

Trabalho de Conclusão de Curso

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE UTILIZANDO TILÁPIAS DO NILO

Thiago Kucera Nunes



**UFSC Universidade Federal de
Santa Catarina, 2015.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Trabalho de Conclusão de Curso
referente ao curso de Ciências
Biológicas, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel

THIAGO KUCERA NUNES

10/07/2015

Trabalho com estudos ecotoxicológicos utilizando peixes para
avaliação da toxicidade de efluentes de indústria de papel e
celulose presente em Santa Catarina, Brasil.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	7
1.1Composição da Madeira.....	9
1.2Fabricação de Polpa e Celulose.....	9
1.3 Branqueamento.....	10
1.4 Composição dos Efluentes.....	11
1.5 Efeitos tóxicos de efluentes e sua detecção	12
1.6Bioindicadores e Biomarcadores.....	13
1.7Modificações do Sistema Endócrino.....	14
1.8 Distúrbios da Reprodução.....	15
1.9 Caracterização da Tilápia do Nilo.....	16
2.OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.1Objetivos Específicos	17
3.MATERIAIS e MÉTODOS.....	18
3.1Peixes.....	18
3.2Efluente.....	18
3.3 Avaliação da Toxicidade Crônica.....	19
3.4 Análises Bioquímicas.....	19
3.5Índice Hepatosomático.....	19
3.6Análises Estatísticas.....	19

4.0RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1Efeitos da Exposição de Peixes Fêmeas ao Efluente.....	20
4.1.1Efeito Sobre a Concentração de Testosterona.....	20
4.1.2Efeito Sobre a Concentração de Estradiol.....	22
4.1.3Efeito Sobre a Concentração de Colesterol Total.....	24
4.1.4Efeito Sobre a Concentração de LDL	25
4.1.5Efeito da Exposição no Índice Hepatosomático.....	26
4.1.6	...Efeito Sobre a Concentração de Proteínas Plasmáticas Totais.....	28
4.1.7Hematócrito.....	29
5.CONCLUSÃO.....	30
6.REFERÊNCIAS	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Cl ₂	Cloro Elementar
O ₃	Ozônio
ClO ₂	Dióxido de Cloro
O ₂	Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
BRACELPA	Associação Brasileira de Celulose e Papel
KRAFT	Método de branqueamento de polpas celulósicas
ECF	Elementar Chlorine Free
TCF	Total Chlorine Free
EROD	Enzimas da subfamília do citocromo p450
MFO	Enzimas com função de oxidação, redução e hidrólise
SEDs	Substâncias endócrino-desreguladoras
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VTG	Vitelogenina
StAR	Proteína que transporta colesterol
GSH	Glutationa Peroxidase
NaOH	Hidróxido de Sódio
E2	Estradiol

Avaliação da Toxicidade de Efluentes de Indústrias de Papel e Celulose utilizando Tilápias do Nilo

RESUMO

A finalidade deste trabalho foi avaliar possíveis efeitos tóxicos do efluente de uma indústria de papel e celulose produzido em Otacílio Costa, SC. Tilápias fêmeas e adultas foram expostas a um efluente tratado de polpas celulósicas não branqueadas, e avaliadas em testes de laboratório. Foram utilizados 2 grupos de 10 tilápias, um grupo exposto a uma concentração de 1/50 do efluente em questão, e um grupo controle não exposto. Ao final de cada semana, foram avaliados parâmetros como a concentração plasmática dos hormônios esteróides testosterona e estradiol, concentração plasmática de colesterol total e da fração LDL, concentração de proteínas plasmáticas totais, índice hepatossomático e hematócrito de ambos os grupos. Os resultados obtidos indicaram que os peixes expostos ao efluente apresentaram, durante o período de exposição, um aumento significativo de testosterona, redução de estradiol, aumento do índice hepatossomático e alterações de colesterol total e sua respectiva fração LDL. Também apresentaram um aumento de hematócrito, típico de situações de estresse. Com base nos resultados, é possível afirmar que o efluente em estudo possui na sua composição substâncias conhecidas como desreguladores endócrinos, os quais costumam influenciar negativamente no sucesso reprodutivo dos organismos, e também para a possível presença de índices que apontam efeitos de toxicidade nos organismos, caracterizando assim a toxicidade do efluente estudado neste experimento. Como reprodução é considerado um parâmetro importante, influenciando diretamente na permanência dos organismos em seu habitat, e afetando também os demais níveis tróficos de um mesmo ambiente, este estudo apresenta significativa importância no monitoramento ambiental e na qualidade de vida destes organismos, em locais onde ocorre o despejo deste tipo de efluente.

Palavras chave: Tilápias, Papel e Celulose, Desreguladores endócrinos.

1. INTRODUÇÃO

A concepção de Ecotoxicologia foi criada pelo francês René Truhaut em 1969 como “o ramo da toxicologia encarregado por estudos dos efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas: animais (incluindo seres humanos), vegetais ou microrganismos, em um contexto integral” (TRUHAUT, 1977).

