO	4
1.3. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS	5
1.4. TOXICOLOGIA AMBIENTAL E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS	6
1.5. EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS A EFLUENTES DE CURTUME	6
1.6. RADICAIS LIVRES E ESTRESSO OXIDATIVO	7
1.7. SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. EFLUENTES	14
3.2. ANIMAIS E EXPOSIÇÃO AOS EFLUENTES	15
3.3. AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE	15
3.3.1. TESTES COMPORTAMENTAIS	15
3.3.1.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE	16
3.3.1.2. MODELOS COMPORTAMENTAIS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA	17
3.3.1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO	18
3.3.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE NEUROTOXICIDADE	18

3.3.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	18
3.3.2.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	19
3.3.2.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS	19
3.4. AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE	20
3.4.1. ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE HEPATOTOXICIDADE E DE PARÂMETROS OXIDATIVOS	20
3.4.1.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	20
3.4.1.2. MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA	20
3.4.1.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO	21
3.5. DOSAGEM DE PROTEÍNA	21
3.6. ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	22
4.1. NEUROTOXICIDADE	23
4.1.1. TESTES COMPORTAMENTAIS	23
4.1.2. ATIVIDADE DA AChE	31
4.1.3. ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS	32
4.2. HEPATOTOXICIDADE	36
4.2.1. MARCADORES DE LESÕES HEPÁTICAS E ALBUMINA	36
4.2.2. ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
AST	aspartato aminotransferase
CAT	catalase
CETSB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CYP	citocromo P-450
DBO ₅	demanda biológica de oxigênio
DCF	diclorofluoresceína oxidada
DCFH-DA	diclorofluoresceína diacetato
DL ₅₀	dose letal em 50% dos indivíduos
DQO	demanda química de oxigênio
DTNB	ácido 5-5'-ditio-bis2-nitrobenzóico,
EO	estresse oxidativo
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
LPO	lipoperoxidação
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

RESUMO

O desenvolvimento industrial é um dos principais responsáveis pela contaminação das águas. A indústria do curtume é uma das maiores poluidoras, e seus efluentes possuem elevadas concentrações de substâncias químicas tóxicas, tais como sais de cromo e sulfetos. O tratamento fotoeletroquímico é uma alternativa para o tratamento deste efluente, com intuito de reduzir sua toxicidade. A exposição a poluentes pode estar associada ao aumento de risco de desenvolver doenças degenerativas como a Doença de Alzheimer e Parkinson. Estudos ecotoxicológicos utilizando mamíferos como animais de experimentação são raríssimos, assim os dados de toxicidade de efluentes nesta classe são escassos. Este trabalho teve como objetivo estudar a neurotoxicidade e hepatotoxicidade induzida pela exposição crônica a efluentes de curtume. Ratos Wistar machos foram submetidos ao tratamento crônico a efluentes de curtume (30 ou 45 dias), com ou sem tratamento fotoeletroquímico, adicionados à água de beber. Durante a exposição foram realizados testes em modelos comportamentais de ansiedade (labirinto em cruz elevado, neofagia, teste do campo aberto e transição claro-escuro), depressão (nado forçado) e memória (esquiva inibitória, reconhecimento de objetos e esquiva discriminativa). Após esse período as estruturas cerebrais hipocampo, cerebelo e estriado foram utilizadas avaliar para o dano oxidativo nos ensaios: determinação do conteúdo de radicais livres (DCF), medida de lipoperoxidação (TBARS) e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada nas estruturas cerebrais hipocampo e estriado. A hepatotoxicidade foi avaliada através do estado oxidativo celular no fígado através dos ensaios DCF, TBARS e atividade da enzima catalase (CAT) e dos níveis séricos de marcadores de lesões hepáticas: albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Nossos resultados mostram que a exposição crônica a efluentes de curtumes com ou sem tratamento fotoeletroquímico em ratos, não apresentou alterações nos testes de neurotoxicidade e hepatotoxicidade. Isto sugere que ratos não são bons modelos para estudos ecotoxicológicos com efluentes de curtume. Estudos semelhantes são necessários para determinar a susceptibilidade de diferentes espécies a contaminantes.

ABSTRACT

Industrial development is one of the biggest responsible of water contamination. The tanning industry is one of the major polluters, and its effluents have high concentrations of toxic chemicals such as chromium salts and sulfides. The photoelectrochemical treatment is an alternative for the treatment of effluent as the goal to reduce their toxicity. Exposure to pollutants may be associated with increased risk of developing degenerative diseases as Alzheimer's and Parkinson's. Ecotoxicological studies using mammals as experimental animals are rare, so the effluent toxicity data in this class are scarce. This work aimed to study neurotoxicity and hepatotoxicity induced by chronic exposure to tannery effluent. Male Wistar rats were subjected to chronic treatment of tannery effluents (30 or 45 days) with or without photoelectrochemical treatment, added to drinking water. During the exposure, tests were performed on behavioral models of anxiety (elevated plus-maze, neophobia, open field and light-dark box), depression (forced swimming) and memory (inhibitory avoidance, novel object and discriminative avoidance). After this period the brain structures hippocampus, cerebellum and striatum were used to assess oxidative damage in the tests: determination of free radical content (DCF), a measure of lipid peroxidation (TBARS) and activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD). The activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was assessed in brain structures hippocampus and striatum. Hepatotoxicity was assessed by the cellular oxidative state in the liver through the tests DCF, TBARS and the enzyme catalase activity (CAT) and serum markers of liver damage: albumin, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Our results show that chronic exposure to tannery effluent with or without photoelectrochemical treatment on rats, showed no changes in tests of neurotoxicity and hepatotoxicity. This suggests that rats are not good models for ecotoxicological studies with tannery effluents. Similar studies are needed to determine the susceptibility of different species to contaminants.

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos agentes químicos oriundos de fontes antropogênicas torna-se uma questão premente de saúde pública. Várias das ações humanas resultam no lançamento de substâncias químicas nos diversos compartimentos do meio ambiente. Com o crescimento da população, a industrialização, o desenvolvimento tecnológico e o uso de praguicidas e fertilizantes na agropecuária, por exemplo, para a produção de mais alimentos, a quantidade de substâncias liberadas tornou-se de tal proporção, que atualmente há necessidade de medidas adequadas de controle, de modo a minimizar situações que acabem por desequilibrar o ecossistema.

A aplicabilidade do monitoramento ambiental supera os limites do uso de indicadores ambientais de exposição, os quais estimam apenas pontualmente os níveis de poluição, já que a maioria dos compostos tem tempo de meia-vida curto, necessitando de amostragens freqüentes. Assim, analisar a identificação e quantificação de elementos tóxicos em conjunto com uma avaliação dos mecanismos de interação entre os elementos químicos e seus alvos biológicos torna-se uma estratégia importante. Certamente, há a necessidade de avaliação de parâmetros químicos, por exemplo, das formas químicas, como os três estados de oxidação do mercúrio, que diferem consideravelmente quanto à toxicidade (Lobinski, 1997; Apostoli, 1998).

O estudo da interação entre xenobióticos e diversos constituintes biológicos, que permitam reconhecer alterações moleculares mínimas, é uma alternativa importante para o monitoramento ambiental (Lobinski, 1997). Variações bioquímicas em organismos vivos têm sido sugeridas como indicadores de exposição química por diferentes razões. Considerando que a toxicidade é mediada por processos biológicos, uma resposta em nível bioquímico detectada previamente pode, teoricamente, preceder efeitos em proporções maiores e mais drásticas. Aparece como promissora a utilização da avaliação de dano em macromoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos. Conceitualmente, esta perspectiva está próxima de se tornar indicador ideal para a avaliação de risco, pois podem fornecer uma medida integrada da exposição, representam, em geral, efeitos precoces e possivelmente reversíveis, abrindo uma janela terapêutica. (Mutti, 1999; Piveta et al. 2001). Conseqüentemente, o monitoramento ambiental é multidisciplinar e agrega diversas áreas do conhecimento, como a química, a biologia molecular, a bioquímica, a toxicologia e a fisiologia, entre outras.

Numa visão global, o aumento da densidade demográfica, seus conseqüentes efeitos impactantes pelo aumento da demanda e deterioração devido à poluição e destruição de mananciais, além da falta de gerenciamento dos recursos hídricos, são os responsáveis pelas previsões de que um terço da humanidade sofra com a falta de água até 2025 (Marengo, 2008). O desmatamento e toneladas de agroquímicos contribuem para a deterioração dos rios. A extensão da contaminação dos rios brasileiros por agroquímicos ainda não foi dimensionada. O lançamento de esgotos sem tratamento nos mananciais é de extrema preocupação, já que o excesso de nutrientes leva a produção de ambientes eutróficos (Moraes e Jordão, 2002; Costa et al. 2006). Com as perspectivas de escassez de água potável, tem sido estipulado que em breve a água terá alto valor econômico, já que a carência de um produto é o que lhe dá o valor econômico.

1.1. EFLUENTES DE CURTUME

O Rio Grande do Sul é um dos principais produtores de couros do Brasil, com cerca de 185 indústrias que processam aproximadamente 14 milhões de peles por ano. Considerando um consumo de 1m^3 de água residuária por pele processada, estima-se um despejo de 14 milhões de m^3 de água por ano (Koetz et al., 1994)

As peles são transformadas em couro através de diversos processos químicos e mecânicos (Pacheco, 2005). A produção do couro compreende, geralmente, três grandes etapas:

A *operação de ribeira* tem por finalidades a limpeza e a eliminação das diferentes partes e substâncias das peles que não irão constituir os produtos finais, bem como preparar sua matriz de fibras colagênicas, para reagir adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes. Nessa etapa são feitos os chamados “banhos” e o “descarne” para remover fisicamente impurezas aderidas à superfície interna das peles, como gorduras, carnes e apêndices.

O *curtimento* é um processo que consiste na transformação das peles, pré-tratadas na ribeira, em materiais estáveis e imputrescíveis, ou seja, a transformação das peles em couros.

O *acabamento*: visa complementar o curtimento bem como conferir a base de algumas propriedades físicas e mecânicas desejáveis aos couros, como cor básica, resistência à tração, impermeabilidade e flexibilidade, através de processos mecânicos e de secagem das peles (Pacheco, 2005).

Em todos esses processos por via úmida são adicionadas grandes quantidades de produtos químicos, e nas diferentes etapas do processo originam-se banhos residuais contendo diversos tipos de contaminantes químicos. As águas das *operações de ribeira* são fortemente alcalinas e esbranquiçadas (cal em excesso) e contêm tecido muscular, gordura e sangue, em suspensão, sais (principais ânions - sulfeto, sulfato, cloreto; principais cátions - sódio, cálcio, amônio), proteínas. Os efluentes líquidos provenientes do *curtimento* contêm, principalmente, cloreto de sódio, ácidos minerais (sulfúrico, clorídrico), orgânicos (lático e fórmico), cromo e/ou taninos (orgânicos polifenólicos). O efluente proveniente do *acabamento*, normalmente apresenta certo teor de cromo, sais diversos, cores diversas devido aos corantes utilizados no tingimento, muitos à base de anilina, azo-corantes (Pacheco, 2005).

São adotados parâmetros pela Legislação Ambiental Brasileira para a caracterização dos despejos tais como: demanda química do oxigênio (DQO), pH, cor, turbidez, entre outros. Além de elevadas taxas desses parâmetros, o efluente proveniente do curtume possui elevadas concentrações de substâncias químicas tóxicas, como sais de cromo e sulfetos (Tariq et al., 2005; Prabakaran et al., 2007). Estes dados demonstraram um alto grau de contaminação, com potencial de risco para a população que utiliza essas águas (Oliveira e Nozaki, 2002).

1.2. TRATAMENTO FOTOELETROQUÍMICO

Nas últimas décadas, várias técnicas têm sido desenvolvidas devido à necessidade de uma maior eficiência no tratamento de efluentes industriais.

Os processos eletroquímicos surgem como métodos alternativos ao tratamento de efluentes industriais. A eletrodialise se destaca entre estes processos aplicados, pois comparada com métodos convencionais tem a vantagem de não gerar iodo e possibilita o reaproveitamento dos compostos e da água. No caso do efluente do curtume, o excesso de carga orgânica interfere no processo da eletrodialise, havendo então a necessidade de degradação prévia da matéria orgânica. Para contornar este problema, uma alternativa é o processo

denominado fotoeletrooxidação. O processo fotoeletroquímico consiste na combinação dos dois processos oxidativos avançados (Xavier, 2006). Estes processos são baseados na geração do radical hidroxila o qual têm um alto poder oxidante e pode promover a degradação de vários compostos poluentes. Vários processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, geralmente utilizando o ozônio, peróxido de hidrogênio, fotocatalise e Reagente de Fenton.

A utilização do processo fotoeletroquímico se mostrou bastante eficaz na redução de DQO, cor e fenóis, no tratamento de efluentes provenientes da indústria de papel e celulose (Beratzzoli e Pelegrini, 2002), e foi capaz de remover a matéria orgânica (expressa em DQO) em mais de 60% tratamento de efluentes de curtume (Rodrigues et al. 2004).

1.3. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os estudos de toxicidade de substâncias no meio aquático têm se limitado ao uso de organismos representativos de cada nível trófico como bactérias, algas (ex. *Chlorella pyrenoidosa*, *Microcystis aeruginosa*), micro-crustáceos (ex. *Daphnia pulex*, *Daphnia magna*, *Gammarus lacustris*) e peixes (ex. *Carassius auratus*, *Gambusia affinis*). Estes organismos são adequados para determinação, por exemplo, de letalidade, contudo carecem de avaliação de outros aspectos, sinais e sintomas, que podem ser encontrados em mamíferos.

Um estudo realizado na Turquia demonstrou que diferentes processos de manejo dos efluentes de curtume, o processo de coagulação/floculação, o biológico e o lodo seco, mantém relativa teratogenicidade das espécies de ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividius* e *Spharechinus granularis*, além de provocar imobilidade de *D. magna* e redução do crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* (Oral et al., 2007). Foi demonstrada a genotoxicidade, utilizando *Allium cepa* (“cebola”) de amostras de água e de sedimento de rio contaminado em Estância Velha com efluentes de curtume e descargas domésticas, além de testes ecotoxicológicos com *D. magna* e *Ceriodaphnia dubia* (Mitteregger Júnior et al., 2007).

Estudos ecotoxicológicos utilizando mamíferos como animais de experimentação são raríssimos, assim os dados de toxicidade de efluentes nesta classe são escassos, é essencial ponderar que estes estudos podem ter aplicação tanto em seres humanos quanto outras espécies da classe *Mammalia*

que utilizam corpos d'água com despejo de efluentes como fonte de água de consumo. Além de que, os efeitos tóxicos nos organismos mais complexos não se limitam à genotoxicidade e letalidade, outros impactos podem ser observados, como hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Para que seja possível observá-los, modelos experimentais mamíferos devem ser executados.

1.4. TOXICOLOGIA AMBIENTAL E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Há evidências epidemiológicas que sugerem uma forte associação entre a toxicologia ambiental e transtornos psiquiátricos (Jaga e Dharmani, 2007).

Vários autores têm relacionado o uso crônico de agrotóxicos, em especial os organofosforados, a sintomas depressivos. A depressão é um achado constante dentre os suicidas. Possíveis relações causais (uso de agrotóxicos induzindo a depressão, que leva ao suicídio) não possuem comprovação científica. A alta mortalidade por suicídio pode refletir as condições de vida desta população e/ou a exposição a pesticidas tóxicos que causariam um estado depressivo disparado por mecanismos neuroendócrinos (Pickett et al., 1998).

O Rio Grande do Sul (RS) é o estado com maiores taxas de suicídio no País. Um interessante estudo ecológico, desenhado para investigar o alto índice de suicídio em regiões produtoras de tabaco do RS, demonstrou que trabalhadores da agropecuária e da pesca teriam maiores coeficientes de mortalidade por suicídio (Meneghel et al., 2004). O dado de alto índice de mortalidade por suicídio em trabalhadores da pesca pode estar sendo negligenciado e pode indicar e justificar estudos ecotoxicológicos.

Fowle e colaboradores (1996) sugerem que algumas doenças do Sistema Nervoso Central de alta incidência na população em geral, como transtornos de ansiedade e depressão, podem estar relacionadas à exposição a contaminantes.

1.5. EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS A EFLUENTES DE CURTUME

Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa sugerem que a exposição ao efluente de curtume durante 21 dias com diferentes concentrações na água de beber, induz um estado de ansiedade em camundongos, enquanto que o efluente tratado não alterou os estados de ansiedade e depressão. O efluente bruto aumentou significativamente o tempo gasto no braço fechado e

apresentou uma tendência à redução no tempo gasto no braço aberto no labirinto em cruz elevado, demonstrando um perfil ansiogênico do tratamento (Vanzin et al., 2006).

Estes dados indicam que estudos de avaliação de risco da exposição a contaminantes à saúde mental podem ser avaliados como potenciais biomarcadores, mostrando a importância do tratamento de efluentes industriais. Contudo há a necessidade de avaliar o efeito da exposição dos efluentes em outras espécies de animais de experimentação, além da utilização de diferentes modelos animais, em especial de ansiedade.

Além de que, o tratamento crônico de camundongos com efluentes de curtume induziu alterações importantes no estado oxidativo celular. O tratamento aumentou significativamente o conteúdo de radicais livres no fígado e o dano em lipídeos nas estruturas cerebrais avaliadas, além de que reduziu o conteúdo de resíduos de tirosina e de triptofano em hipocampo, indicando um aumento no dano em proteínas, e reduziu a capacidade antioxidante total em hipocampo, córtex frontal e fígado, sugerindo uma maior susceptibilidade a eventos oxidativos. Enquanto que a exposição a efluentes submetidos à fotodegradação eletroquímica induziu menor modificação no estado oxidativo tecidual, pois diminuiu significativamente o conteúdo de radicais livres no fígado e o dano em lipídeos nas estruturas cerebrais avaliadas, quando comparado com efluente não tratado. É importante destacar que o tratamento com o efluente submetido à fotodegradação eletroquímica não alterou os níveis de aminoácidos aromáticos e da capacidade antioxidante total, modificações observadas com o tratamento com efluente não-tratado.

Estudos epidemiológicos têm sugerido que a exposição a poluentes está associada ao aumento de risco de desenvolver doenças degenerativas (Kehrer, 1993) como as doenças de Parkinson e Alzheimer. O estresse oxidativo induzido pela exposição aos efluentes pode, pelo menos em parte, estar associado à suscetibilidade a doenças neurodegenerativas (Kedar, 2003; Mariani et al., 2005; Dos Santos, 2009).

1.6. RADICAIS LIVRES E ESTRESSO OXIDATIVO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. É este não-

emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo e também em situações não-fisiológicas, como por exemplo, a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de oxigênio (Ross e Moldeus, 1991; Dos Santos, 2009).

Destacamos, dentre os radicais livres e as moléculas que dão origem a radicais livres: *radical superóxido*, *peróxido de hidrogênio* (H_2O_2), o altamente reativo radical *hidroxila*, os radicais peroxil, alcoxil e o óxido nítrico, o óxido nitroso e o peroxinitrito. Em excesso podem apresentar efeitos prejudiciais tais como lipoperoxidação (LPO) e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1992; Siqueira, 2002. Barreiros et al., 2005).

O organismo possui um sistema antioxidante, enzimático e não-enzimático, que não atuam isoladamente, mas interagem e se regeneram em um complexo sistema de ciclos. Como exemplos de proteção não enzimática, temos a vitamina E (tocoferol), a vitamina C (ascorbato ou ácido ascórbico), a glutatona e o ubiquinol. A proteção enzimática é composta pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), entre outros (Haramaki et al., 1998).

A condição de desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e o sistema antioxidante protetor é denominada de estresse oxidativo (EO) (Halliwell, 1992). O cérebro devido a sua alta taxa de atividade oxidativa metabólica, ao seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e aos níveis moderados de moléculas antioxidantes, apresenta certa vulnerabilidade ao EO (Evans, 1993).

Sabe-se que o EO está relacionado a muitas desordens neurológicas como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (Meydani et al., 2001; Kedar, 2003; Mariani et al., 2005; Dos Santos, 2009), assim como a neurotoxicidade induzida pela exposição à xenobióticos (Kehrer, 1993).

1.7. SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICO

O sistema colinérgico é fundamental em muitas funções vitais do organismo, sendo a acetilcolina (ACh) o neurotransmissor mais importante. Após a liberação da ACh na fenda sináptica ou junção neuromuscular ela se liga à receptores específicos que podem ser nicotínicos (canais iônicos) ou

muscarínicos (associados a proteína G), e sofre hidrólise pelas enzimas colinesterases (Figura 1). Estas enzimas desempenham papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (Massoulié et al., 1993). Acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (Taylor e Brown, 1999).

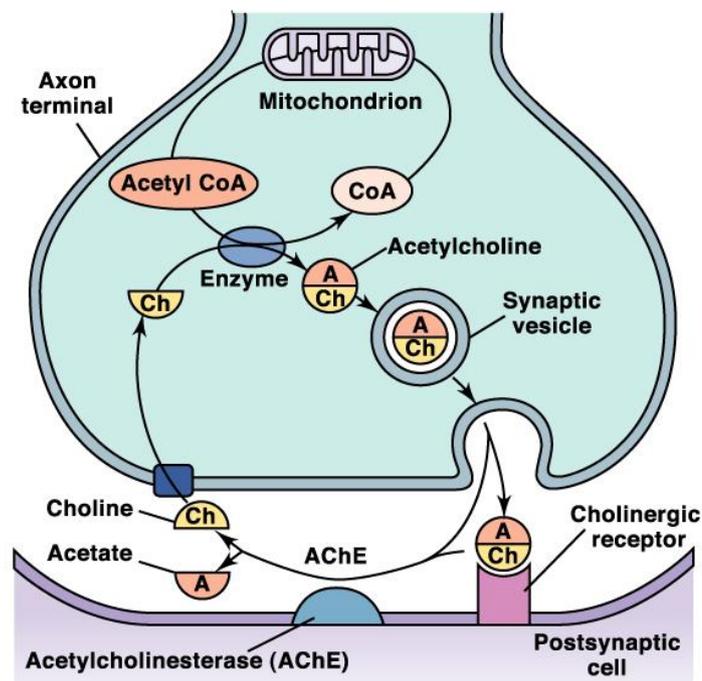


Figura 1. Liberação e degradação da ACh pela AChE na sinapse colinérgica (Silverthorn, 2003).

No sistema nervoso central, o neurotransmissor ACh está relacionada ao processo cognitivo (atenção, aprendizado e memória) na recompensa e motivação, no processamento de estímulos, na participação no processo de sono e vigília, na organização cortical do movimento e no controle do fluxo sanguíneo cerebral (Mesulam et al., 2002; Moretto et al., 2004). Tem sido estudado o papel da ACh no comportamento emocional, e algumas evidências sugerem que uma disfunção na transmissão colinérgica pode estar envolvida em sintomas

patológicos depressivos.

Compostos organofosforados, utilizados amplamente como pesticidas, causam inibição da enzima AChE levando à perda da homeostase colinérgica, causando inúmeros distúrbios neuroquímicos, neurocomportamentais e neuromorfológicos podendo refletir em desordens neuropsiquiátricas, como alterações locomotoras, ansiedade, depressão, perda de memória e déficits de aprendizagem (Eyer, 1995; Slotkin, 2004; De Silva, 2006).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito da exposição a efluentes industriais, particularmente efluentes de curtume, sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos. Considerando que estudos prévios com camundongos expostos aos efluentes demonstraram neurotoxicidade, nossa hipótese geral é de que esta exposição levaria a um aumento da sensibilidade a eventos patológicos.

2.1. OBJETIVO GERAL

I. Estudar a neurotoxicidade e hepatotoxicidade induzida pela exposição crônica a efluentes a curtume utilizando ratos Wistar.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Investigar o efeito da exposição a efluentes de curtume em respostas comportamentais de ansiedade, depressão e aprendizado e memória em ratos.

II. Estudar o efeito neurotóxico avaliando a atividade da acetilcolinesterase e o estado oxidativo celular em estruturas cerebrais de ratos expostos a efluentes de curtume.

III. Avaliar a hepatotoxicidade induzida por efluentes de curtume através da determinação do estado oxidativo celular e dos níveis séricos de marcadores de lesões hepáticas em ratos.

V. Avaliar o efeito do tratamento fotoeletroquímico de efluentes de curtume sobre a neurotoxicidade e a hepatotoxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EFLUENTES

Os efluentes de curtume, com ou sem tratamento fotoeletroquímico, foram disponibilizados pelo Professor Dr. Marco Antônio Siqueira Rodrigues do Centro Universitário Feevale. O processo fotoeletroquímico consiste na combinação de dois processos oxidativos avançados: eletrólise e fotocatalise heterogênea, ou seja, percolação da solução a ser tratada, através de um reator eletrolítico onde o ânodo, permanece sob incidência de radiação ultravioleta. Nesse processo, estão envolvidos a incidência de fótons e a descarga de elétrons (Xavier, 2006). Na Tabela 1 estão expressos dados da análise do conteúdo dos efluentes de curtume antes e depois do processo fotoeletroquímico (Dados inéditos: Marco Antonio Siqueira Rodrigues).

Parâmetro	Efluente Não Tratado	Efluente Tratado	Unidade Metodologia
Cloretos	1725,1 mg L-1	203,7 mg L-1	Titulometria
DBO5	205,0 mg O2 L-1	10,0 mg O2 L-1	Manometria
DQO	683,2 mg O2 L-1	24,8 mg O2 L-1	Titulometria
Fósforo Total	0,391 mg L-1	0,075 mg L-1	Colorimetria
Nitrogênio total Kjeldahl	148,53 mg L-1	2,60 mg L-1	Titulometria
Cálcio	119,750 mg L-1	23,656 mg L-1	Espectrofotometria de absorção atômica (EAA)
Cromo	0,080 mg L-1	0,022 mg L-1	Espectrofotometria de absorção atômica (EAA)

Tabela 1: Caracterização do efluente de curtume (com ou sem tratamento fotoeletroquímico). DBO5: Demanda Biológica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio.

3.2. ANIMAIS E EXPOSIÇÃO AOS EFLUENTES

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 2-3 meses, pesando entre 200 e 300 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais foram mantidos em condições padrão com líquido e comida *ad libitum* e aclimatizados com ciclo de 12 horas de luz/escuro, com cinco ratos por caixa (390 x 320 x 170 mm³) com maravalha.

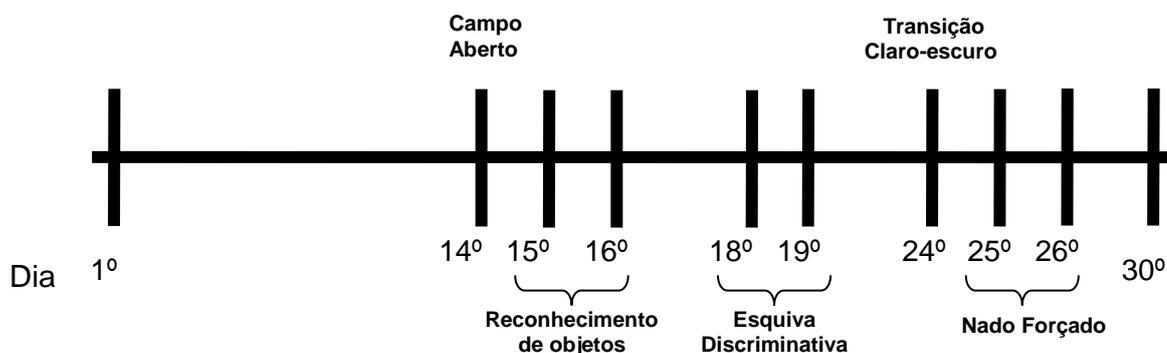
Os ratos foram expostos cronicamente (30 ou 45 dias, respectivamente Fig. 2a e 2b) aos efluentes de curtumes com ou sem tratamento fotoeletroquímico na ingestão de água. Foram considerados os seguintes grupos experimentais (n=15): controle (água), submetidos a efluentes brutos (sem tratamento) em diferentes concentrações (0,1%, 1% e 5%) e submetidos a efluentes tratados (com tratamento fotoeletroquímico) em diferentes concentrações (0,1%, 1% e 5%).

3.3. AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE

3.3.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

Durante a administração crônica os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais de ansiedade, depressão e de aprendizado e memória conforme a figura 2.

a) 30 dias de Tratamento



b) 45 dias de Tratamento

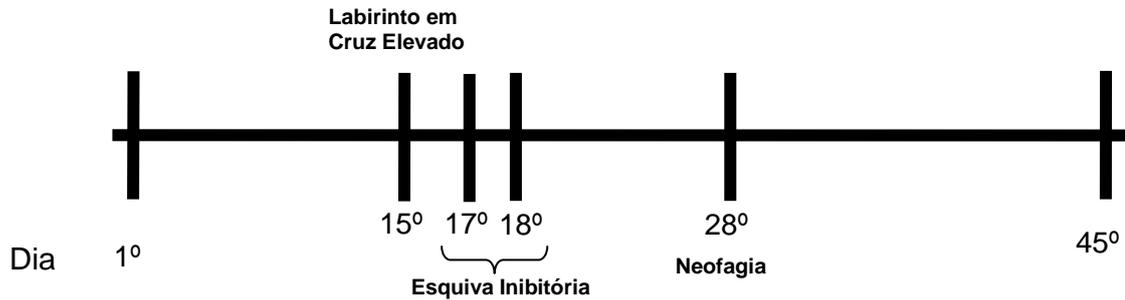


Figura 2. Distribuição temporal dos testes comportamentais (Fig. 2a e 2b, exposição de 30 e 45 respectivamente).