Este ramo da ciência estuda efeitos e influências das substâncias tóxicas em vários níveis de organização biológica (celular, individual, populacional, comunidade, ecossistema), centralizando três áreas de estudo:

- Emissões e ingressos de poluentes no ambiente, sua distribuição e destino;
- Estudos qualitativos e quantitativos dos efeitos tóxicos nos ecossistemas e no homem;
- Estudo do ingresso e destino dos poluentes na biosfera, com foco em cadeias alimentares.

A necessidade de se conhecer as conseqüências dos possíveis efeitos deletérios das substâncias lançadas no meio ambiente sobre indivíduos, populações e comunidades faz com que a ecotoxicologia ocupe fundamental importância no âmbito da preservação ecológica. Esse posicionamento se dá em contraposição às atividades produtivas do homem e o consequente descarte dos rejeitos no meio ambiente, os quais envolvem produtos e subprodutos químicos, alguns essencialmente artificiais e outros como substâncias de origem natural que tiveram suas concentrações alteradas no meio ambiente. Exemplos de substâncias de origem natural são metais, hormônios e petróleo, estes podem também acumular em tecidos de organismos. Pesticidas e fármacos, são exemplos de substâncias de origem antropogênica e também são fontes de estudos, assim como as nanopartículas com aplicações em fármacos, ótica, tintas, eletrônicos, cosméticos, entre outros. (CHAPMAN, 2002). De acordo com Chapman, 2006, o objetivo

da Ecotoxicologia seria entender e prever efeitos destas substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais.

Uma das principais causas de contaminação de ecossistemas aquáticos, particularmente no Estado de Santa Catarina, está associada à poluição oriunda de diferentes ramos industriais, dentre os quais se destacam os resíduos de papel e celulose, suinocultura, processamento de aves e mineração.

As indústrias de produção de polpas celulósicas e papel a partir da madeira apresentam uma gama de impactos ambientais ao promover a entrada no meio ambiente dos seus subprodutos tóxicos, como ácidos orgânicos, clorofenóis, cloroligninas, resinas ácidas, dioxinas e derivados clorados (KRINGSTAD & LINDSTROM, 1984). A grande maioria destas substâncias apresentam grande resistência à degradação biológica e química, que associada às características hidrofóbicas das mesmas, acarretam num aumento dos efeitos deletérios decorrentes da bioacumulação, que é definida por Soares (2004) como o processo pelo qual os agentes químicos são absorvidos e retidos pelos organismos a partir do ambiente em que vivem ou através da sua alimentação. Os sedimentos podem ser enriquecidos, por exemplo, em concentração de compostos clorados nos meios aquáticos, especialmente os clorofenóis, e a investigação dos efeitos adquiridos da bioacumulação destas substâncias na cadeia alimentar é extremamente significativa (CARLBERG *et al.*, 1987; TALKA & PRIHA, 1987).

Dados estatísticos divulgados pela Bracelpa (Associação Brasileira de Celulose e Papel) apontam que o Brasil é o 4º maior produtor de celulose e 9º de papel no mundo. Segundo registros sobre o setor de papel e celulose da própria Bracelpa, o crescimento anual médio de celulose é de 6,5 e o de papel alcança 5,4%. O país conta com 220 empresas com atividade neste ramo em 18 estados do território nacional, exportando anualmente US\$ 6,7 bilhões e arrecadando cerca de R\$ 3,5 bilhões em impostos (BRACELPA, 2015).

Estes dados citados ajudam a apontar a magnitude deste ramo industrial no Brasil, alguns de seus impactos sobre a natureza, e a importância de estudos mais detalhados relacionados aos subprodutos despejados no meio ambiente oriundos do ramo das indústrias de papel e celulose.

1.1. COMPOSIÇÃO DA MADEIRA

A madeira utilizada pelas indústrias de celulose e papel apresenta em sua constituição:

- Celulose - cadeias poliméricas longas de glicose. É a principal estrutura da parede celular vegetal, sendo o constituinte fundamental na produção do papel;
- Hemicelulose - cadeias poliméricas curtas e ramificadas de glicose e outros açúcares. Por serem solúveis em água, são removidas durante o processo de polpação;
- Lignina - estrutura randômica polimérica constituída por unidades fenólicas tridimensionais. Promove união entre as fibras de celulose. O processo de branqueamento e a polpação química removem a lignina sem degradar apreciavelmente as fibras;
- Extrativos - incluem hormônios vegetais, resinas e ácidos graxos. São substâncias que quando liberadas no meio aquático, conferem altos níveis de toxicidade aos seres vivos presentes.

1.2. FABRICAÇÃO DA POLPA E CELULOSE

No processo de obtenção da polpa celulósica para a confecção de papel, as fibras de celulose da madeira precisam ser separadas dos outros componentes (THOMPSON *et al.*, 2001). Deve-se extrair a matriz de lignina que as unem, mas preservando a celulose, promovendo uma preservação no número de fibras aptas para a confecção. A retirada da lignina e demais componentes dos cavacos de madeira fornece a polpa de celulose (QUEVEDO; BAZAÑES; BARBARIN, 2001).