3.3.1.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE

LABIRINTO EM CRUZ-ELEVADO (“ELEVATED PLUS MAZE”): consiste de aparato com 2 braços abertos ($49 \times 10 \text{ cm}^2$) e dois fechados ($49 \times 10 \times 30 \text{ cm}^3$), os braços são ligados por uma plataforma central a uma altura de 50 cm do chão. O número de entradas e o tempo gasto nos braços foram anotados (5 minutos) (Drapier et al., 2007)

TESTE DE NEOFAGIA: os animais foram privados de comida (16 horas), e após colocados em gaiola desconhecida contendo ração habitual, por 30 minutos. Foi avaliado o tempo de latência de chegada e de ingestão de comida, a quantidade em gramas de comida ingerida e o número de pelotas fecais (Soubrié et al., 1975).

TESTE DO CAMPO ABERTO (“OPEN FIELD”): Os animais foram colocados na arena do campo aberto dividida em 12 quadrantes, onde foram observadas, durante 5 minutos, diferentes variáveis comportamentais, a ambulação (número de quadrantes), a latência para iniciar a locomoção, “rearing” (levantar em duas patas), “grooming” (auto-limpeza), número de bolos fecais e período de imobilidade (Pietá Dias et al., 2007).

TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO: O aparato consiste de dois compartimentos, branco e preto, comunicados por uma abertura. O animal foi colocado no centro

do compartimento claro e a latência para a entrada no compartimento escuro foi anotada. Além de que, os animais foram observados durante 5 minutos, para diversos parâmetros comportamentais, ambulação em cada compartimento, “*rearing*” (levantar em duas patas), “*grooming*” (auto-limpeza) e número de bolos fecais. A entrada é definida quando o animal coloca as quatro patas no compartimento (Dimitsantos et al., 2007).

3.3.1.2. MODELOS COMPORTAMENTAIS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA

ESQUIVA INIBITÓRIA: O aparelho utilizado para o treino na tarefa de esQUIVA inibitória consiste em uma caixa de acrílico em que seu assoalho é formado por barras paralelas. No lado esquerdo da caixa há uma plataforma na qual os animais são colocados. No treino, a latência de descida da plataforma do aparato foi anotada, e ao descer (com as quatro patas), o animal recebeu choques de 0,5 mA/3s. Após 24 horas, o procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que, ao descer da plataforma, o animal não recebia choque. O teste de retenção foi avaliado, onde a latência de descida da plataforma foi tomada como índice de memória. Para a sessão teste o tempo máximo de descida era de 180 segundos (Arteni et al., 2002).

RECONHECIMENTO DE OBJETOS: Na arena do campo aberto, os animais foram expostos à tarefa de reconhecimento de objetos. Na sessão treino, os animais eram expostos a dois objetos A1 e A2 (Duplo Lego) idênticos, onde foi avaliado o tempo de exploração de cada objeto. Ao atingir o tempo de exploração de 30 segundos (em ambos os objetos) o animal era retirado da arena. Vinte e quatro horas após o treino (memória de longa duração), o objeto A2 foi trocado por outro (objeto B), sendo avaliado por 5 minutos o tempo de exploração dos objetos. Exploração foi tomada como atos de cheirar e tocar o objeto. O índice de reconhecimento foi calculado para cada animal conforme descrito por Pietá Dias e colaboradores (2007).

ESQUIVA DISCRIMINATIVA: A esQUIVA discriminativa pode ser utilizada como medida de memória, por meio do labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*), do qual consiste em dois braços abertos e dois braços fechados, sendo que um dos braços fechados denominado de aversivo, está acoplado uma campainha de 60

decibéis e uma lâmpada de 100 watts. Na sessão de treino, o animal foi colocado no centro da plataforma voltado para o braço aberto durante dez minutos. Quando o animal entra no braço aversivo, a luz e a campainha foram acionadas até a sua saída. O animal pode explorar a plataforma durante dez minutos no treino. Após 24 horas, o animal foi recolocado no aparelho durante três minutos sem estímulos aversivos (campainha e luz), sendo avaliando a memória de longa duração (Kameda et al., 2007).

3.3.1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO

DESEPERO COMPORTAMENTAL (NADO FORÇADO): Ratos foram colocados em cilindros plásticos contendo 30 cm de água a uma temperatura de 25°C, no tempo de 15 minutos na sessão teste, e de 5 minutos (24 horas depois) na sessão reteste. Registrou-se o tempo total de imobilidade (o tempo que o animal permaneceu flutuando, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água), número de mergulhos e pelotas fecais (Porsolt et al., 1978; Engin et al., 2008).

3.3.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE NEUROTOXICIDADE

3.3.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após o término dos testes comportamentais, os ratos foram decapitados e as estruturas cerebrais – hipocampo, cerebelo e estriado – foram rapidamente dissecadas; o fígado e o soro (extraído através da centrifugação do sangue) também foram obtidos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até a realização dos ensaios.

Para realização dos testes bioquímicos homogeneizados (1:10) as estruturas cerebrais (hipocampo, cerebelo e estriado) foram homogeneizadas tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo 140 mM KCl e 1 mM EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 1000xg durante 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para os testes de determinação de espécies reativas (DCF), medida de lipoperoxidação (TBARS) e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). A atividade da enzima acetilcolinesterase foi determinada nas estruturas cerebrais hipocampo e estriado, homogeneizadas (1:10 e 1:100, respectivamente) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e centrifugados a 1000 xg durante 10 minutos a 4 °C.

3.3.2.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi avaliada *in vivo*, nas estruturas cerebrais hipocampo e estriado, baseado no método de colorimétrico Ellman (1961). As amostras foram incubadas com o reagente de Ellman (ácido 5-5'-ditio-bis2-nitrobenzóico, DTNB) por 30 minutos. Após a determinação do “branco” foi adicionado o substrato da enzima, acetiltiocolina. As absorvâncias correspondentes a intervalos de 30 segundos de reação foram lidas num período de 5 minutos (412 nm). A velocidade da formação do TNB, descontado do branco, foi considerada como atividade da AChE.

3.3.2.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS: realizada através da formação de produtos da modificação oxidativa do “probe” exógeno, 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Lebel et al., 1990). As amostras foram incubadas com DCFH-DA (100 µM) a 37°C durante 30 minutos. A formação do derivativo fluorescente oxidado (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F-2000; Hitachi, Tokyo, Japan).

ÍNDICE DE LIPOPEROXIDAÇÃO: o índice de peroxidação lipídica foi avaliado nas estruturas cerebrais pelo método de detecção indireta de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Yagi (1998), que consiste na incubação com 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida durante 30 minutos em banho-maria. Após isso, n-butanol foi acrescentado à mistura e então esta foi centrifugada. A fase orgânica foi coletada para obter-se a medida da fluorescência nos comprimentos de onda de 515 nm para excitação e 553 nm para emissão.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD): neste ensaio foi avaliada a atividade da enzima SOD nas estruturas cerebrais. Para tanto, foi utilizado o kit RANSOD (Randox Labs., San Diego, CA, USA), que emprega o sistema xantina e xantina oxidase na geração de radical superóxido, que reage com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenoltetrazolium para formar o corante vermelho de formazan, cuja medição é captada a 505 nm a 37°.

3.4. AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE

3.4.1. ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE HEPATOTOXICIDADE E DE PARÂMETROS OXIDATIVOS

3.4.1.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O soro foi utilizado em testes bioquímico para quantificar os níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina e de albumina. O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato, pH 7,4 centrifugado, e o sobrenadante foi utilizado nos testes DCF, TBARS e para avaliar a atividade da enzima catalase (CAT).

3.4.1.2. MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA

NÍVEIS SÉRICOS DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST): neste ensaio, os níveis da enzima AST no soro foram quantificados através do kit (BioDiagnóstica - Laborclin, Paraná, Brasil). A AST promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos através da reação da L-aspartato com o α -cetoglutarato gerando glutamato e oxalacetato. O oxalacetato formado é medido através da formação de hidrazona que tem intensa cor em meio alcalino a 505 nm.

NÍVEIS SÉRICOS DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT): os níveis séricos da enzima ALT foram quantificados através do kit (BioDiagnóstica - Laborclin, Paraná, Brasil). A ALT promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos através da reação da L-alanina com o α -cetoglutarato gerando glutamato e piruvato. O piruvato formado é medido através da formação de hidrazona que tem intensa cor em meio alcalino a 505 nm.

NÍVEIS SÉRICOS DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA: neste ensaio foi utilizado o kit (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil), para quantificação dos níveis séricos da enzima fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional a atividade enzimática, é medida em 590 nm

NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA: O conteúdo de albumina plasmática foi determinado usando reagente verde de bromocresol através do kit (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). Leitura em 630 nm.

3.4.1.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS: a quantificação dos radicais livres no fígado foi determinada pelo método DCF, conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.3.

MEDIDA DE LIPOPEROXIDAÇÃO: as medidas de lipoperoxidação no fígado foram avaliadas pelo método do TBARS conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.3.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT): neste ensaio foi avaliada a atividade da enzima antioxidante CAT pelo método descrito por Aebi (1984), em que as amostras foram incubadas com etanol (10%) e triton (10%). A atividade foi avaliada a 25°C, a fim de determinar a taxa de degradação de H₂O₂ em 10 mM de tampão fosfato (pH 7.0) a 240nm.

3.5. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas totais, nas estruturas cerebrais e no fígado, foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

3.6. ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados e armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel). Foram utilizados procedimentos estatísticos para análise paramétrica e não paramétrica de uso consagrado pela literatura, apoiados em sistemas dedicados (SPSS) instalados nos microcomputadores dos laboratórios e licenciados pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA One Way) ou o teste não paramétrico do Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$ para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. NEUROTOXICIDADE

4.1.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais expostos a efluentes de curtume foram testados em modelos de ansiedade, memória e modelos preditivos de agentes indutores de depressão em ratos expostos cronicamente a efluente de curtume, com ou sem tratamento fotoeletroquímico.

No teste do labirinto em cruz elevado, os animais em estado ansiogênico tendem a ficar mais tempo no braço fechado (Drapier et al., 2007). Neste teste não houve diferença significativa nos tempos de permanência no braço aberto (Fig. 3 A) e fechado (Fig. 3 B) entre os grupos.

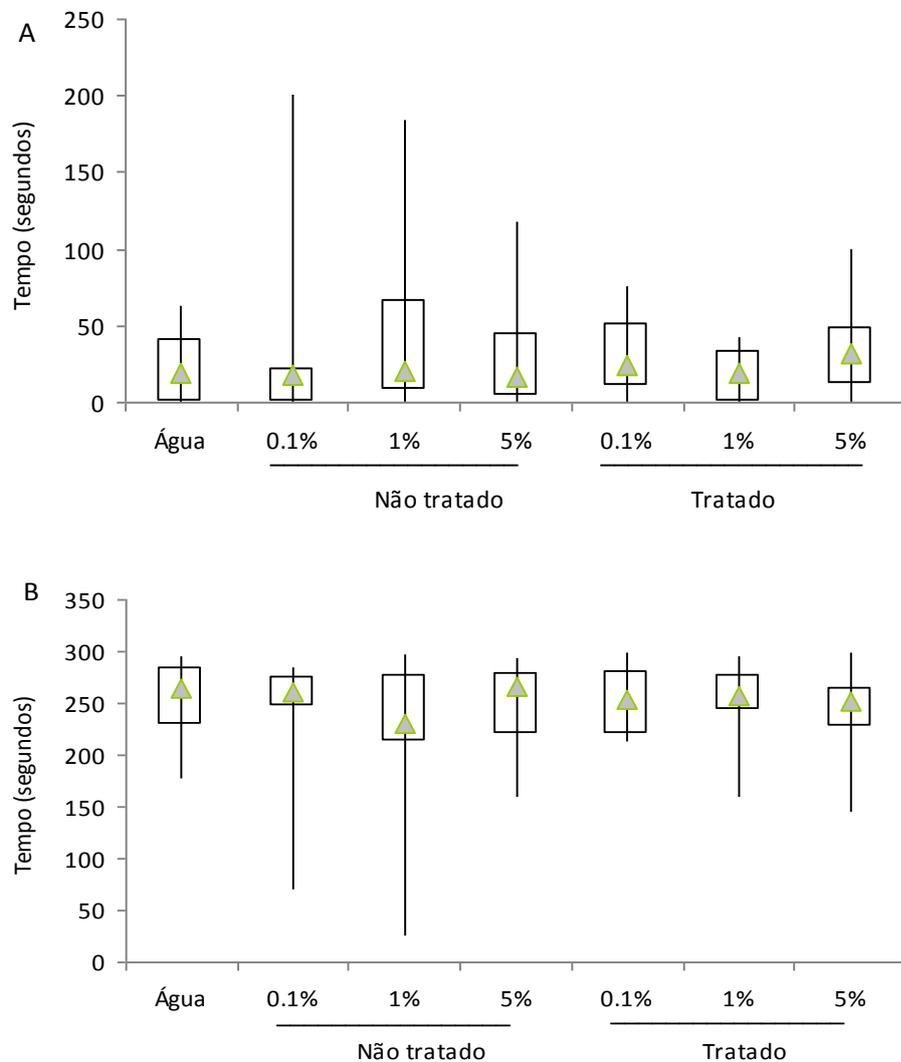


Figura 3. Tempo de permanência em segundos no braço aberto (A) e braço fechado (B) no Teste do Labirinto em Cruz Elevado, expressos em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

No teste da neofagia são avaliados parâmetros de ansiedade. Quando o alimento habitual é apresentado para ratos num ambiente não familiar, os animais consomem pequenas quantidades. Pequenas doses de ansiolíticos diminuem a latência para o primeiro contato e para a ingestão e aumentam o consumo total do alimento. Da mesma forma, animais com sintomas ansiogênicos tendem a ter maior tempo de latência e há diminuição da quantidade de comida ingerida. O tratamento crônico aos efluentes de curtume, com ou sem tratamento fotoeletroquímico, não alterou o tempo de latência para ingestão de comida (Fig. 4 A) nem a quantidade de comida ingerida (Fig. 4 B) em nenhum dos grupos avaliados (Soubrié et al., 1975; Walker e Winn, 2007).

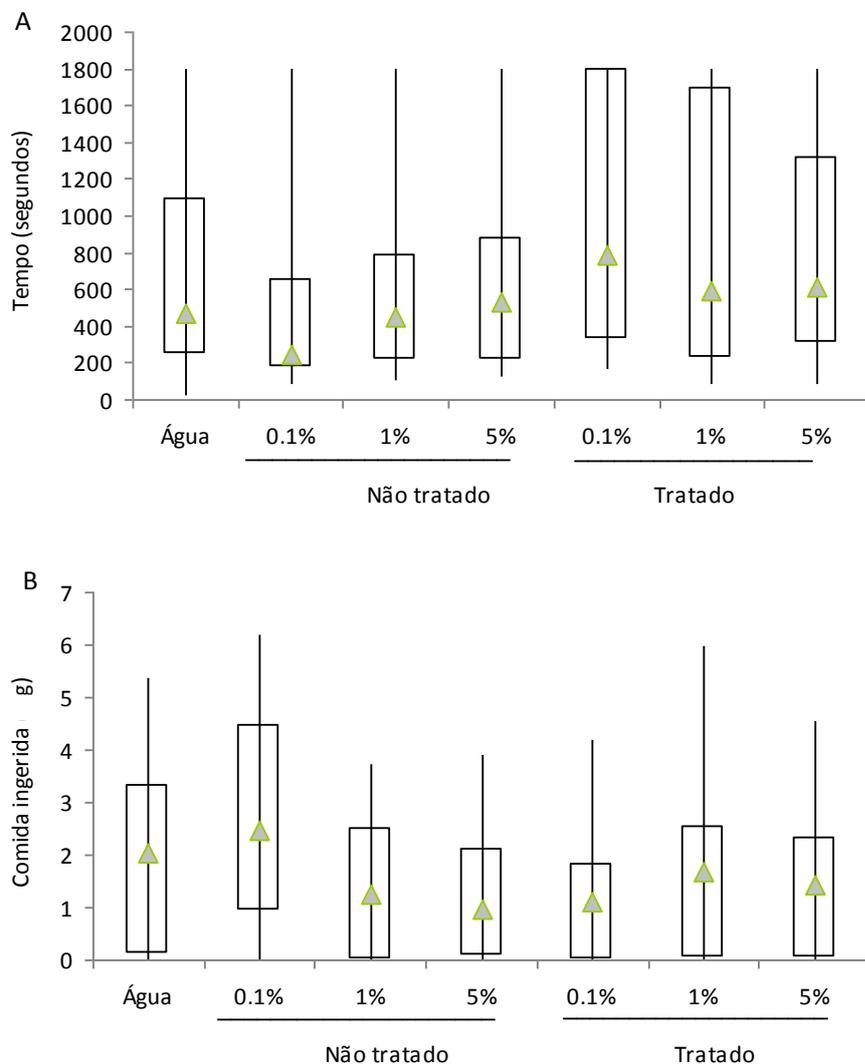
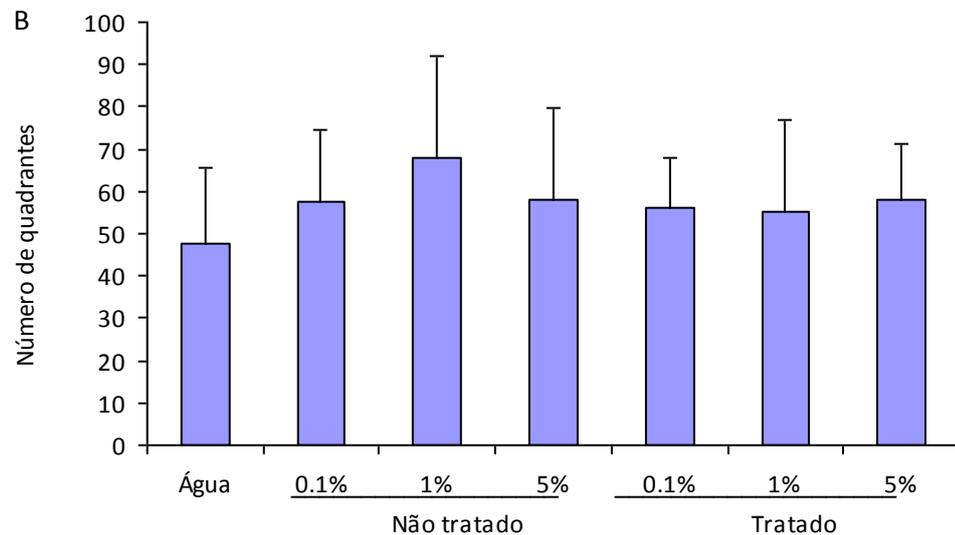
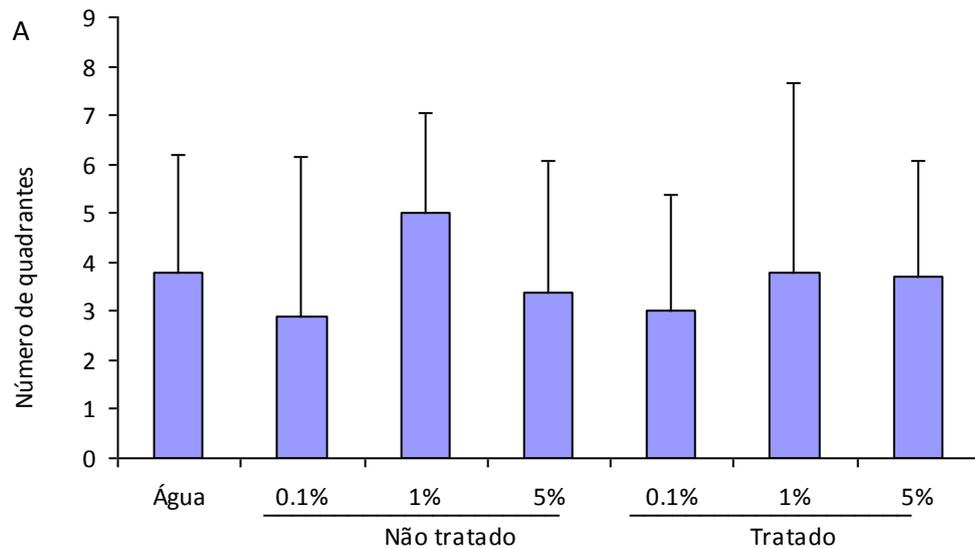


Figura 4: Tempo de latência em segundos para ingestão de comida (A) e quantidade de comida ingerida em gramas (B) no Teste da Neofagia, expressos em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

No teste campo aberto, ratos ao serem colocados em uma arena aberta apresentam comportamentos que demonstram ansiedade. Animais em estado ansiogênico apresentam baixa atividade motora e uma tendência a permanecer nas regiões laterais do equipamento, denominada *tigmotaxia*. Não houve diferença entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados no teste: atividade locomotora nos quadrantes centrais (Fig. 5 A) e laterais (Fig. 5 B), tempo de permanência nos quadrantes centrais (Fig. 5 C) e laterais (Fig. 5 D).



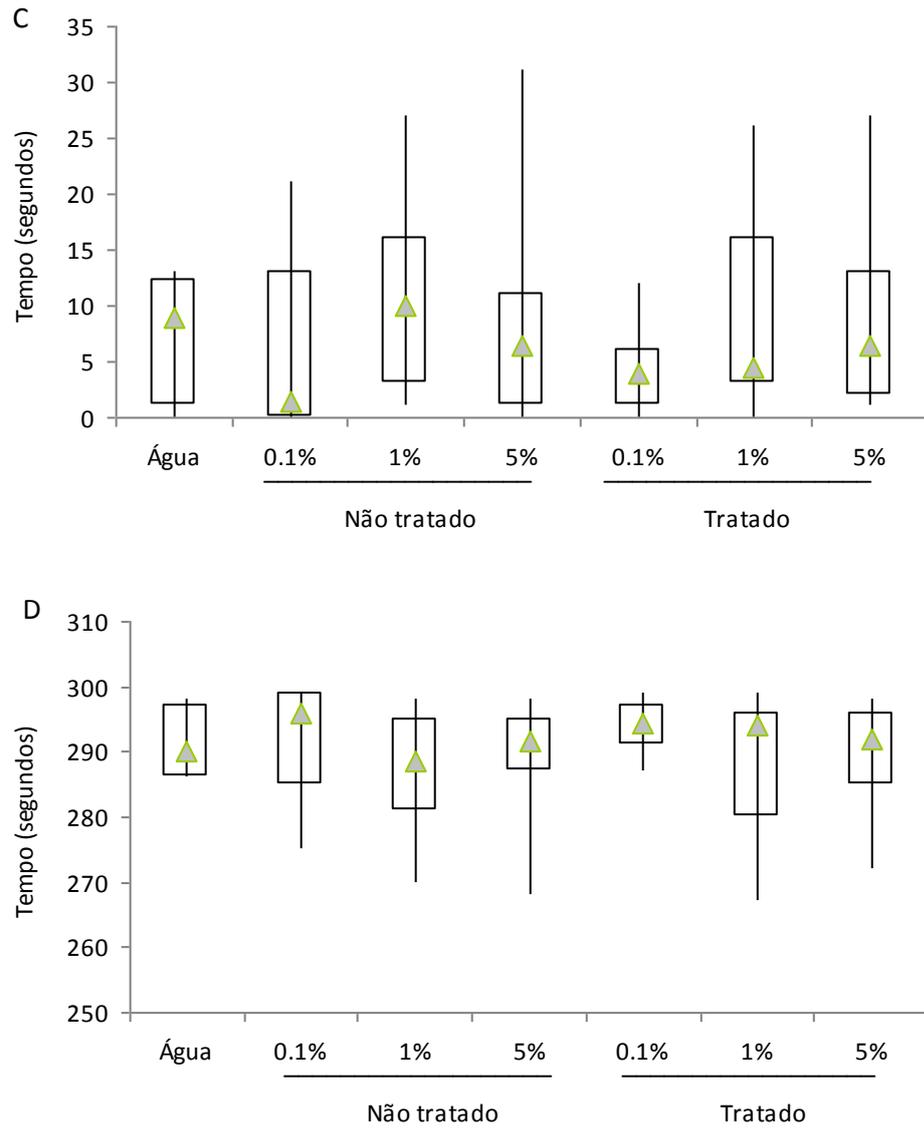


Figura 5: Atividade locomotora nos quadrantes centrais (A) e laterais (B), e tempo de permanência em segundos nos quadrantes centrais (C) e laterais (D) do Campo Aberto (*Open Field*) de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Os gráficos 5A e 5B são expressos em porcentagem do controle (média \pm desvio padrão médio), ANOVA ($p > 0,05$). Os gráficos 5C e 5D são expressos em mediana e intervalos 25-75, Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Outro modelo animal de ansiedade é a caixa claro-escuro. Crawley e Goodwin (1980) utilizaram o número de transições feitas pelos animais entre dois compartimentos de uma caixa, sendo um claro e outro escuro, como índice de ansiedade. Neste teste, a luz (no compartimento claro) funciona como um estímulo ansiogênico, e existe um aparente conflito entre a motivação de explorar e a de evitar o compartimento claro. Não houve diferenças significativas entre os grupos no tempo de permanência nos compartimento claro (Fig. 6 A) e escuro (Fig. 6 B) no teste transição claro-escuro.

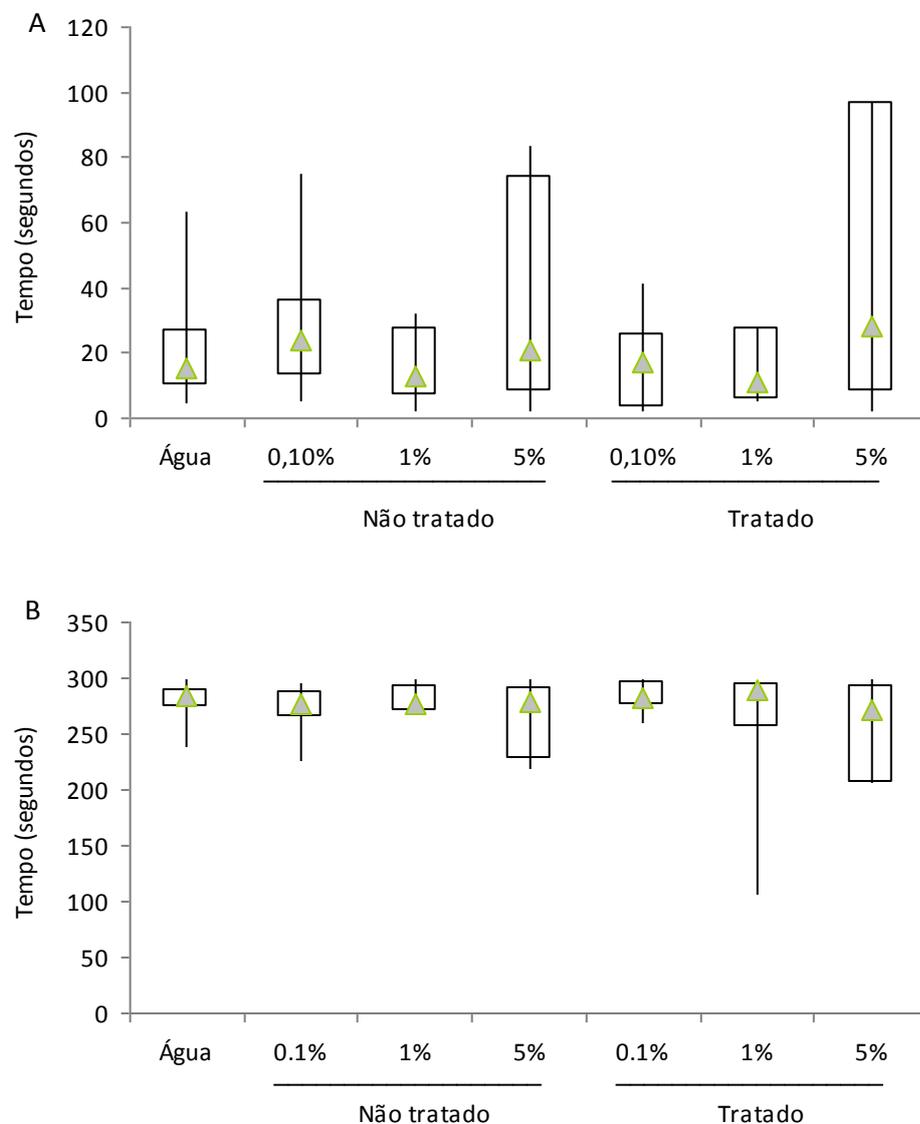


Figura 6: Tempo de permanência em segundos nos compartimento claro (A) e escuro (B) no Teste Claro-escuro, expressos em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Foram utilizados três modelos de memória e aprendizado, reconhecimento de objetos, esquiva inibitória e esquiva discriminativa. Roedores despendem maior tempo explorando um objeto novo comparado a um objeto familiar. Este comportamento tem sido utilizado como um modelo comportamental conhecido como reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988). Para avaliar memória de longa duração, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (Dia 1); 24 horas depois foram submetidos a uma sessão de teste (Dia 2) na presença de um objeto familiar e um objeto novo. Como se pode observar na figura 7, não houve diferença significativa no tempo de exploração do objeto novo, avaliado pelo índice de reconhecimento, entre os grupos testados.

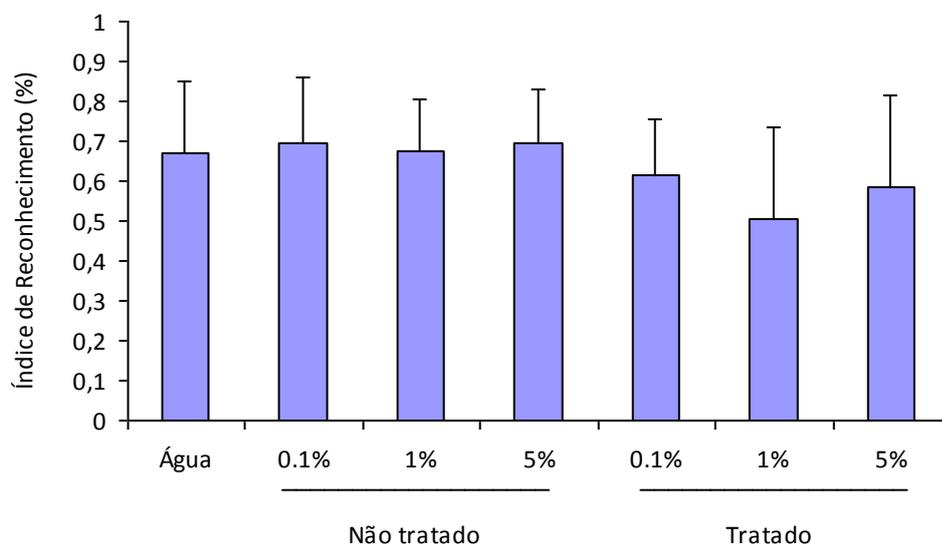


Figura 7. Tempo total de exploração do objeto novo, expressado pelo “Índice de Reconhecimento”, no Teste Reconhecimento de Objetos (média \pm desvio padrão médio) de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). ANOVA ($p > 0,05$).

Uma grande parte do conhecimento sobre as bases e mecanismos neurais dos processos de aprendizagem e memória fundamenta-se na investigação dos correlatos neurais do comportamento de animais não humanos em situações aversivas (Canova, 2009). No teste da esquiva discriminativa, quando o animal entra no braço aversivo do labirinto em cruz elevado (sessão teste) são acionados estímulos aversivos (campainha e a luz). Cabe ressaltar que ratos têm aversão à

luz branca e ao som estridente. Após vinte quatro horas (memória de longa duração) foi avaliado o número de entradas (Fig. 8 A) e o tempo (Fig. 8 B) no braço aversivo. Nestes parâmetros, não houve diferença significativa entre os grupos.

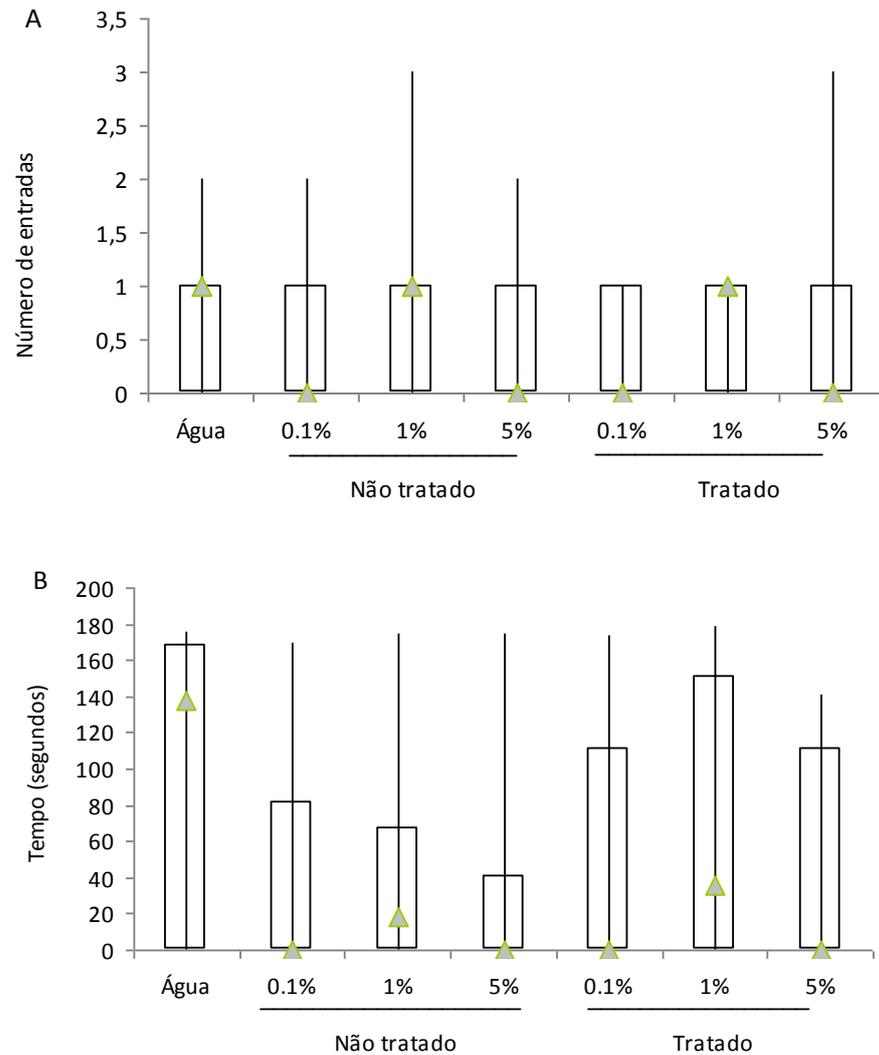


Figura 8. Número de entradas (A) e o tempo despendido em segundos (B) no braço aversivo no teste da Esquiva Discriminativa, expressos em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Outro teste em que os animais são expostos a estímulos aversivos é a esQUIVA inibitória. Na sessão treino, ao descerem da plataforma os animais recebem um choque (estímulo aversivo). Para avaliar memória de longa duração, vinte quatro horas após o treino foi avaliado o tempo de descida da plataforma. No teste, não houve diferenças significativas entre os grupos (Fig. 9).

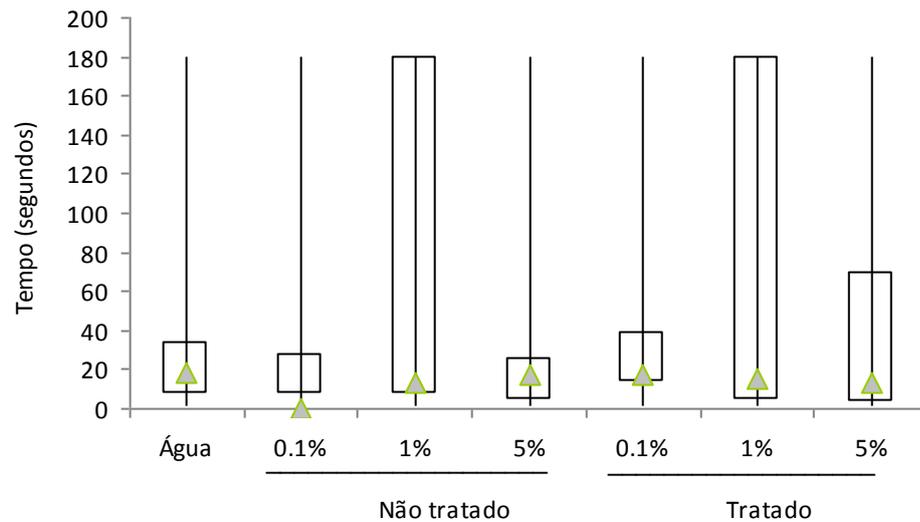


Figura 9: Latência em segundos na sessão teste, no aparato da EsQUIVA Inibitória, expresso em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977, o teste do nado forçado é utilizado como um modelo preditivo de depressão em animais de laboratório. Roedores são expostos a uma situação aversiva ao serem colocados num tanque cilíndrico com água. Os animais quando expostos a uma situação aversiva sem possibilidade de escape, desistem das tentativas de fuga e permanecem imóveis. O tempo de imobilidade é tomado como uma medida de depressão (Liu et al., 2007). Não houve diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade na sessão teste e re-teste (Fig. 10)

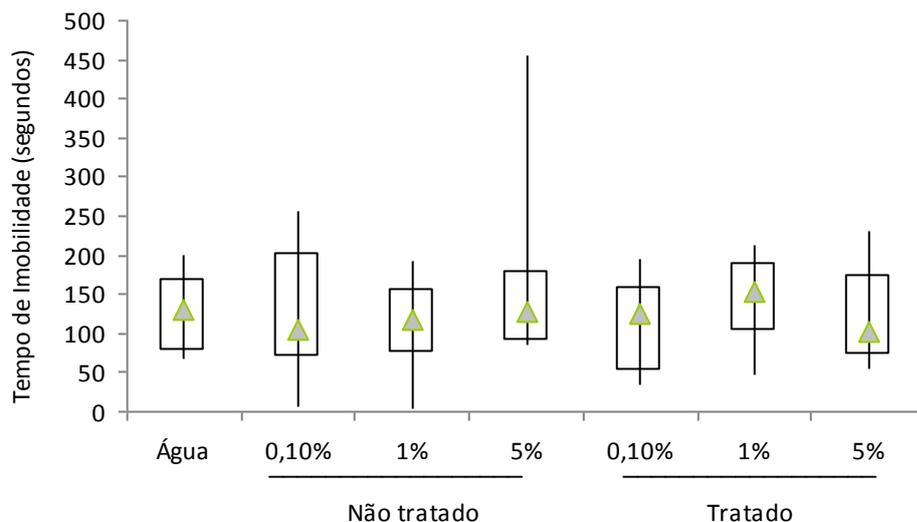
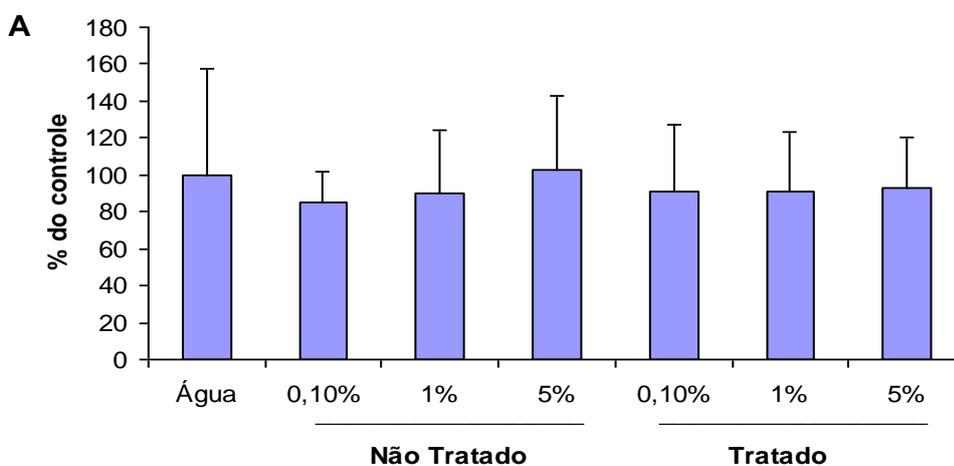


Figura 10: Tempo de imobilidade em segundos na sessão e re-teste do Teste Nado Forçado, expressos em mediana e intervalos 25-75, de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=15), controle (água, n=15). Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

4.1.2. ATIVIDADE DA AChE

Sabe-se que xenobióticos, como os pesticidas organofosforados e carbamatos, induzem alterações que ocorrem ao nível do sistema nervoso pelo aumento da estimulação colinérgica através inibição da enzima AChE ocasionando efeitos neurotóxicos (Cabello et al 2001; Wankhade et al, 2009). O estudo *in vivo* demonstrou que não houve alterações na atividade da enzima AChE no hipocampo (Fig. 11 A) e estriado (Fig. 11 B) nos grupos testados.



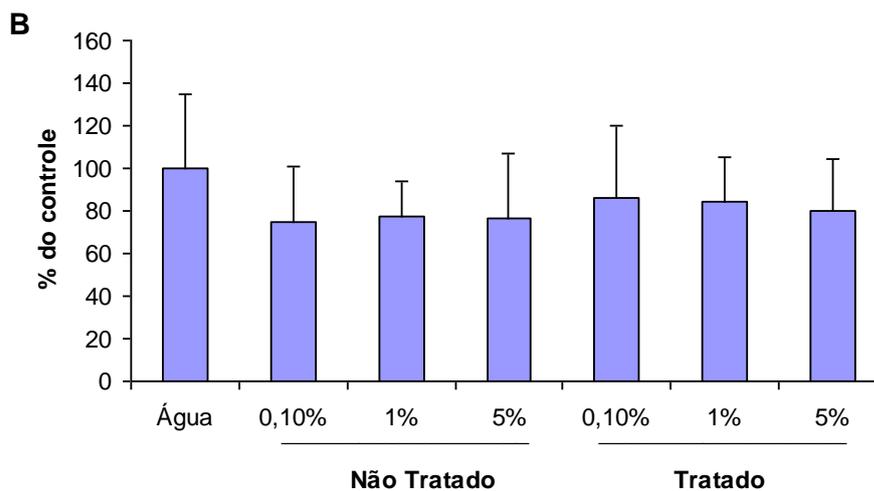


Figura 11: Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10). Os gráficos são expressos em porcentagem do controle (média \pm desvio padrão médio), ANOVA ($p > 0,05$).

4.1.3. ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

A exacerbação da toxicidade de xenobióticos pode estar associada ao dano oxidativo (lipoperoxidação) (Dos Santos, 2009). Um exemplo, são os compostos organofosforados que podem induzir o estresse oxidativo através do aumento na geração de radicais livres e alterações nas defesas antioxidantes (Wankhade et al, 2009).

A exposição a efluentes de curtume não alterou parâmetros de EO nas estruturas cerebrais nos ensaios: TBARS (Fig. 12), DCF (Fig. 13) e atividade da SOD (Fig. 14).

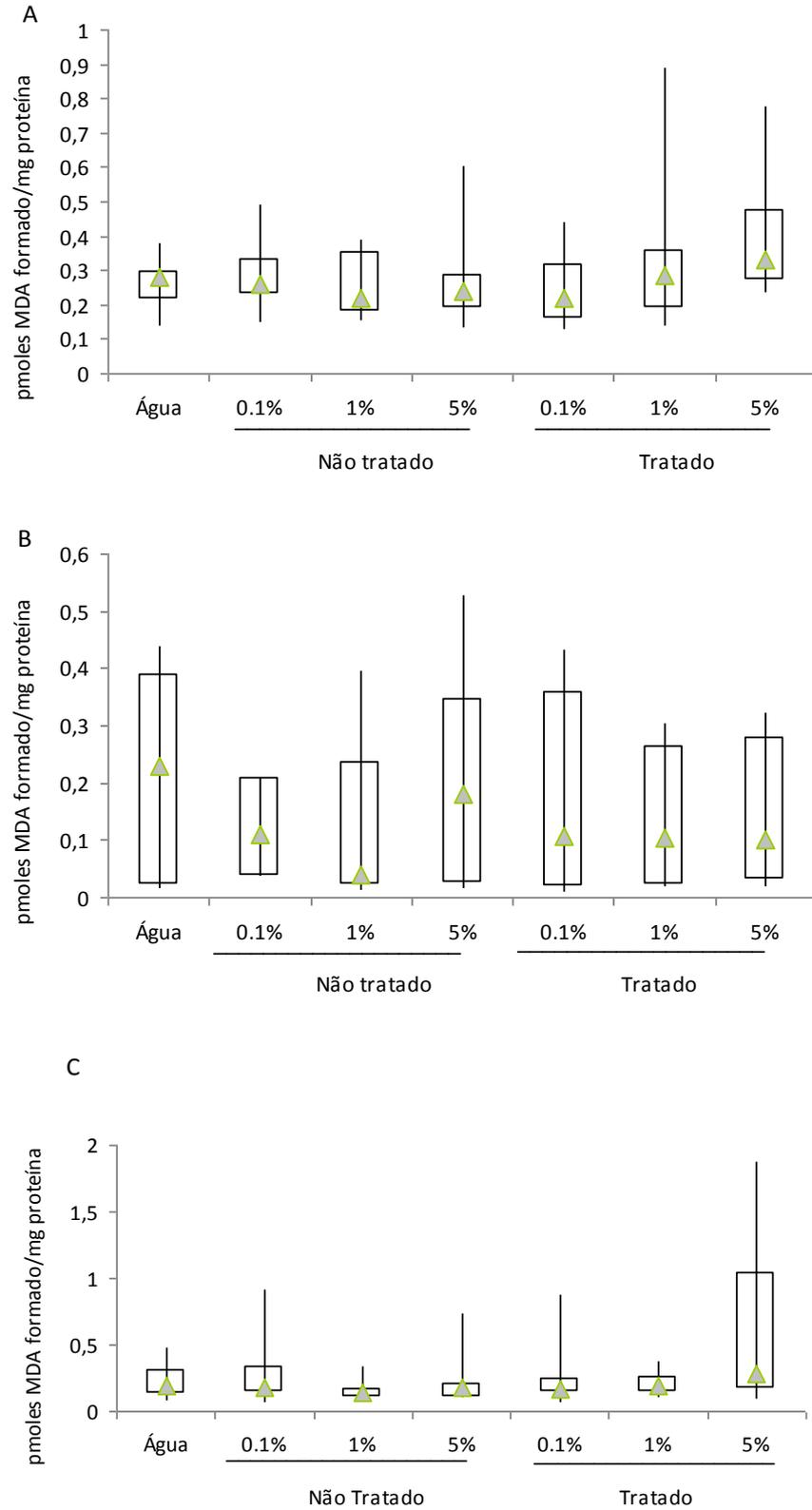


Figura 12: Avaliação do índice de lipoperoxidação no hipocampo (A), estriado (B) e cerebelo(C) de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10), através do ensaio TBARS. Os gráficos são expressos em mediana e intervalos 25-75, Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

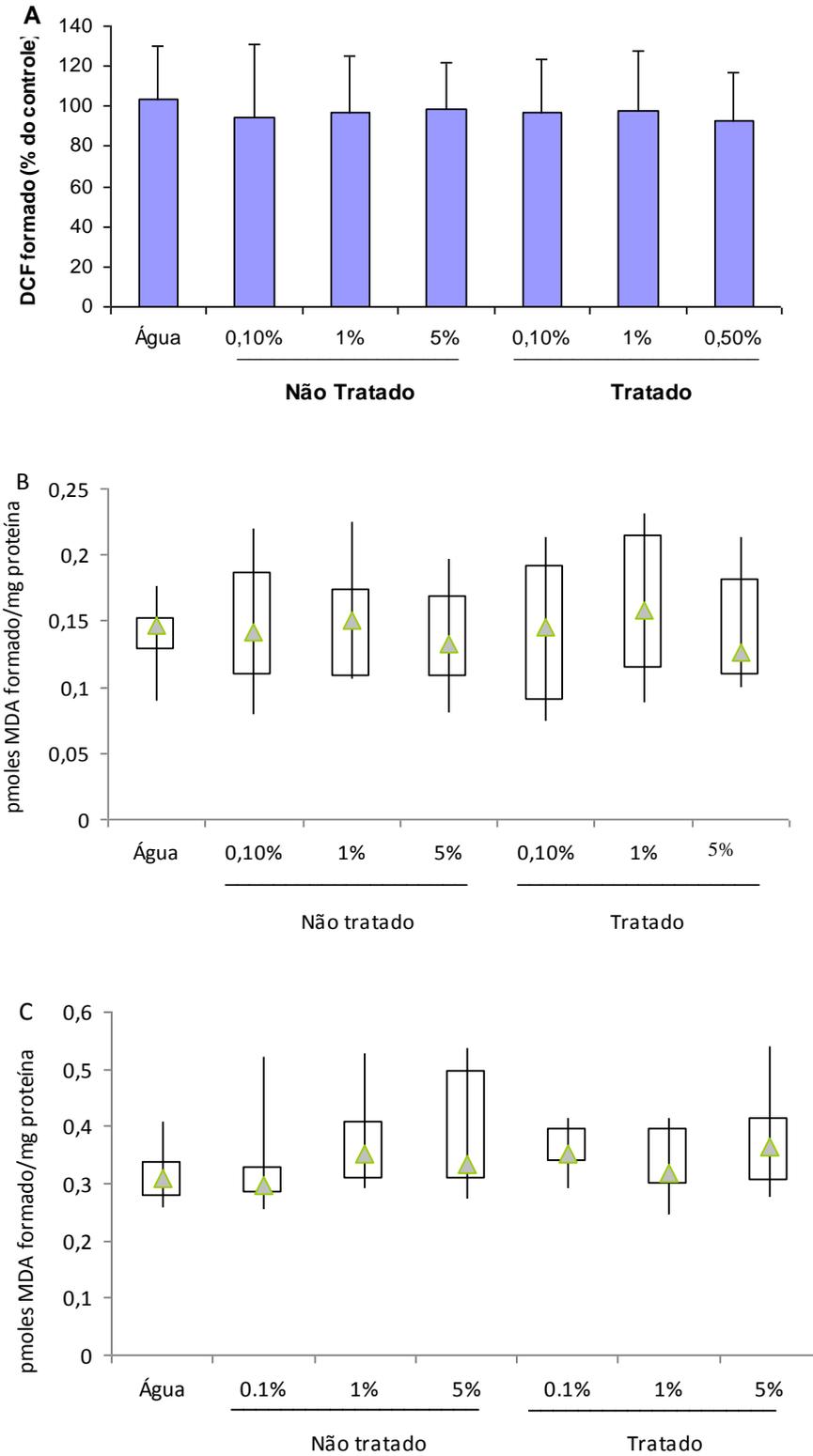


Figura 13: Produção de radicais livres no hipocampo (A), estriado (B) e cerebelo (C) de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10), utilizando o *probe* DCFH-DA.. O gráfico 13A é expresso em porcentagem do controle (média \pm desvio padrão médio), ANOVA ($p > 0,05$). Os gráficos 13B e 13C são expressos em mediana e intervalos 25-75, Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

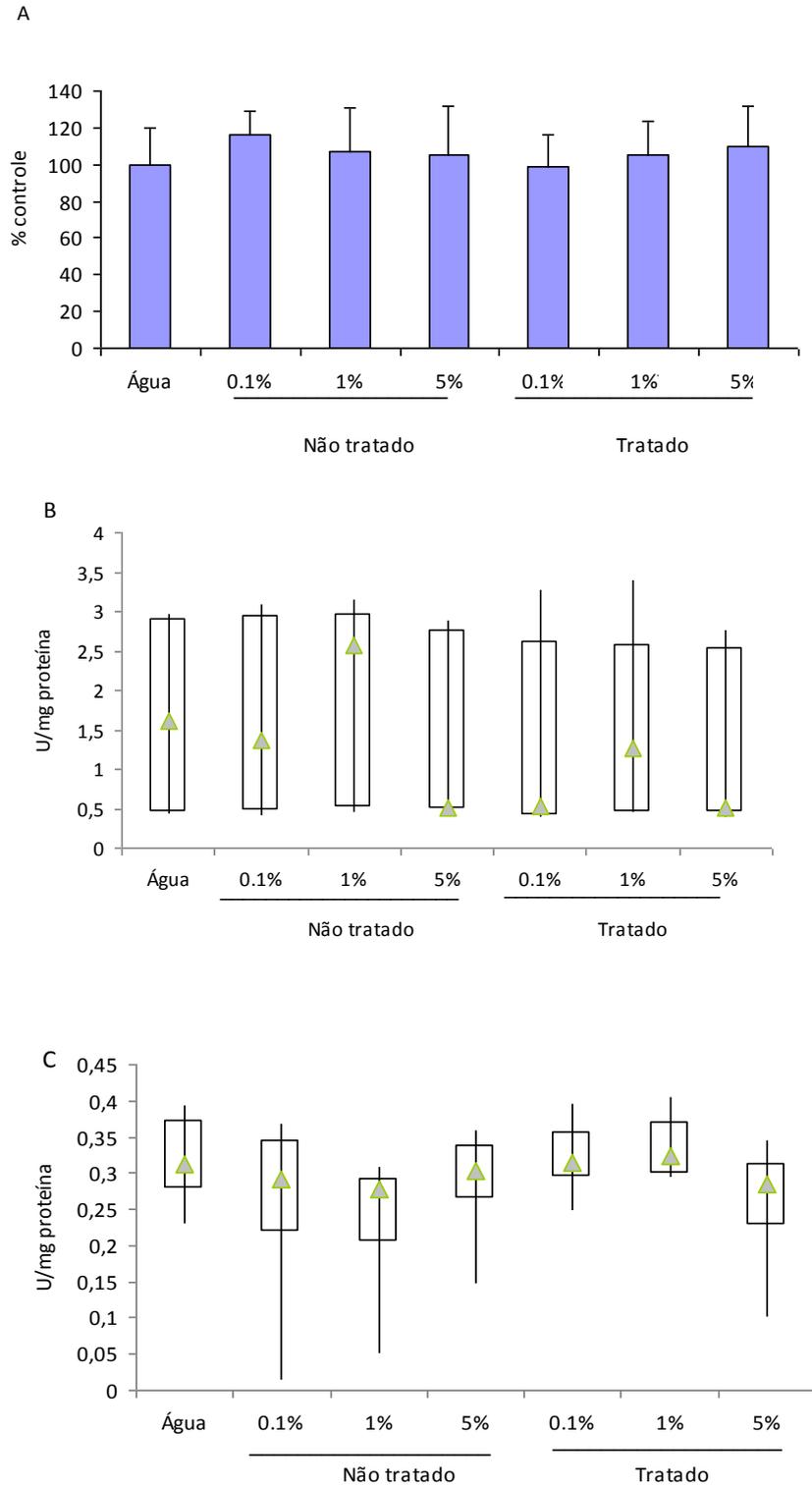


Figura 14. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no hipocampo (A), estriado (B) e cerebelo (C), de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10). O gráfico 14A é expresso em porcentagem do controle (média \pm desvio padrão médio), ANOVA ($p > 0,05$). Os gráficos 13B e 13C são expressos em mediana e intervalos 25-75, Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

4.2. HEPATOTOXICIDADE

4.2.1. MARCADORES DE LESÕES HEPÁTICAS E ALBUMINA

O aumento nos níveis das enzimas e fosfatase alcalina no plasma, assim como alterações nos níveis séricos de albumina, é atribuído a danos na integridade estrutural do fígado (Aliá et al., 2003, Camargo, 2007). O efluente de curtume, com ou sem tratamento fotoeletroquímico, em ratos, não apresentou diferenças significativas nos ensaios realizados: níveis de albumina (Fig. 15 A) e níveis das enzimas fosfatase alcalina (Fig. 15 B), AST (Fig. 16 A) e ALP (Fig. 16 B).

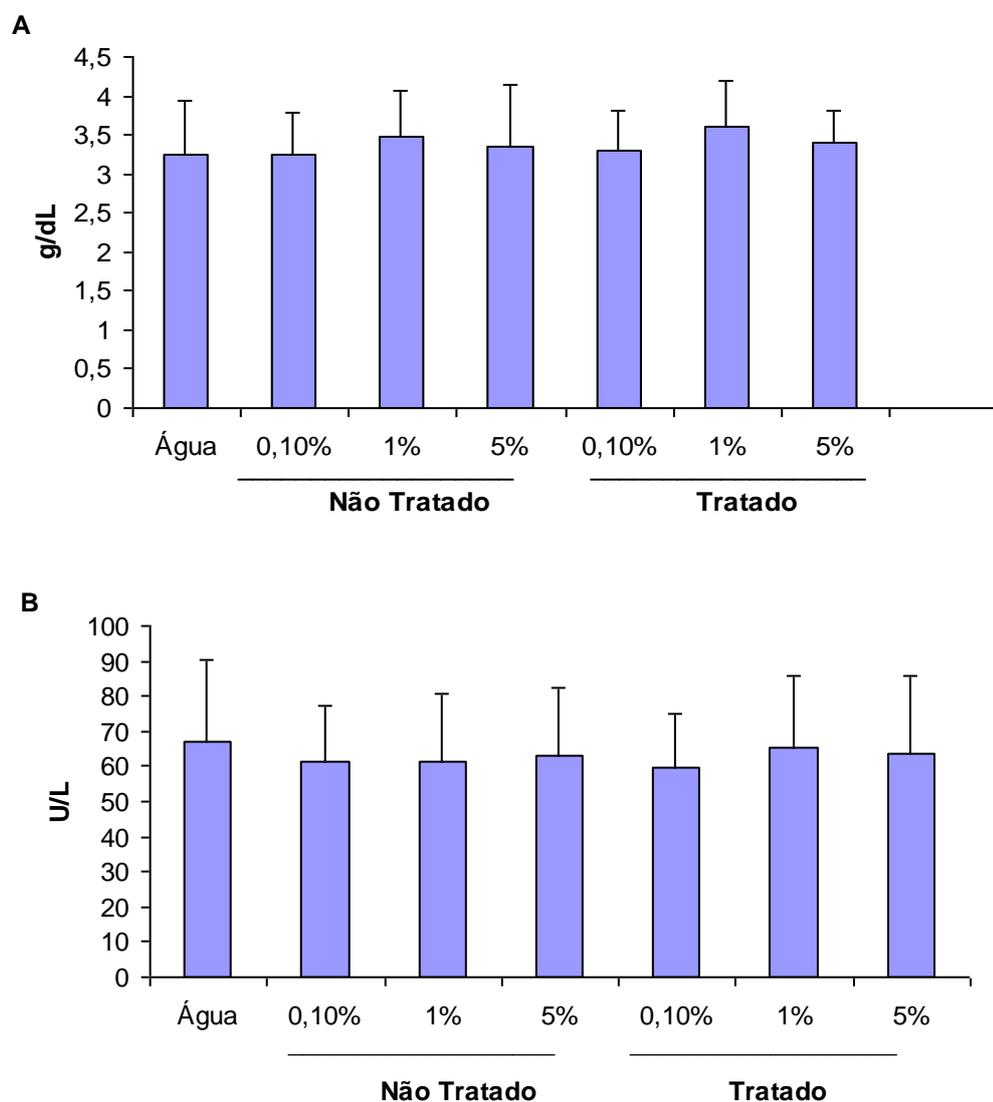


Figura 15: Níveis de albumina (A) e de fosfatase alcalina (B) em ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10). Os gráficos são expressos em média \pm desvio padrão médio. ANOVA ($p > 0,05$).

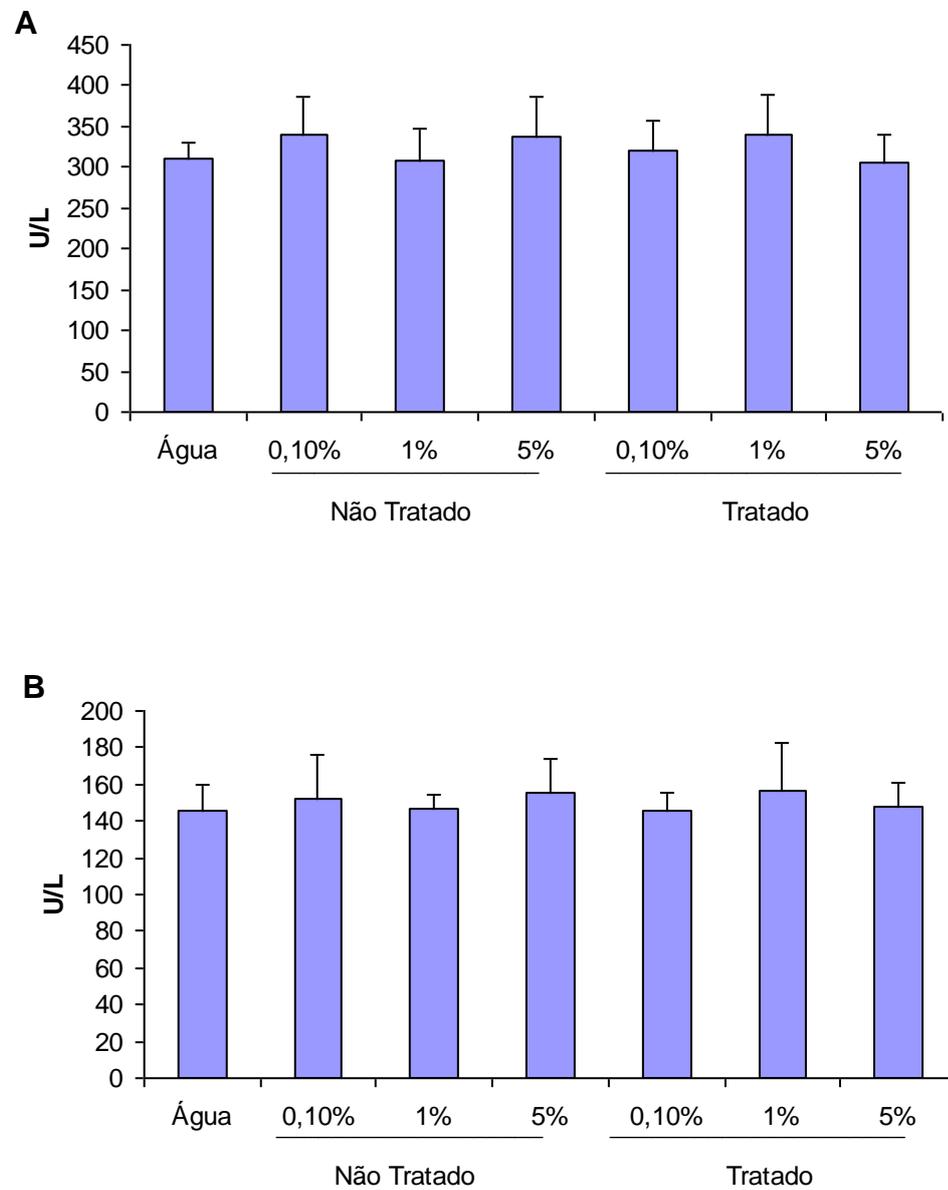
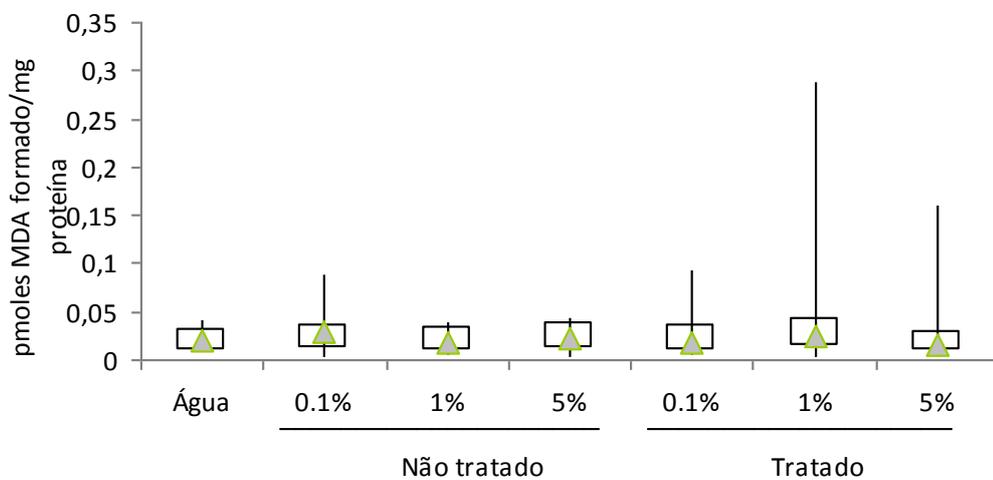


Figura 16: Níveis séricos das enzimas hepáticas AST (A) e ALP (B) em ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10). Os gráficos são expressos em média \pm desvio padrão médio. ANOVA ($p > 0,05$).

4.2.2. ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos e, com isto, possui uma elevada taxa metabólica, estando sujeito a muitos problemas causados pelo estresse oxidativo. Conseqüentemente, uma manutenção correta dos sistemas metabólicos hepáticos é de grande importância para a manutenção da saúde (Camargo, 2007). Nos testes realizados para avaliar o estresse oxidativo no fígado, não houve diferença significativa no dano lipídico (TBARS), na geração de radicais livres (DCF) e na atividade da catalase entre os grupos experimentais, representados respectivamente na figura 17 A, B e C.

A



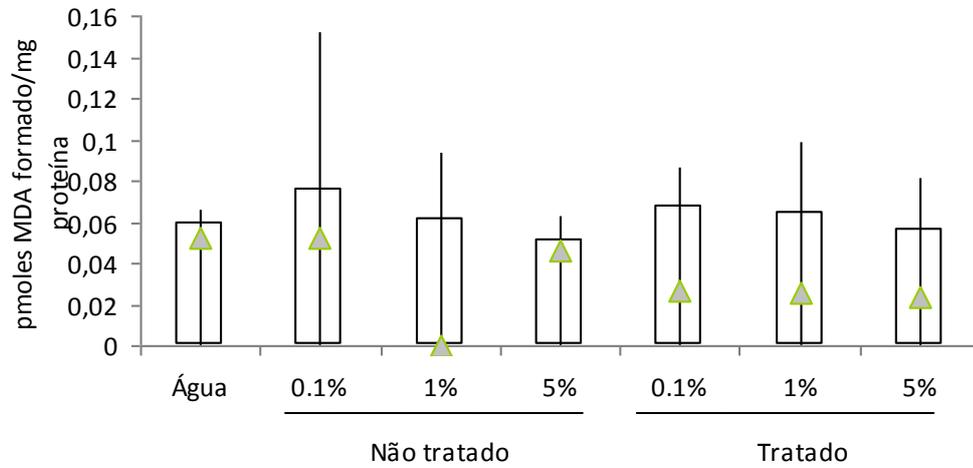
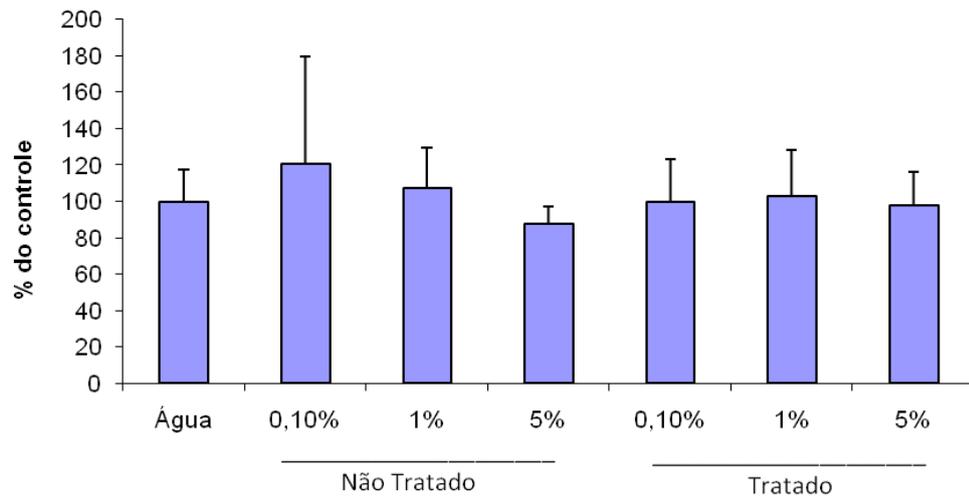
B**C**

Figura 17: Produção de radicais livres utilizando o *probe* DCFH-DA (A), avaliação do índice de lipoperoxidação pelo ensaio TBARS (B) e avaliação da atividade da CAT (C) no fígado de ratos expostos a efluentes não-tratado e tratado (0,1; 1 e 5%, n=10), controle (água, n=10). Os gráficos 17A e 17B são expressos mediana e intervalos 25-75, Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). O gráfico 17C é expresso em porcentagem do controle (média \pm desvio padrão médio), ANOVA ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A indústria de curtimento de couro é um dos principais poluidores dos corpos de água doce, fato que ocorre principalmente em países em desenvolvimento (Tare et al., 2003; Prabakaran et al., 2006). Resíduos sólidos e líquidos provenientes da indústria de curtimento são os subprodutos inevitáveis no processo de tratamento do couro. Estes resíduos contêm substâncias tóxicas tais como sulfetos e sais de cromo (Cooman et al., 2003; Ates et al., 1997; Tariq et al., 2005), sendo que este último é encontrado em maior proporção (Walsh e O'Halloran, 1998; Prabakaran et al., 2006). A contaminação aquática por metais pesados é prejudicial, uma vez que esses elementos não são degradáveis no ambiente e podem acumular-se nos organismos (Jardim, 1983; Jordão et al., 1997). Estudos sobre os efeitos prejudiciais de metais pesados, como cromo, nos organismos têm sido relatados, já que esse metal é usado em quantidades substanciais pela indústria do couro (Forstner e Wittmann, 1981; Sala et al., 1995; Jordão et al., 1997).

Em nosso estudo, observamos que ratos expostos cronicamente (30 ou 45 dias) aos efluentes de curtumes com ou sem tratamento fotoeletroquímico não apresentaram alterações nos testes de neurotoxicidade e hepatotoxicidade. No entanto, esses resultados não estão de acordo com estudo prévio, no qual a exposição crônica do efluente não tratado induziu um perfil ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos (Vanzin et al., 2006). A exposição ao efluente sem tratamento aumentou o conteúdo de radicais livres no fígado e o dano em lipídeos nas estruturas cerebrais avaliadas. Além de que, a exposição reduziu o conteúdo de resíduos de tirosina e de triptofano em hipocampo (indicando um aumento no dano em proteínas) e a capacidade antioxidante total em hipocampo, córtex frontal e fígado (Vanzin et al., 2006).

Baseado nisso, verifica-se que a exposição a efluentes de curtume difere em ratos e camundongos no que diz respeito à hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Isso fica evidente pelo fato de que ratos tratados com efluentes, tanto nos testes comportamentais como bioquímicos, não apresentaram alteração em nenhum dos parâmetros avaliados. Diferentemente, camundongos expostos ao efluente não tratado apresentaram tanto alterações no estado de ansiedade quanto nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados (Vanzin et al., 2006). Essas alterações podem estar relacionadas a diferenças fisiológicas entre as duas espécies. Não existem evidências que justifiquem diretamente essas

diferenças, contudo podemos inferir que ocorra provavelmente devido à complexidade das rotas metabólicas e/ou a variações de substâncias potencialmente tóxicas presentes nos efluentes obtidos em momentos diferentes. Assim, uma das hipóteses consiste nas diferenças existentes entre as duas espécies no que diz respeito ao metabolismo, com possível formação de metabólitos mais tóxicos em camundongos, o que pode ter induzido o efeito neurotóxico e hepatotóxico. Estudos demonstram que diferenças fisiológicas entre espécies podem resultar em variações nas formas de metabolização de drogas ou xenobióticos (Meotti et al, 2003; Nogueira et al., 2002; Mitchell et al., 1976). Segundo Brunton e colaboradores (2006) a formação ou não dos metabólitos reativos no processo de desintoxicação pode ser determinada pelos genes e pelo meio ambiente (fenótipo), e a resposta de um indivíduo ou uma espécie à determinada substância depende da inter-relação complexa entre fatores ambientais e fatores genéticos. Desta forma, as diferenças genéticas entre as espécies também podem ser consideradas um fator importante para justificar essa variação entre esses grupos de roedores (Nogueira et al., 2002), indicando que ratos podem não ser bom modelos para estudos ecotoxicológicos envolvendo efluentes de curtume.

Meotti e colaboradores (2003) administraram em ratos e camundongos, pela via intraperitoneal, o composto disseleneto de difenila em diferentes doses. Em camundongos, o composto alterou os níveis de creatinina e induziu morte e convulsão. A dose letal em 50% dos indivíduos (DL_{50}) foi de 65 mg/kg, no entanto, em ratos a administração não alterou os parâmetros renais (uréia e creatinina) e hepáticos (AST e ALP) e a DL_{50} foi de 374 mg/kg, sugerindo que o disseleneto de difenila é mais tóxico em camundongos do que em ratos.

Estudos realizados com o paracetamol também estão de acordo com nossos resultados. Quando o fármaco foi administrado em hamsters e camundongos, causaram necrose hepática (Davis et al., 1974; Potter, 1974; Mitchell, 1973). Em contraste, causaram danos menores no fígado de ratos (Boyd e Bereczky, 1966), demonstrando novamente variações na resposta a toxicidade entre diferentes espécies.

Além dos estudos *in vivo*, estudos *in vitro* também revelam diferença em resposta à toxicidade, devido às variações no metabolismo entre as espécies (Mitchell et al., 1976). O pré-tratamento com fenobarbital aumentou a taxa de

formação do metabolito reativo proveniente da metabolização do paracetamol em camundongos (Potter et al., 1973; Mitchell et al., 1976), não alterando significativamente a meia-vida biológica desse fármaco (Mitchell et al., 1973,1976), possivelmente porque o fenobarbital não induz as enzimas que convertem a droga para a sua forma conjugada de glicuronídeo. Ao contrário dos efeitos do fenobarbital em camundongos, sua administração prévia em hamsters, além de diminuir a ligação covalente do paracetamol radio-ligado, causou necrose do fígado. A razão para esta diferença entre as espécies tornou-se evidente quando se descobriu que fenobarbital em hamsters não aumentou a taxa de formação do metabolito reativo pelos microsomas do fígado, porém diminuiu acentuadamente a meia-vida biológica do paracetamol *in vivo* através do aumento glucuronidação da droga (Potter et al., 1974; Mitchell et al., 1976).

Assim como ensaios que avaliaram estresse oxidativo e alterações comportamentais, ratos expostos cronicamente ao efluente de curtume não tiveram alterações na atividade da AChE em hipocampo e estriado. Outros xenobióticos, como malaxon, agem como inibidor a AChE e isso pode refletir em desordens neuropsiquiátricas como a ansiedade e depressão (De Silva, 2006).

Tendo em vista que a produção industrial é a principal responsável pelo lançamento de metais pesados no ecossistema (Jordão et al., 1999), uma importante causa de contaminação dos ambientes aquáticos, é de fundamental importância que haja um monitoramento adequado para evitar que as emissões de poluentes impactem minimamente tanto humanos quanto as demais espécies expostas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os curtumes são considerados causadores de grande impacto na qualidade ambiental dos rios, em locais em próximos a estes empreendimentos. Isso porque muitos agentes poluidores estão associados com esse processo produtivo.

A exposição crônica ao efluente de curtume, com ou sem tratamento fotoeletroquímico, em ratos, não apresentou diferenças nos ensaios comportamentais de ansiedade, preditivo de depressão e memória, e nos testes neuroquímicos para avaliar o estresse oxidativo e atividade da AChE em estruturas cerebrais. Não houve diferença nos testes de hepatotoxicidade, avaliados através da determinação do estado oxidativo celular e dos níveis séricos de marcadores de lesões hepáticas em ratos. Isso demonstrou que ratos, diferentemente dos camundongos, não são bons modelos animais para estudos ecotoxicológicos com efluentes de curtume.

Estudos semelhantes são necessários para determinar a susceptibilidade de diferentes espécies a contaminantes e assim, além de definir espécies de animais de experimentação como melhores modelos animais, avaliar uma possível ameaça à saúde humana e aos ecossistemas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzimol.*, 105: 121-126, 1984.
- Alía, M., et al. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nut. Res.*, 23: 1251-1267, 2003.
- Apostoli, P. La speciazione dei metalli in *medicina del lavoro*. *Medicina del Lavoro*. 89: 3-16, 1998.
- Arteni, N.S., et al. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 78:465-469, 2002.
- Ates, E., Orhon, D., Tunay, O. Characterization of tannery wastewater for pretreatment- Selected Case Studies. *Water Science and Technology* 36: 217–223,1997.
- Attenburrow, M. J., et al. Chromium treatment decreases the sensitivity of 5-HT_{2A} receptors. *Psychopharmacology*, 159: 432–436, 2002.
- Barreiros, A.L.B.S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1): 113-126, 2006.
- Bertazzoli R., Pelegrini, R. Descoloração e Degradação de Poluentes Orgânicos em Soluções Aquosas Através do Processo Fotoeletroquímico. *Quim. Nova* , 25: 477, 2002.
- Boyd, E.M., and Bereczky, G. M. Liver necrosis from paracetamol. *Brit. J. Pharmacol.* 26: 606, 1966.
- Brocardo, P.S., et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride . *Toxicology*, 207: 283–291, 2005.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254, 1976.

Brunton, L.L., et al. *Goodman & Gilman as Bases Farmacológicas da Terapêutica* - 11ª Ed., 2007.

Cabello G.M., et al. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Health Perspectives*; 109 (5):471-9, 2001.

Canova, F. Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos. *Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. 2009.*

Camargo, C.A. Efeito da Quercetina nas Atividades Fosfatásicas e seu Efeito Protetor na Hepatotoxicidade Induzida Pelo Acetaminofeno em Camundongos. (Tese) Universidade Federal de Campinas. 2007.

Cooman, K., Gajardo, M., Nieto, J. Tannery wastewater characterization and toxicity effect on *Daphnia* spp. *Environmental Toxicology* 18:45–51, 2003.

Costa, L.G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*,13: 3661, 2006.

Crawley, J.N., Goodwin, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 13: 167-170, 1980.

Davis, D.C., et al. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sciences* 14: 2099, 1974.

De Silva, H.J. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic

- exposure? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 9: 803-806. 2006.
- Dimitsantos et al. Litter size affects emotionality in adult male rats, *Phys. Behav.* 92: 708-716, 2007.
- Drapier, D. et al. Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 176: 202-209, 2007.
- Ellman, G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95. 1961.
- Engin, E., et al. Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: Behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience*, 157: 666-676, 2008.
- Ennaceur, A., Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31 (1): 47-59, 1988.
- Evans, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.*, 49: 577-587, 1993.
- Eyer, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds. *Hum. Exp. Toxicol.*, 14(11): 857-864, 1995.
- Forstner U., Wittmann G.T.W.. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Berlin: Springer-Verlag, 486, 1981.
- Fowle, S.E., Constantine, C.E., Fone, D., McCloskey, B. J. An epidemiological study after a water contamination incident near Worcester, England. *Epidemiol. Community Health*. 50: 18-23, 1996.
- Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in

- human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85, 1990.
- Halliwell, B. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Ann. Neurol.*, 32: 510-515, 1992.
- Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23:118-126, 1993.
- Haramakin, N., et al. Networking Antioxidants in the Isolated Rat Heart are Selectively Depleted by Ischemia-Reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*, 25: 329–339, 1998.
- Jadhav, S.H., et al. Effects of Subchronic Exposure via Drinking Water to a Mixture of Eight Water-Contaminating Metals: A Biochemical and Histopathological Study in Male Rats. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 53: 667–677, 2007.
- Jaga, K., Dharmani C. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. *Rev. Environ. Health.* 22: 57-73, 2007.
- Jardim W.F. Poluição aquática: metais pesados, um dano irreparável. *Rev Bras Technol.*, 14: 41-45, 1983.
- Jordão, C.P., Pereira, J.L., Jham, G.N. Chromium contamination in sediment, vegetation and fish caused by tanneries in the State of Minas Gerais, Brazil. *Science of the Total Environment*, 1-11, 1997.
- Jordão, C.P., et al. Contaminação por Cromio de Águas de Rios Provenientes de Curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*, 22(1): 47-52, 1999.
- Kameda, S.R., et al. Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task. *Psychopharmacology* 192: 39-48, 2007.

- Kedar, N.P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *Journal of Postgraduate Medicine*, 236-245, 2003.
- Kehrer, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21-48, 1993.
- Koetz, P. R., et al. Tratamento de efluentes homogeneizados de curtume por digestão anaeróbia em reatores de fluxo ascendente. *Rev. Brás. de Agr.*, 1:23-29, 1995.
- Lebel, C.P., et al. organometal induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 104: 139-146, 1990.
- Liu, G. et al. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype I. *Neuropsychopharmacology* 32: 1531–1539, 2007.
- Lobinski, R. Elemental speciation and coupled techniques. *Applied Spectroscopy*. 5:260A-278A, 1997.
- Marengo, J. A.. Água e mudanças climáticas. *Estud. Av.* 22: 83-96, 2008.
- Mariani, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed Life Sci.*, 827(1): 65-75, 2005.
- Massoulié, J., et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. Neurobiol.*, 41: 31-91, 1993.
- McCarty, M. F. Toward prevention of alzheimers disease – Potential nutraceutical strategies for suppressing the production of amyloid beta peptides. *Medical Hypotheses*, 67: 682–697, 2006.

- Meneghel, S.N., et al. Características epidemiológicas do suicídio no Rio Grande do Sul. *Rev. Saúde Públ.* 38: 804-810, 2004.
- Meotti, F.C., et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters* 143: 9-16, 2003.
- Mesulam M.M., et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience*. 110: 627-639, 2002.
- Meydani, M. Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 928: 226-235, 2001.
- Mitchell, J. R., et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 187: 211, 1973.
- Mitchell, J. R. et al. Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role of glutathione and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Therap.* 16: 676, 1974.
- Mitchell J.R., Snodgrass W.R., Gillette J.R. The Role of Biotransformation in Chemical-Induced Liver Injury. *Environmental Health Perspectives* 15: 27-38, 1976.
- Mitteregger Júnior, H., et al. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere*, 1211-1217, 2007.
- Moraes, D. S. de L. e Jordao, B. Q.. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Rev. Saúde Pública* [online]. 36:370-374, 2002
- Moretto M.B., et al. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of

- rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and biology*.17: 256-260, 2004.
- Mutti, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicology Letters*, 108:77-8, 1999.
- Nogueira C.W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183: 29-37, 2003.
- Oliveira, J.L., Nozaki, J. Caracterização e Tratamento dos Efluentes de Curtume. XI Encontro Anual de Iniciação Científica - Maringá – PR, Universidade Estadual de Maringá/Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. 2002.
- Oral, R., et al. Multi-species toxicity evaluation of a chromium-based leather tannery wastewater. *Desalination*, 211: 48-57, 2007.
- Pacheco, J.W.F. Curtumes. São Paulo: CETESB, 76, 2005.
- Pickett, W., King, Wet al. Suicide mortality and pesticide use among canadian farmers. *Am. Journal Indl. Med.* 34: 364-372, 1998.
- Pietá Dias, C., et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146: 1719-1725, 2007.
- Pivetta, F., et al.* Monitoramento biológico:conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 17(3):545-554, 2001.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229: 327-336, 1977.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266:730-732, 1977.
- Potter, W.Z., et al. Acetaminiphen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding'n vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 187: 203,

1973.

- Potter, W.Z., et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters. *Pharmacology* 12: 129, 1974.
- Prabakaran, M., et al. Immune response in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* on exposure to tannery effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 372–378, 2007.
- Quinteros, F.A., et al. Mechanisms of chromium (VI)-induced apoptosis in anterior pituitary cells. *Toxicology*, 249: 109–115, 2008.
- Rodrigues, M.A.S., et al. The use of photoelectrochemical degradation na electro dialysis on the treatment of tannery effluents with chromium. *Global Symposium on Recycling, Waste Treatment and Clean Technology, Madrid*, 3: 2861-2862, 2004.
- Ross, D., Modulus, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. Boca Raton, CRC Press, 151-70, 1991.
- Sala L.F., Rizzoto et al. Contamination ambiental por el metal de transition cromo. Estamos frente a un serio problema ecológico? *Quim. Nova*, 18: 468-474, 1995.
- Dos Santos A.A. Efeito Reativador de Oximas Frente à Inibição da Enzima Acetilcolinesterase cerebral Induzida por Malation e Malaoxon. *Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina*. 2009.
- Siqueira, R.S. Estudo do Estresse Oxidativo em Estruturas Cerebrais no Processo de Envelhecimento e da Atividade Antioxidante e Neuroprotetora de *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama). *Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. 2002.

- Silverthorn, D.U., et al. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada* Editora Manole, 2ª Ed., 820, 2003.
- Soubrie, P., et al. Efets de ansiolytiques sur la prise de nourriture de rats et de souris places en situation nouvelle ou familiere. *Psychopharmacology*, 45: 203-310, 1975.
- Slotkin, T.A. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.*, 107: 71-80, 2005.
- Tariq, S.R., et al. Multivariate analysis of trace metal levels in tannery effluents in relation to soil and water: A case study from Peshawar, Pakistan. *Journal of Environmental Management*, 79: 20–29, 2006.
- Tare, V., Gupta, S., Bose, P. Case studies on biological treatment of tannery effluents in India. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 53, 976–982. 2003.
- Taylor P., et al. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven Publishers, 214-242, 1999.
- Walker, S.C., Winn, P. An Assessment of the Contributions of the Pedunculo pontine Tegmental and Cuneiform Nuclei to Anxiety and Neophobia. *Neuroscience*, 150: 273–290, 2007.
- Walsh, A.R., O'Halloran, J..Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1429–1438, 1998.
- Wankhade, V., A.R. Malu, S.P. Pawar. Effect of malathion on liver ache activity of mice. *Biology and Medicine*, 1(2): 122-126, 2009.
- Williams, D.P. The Metabolism and Toxicity of Furosemide in the Wistar Rat and CD-1 Mouse: a Chemical and Biochemical Definition of the Toxicophore. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 322: 1208-1220,

2007.

Xavier, J.L.N. O uso de fotoeletrooxidação no tratamento do efluente de curtume. Dissertação (Mestrado) – UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

Yagi, K., Simple for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. In Amstrong D. Methods in Molecular Biology: Free Radical an Antioxidant Protocols, Humana Press Inc., 108: 101-106, 1998.

Vanzin S.I., et al. Efeitos da exposição crônica a efluentes de curtume sobre parâmetros comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. XVIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.