Existem diversos processos e variações de procedimentos básicos para se obter a polpa da madeira. De acordo com a dureza da madeira da qual se dispõe, processos tornam-se mais efetivos ou não. No Brasil, o principal processo utilizado é o processo Kraft, o qual utiliza Sulfato em meio alcalino e temperaturas de 65°C nos tambores de digestão da

madeira. A produção da polpa ocorre através de tratamentos químicos e mecânicos (QUEVEDO; BAZAÑES; BARBARIN, 2001).

1.3. BRANQUEAMENTO

O branqueamento é a etapa mais poluidora de todo o processo, incluindo a presença de cerca de 3.000 substâncias e produtos químicos diferentes, sendo o cloro (Cl_2) o agente oxidante mais comum no processo de branqueamento convencional mais antigo (CPRH, 1998), e atualmente, o dióxido de cloro é o agente químico utilizado, em especial na Europa e América do Norte, onde o uso do cloro molecular foi banido.

O objetivo deste processo é branquear e purificar a polpa removendo compostos que absorvem luz, como a lignina residual da polpa que não foi totalmente removida no processo de cozimento (COLODETTE & SILVA, 2002). Ou seja, este processo remove as substâncias que colorem a celulose (CPRH, 1998).

O tipo e as condições do processo de branqueamento são determinados segundo as características da polpa, que determinam as condições do processo, tais como a quantidade e natureza dos agentes químicos utilizados. Esta etapa define as características dos efluentes gerados no processo e que deverão ser descartados no meio ambiente (SOARES, 2004).

Os processos de branqueamento são variados, e em geral são necessários sucessivos tratamentos para alcançar o resultado desejado (QUEVEDO e BARBARIN, 2001). São três as etapas do processo de branqueamento (CPRH, 1998):

1. Deslignificação por oxidantes como cloro e oxigênio;
2. Branqueamento com agentes oxidantes fortes como cloro, hipocloritos, peróxidos, dióxidos de cloro e outros;
3. Tratamento cáustico para remoção das cloroligninas solúveis em álcalis.

Nestes processos convencionais de branqueamento são utilizados tratamentos com cloro (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2) e hidróxido de

sódio concentrado (NaOH). Uma das sequências mais utilizadas no branqueamento convencional é o tipo CEDE (C= tratamento com Cl_2 , E= extração alcalina com NaOH, D= tratamento com ClO_2 , E= extração alcalina com NaOH). Outra sequência do tratamento convencional é do tipo OCEDE (O= tratamento com O_2 , C= tratamento com Cl_2 , E= extração alcalina com NaOH, D= tratamento com ClO_2 , E= extração alcalina com NaOH) (QUEVEDO; BAZAÑES; BARBARIN, 2001). Segundo Soares (2004), o processo de branqueamento de polpas pelo cloro gera também lignina e derivados, como as cloroligninas. O destino final destes subprodutos industriais é o meio ambiente. Mesmo sendo submetidos a um obrigatório tratamento antes de serem despejados no meio ambiente, suas características tóxicas são mantidas e causam diversos impactos no meio no qual são despejados.

Outras formas não convencionais de branqueamento são menos poluentes e mais adequadas à preservação da integridade ambiental, sendo do tipo ECF (Elemental Chlorine Free) ou TCF (Total Chlorine Free). O primeiro não utiliza cloro elementar e o segundo, não utiliza nenhuma forma de cloro (SOARES, 2004).

Estes procedimentos empregam agentes alternativos menos nocivos em substituição ao cloro e/ou dióxido de cloro, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3), o oxigênio molecular (O_2), e enzimas lignocelulíticas (SOARES, 2004).

1.4. COMPOSIÇÃO DOS EFLUENTES

O processo de polpação produz polpas não branqueadas, contendo lignina residual. As polpas de celulose devem então ser branqueadas para atender a usos mais nobres do papel. Este branqueamento é efetuado com reagentes à base de cloro molecular ou dióxido de cloro em processos mais antigos e convencionais. Outros processos de branqueamento, como já aqui citado, não empregam cloro molecular, apresentando efluentes menos nocivos ao meio ambiente. Após a finalização do processo de polpa branqueada há a produção de efluentes líquidos, os quais devem passar por um processo de tratamento para que possam ser lançados no meio ambiente. As indústrias papeleiras descarregam preferencialmente em rios uma série de substâncias químicas sabidamente tóxicas, incluindo clorofenóis,

cloroligninas, ácidos orgânicos, resinas ácidas, dioxinas e derivados clorados (KRINGSTAD E LINDSTROM, 1984; SUNTIO, 1988; SOARES E DURAN, 2001).

1.5. EFEITOS TÓXICOS DOS EFLUENTES E SUA DETECÇÃO

No ambiente aquático, os compostos presentes em efluentes das indústrias de polpa são depositados entre o sedimento, a biota e a coluna de água. Os efeitos nocivos destes efluentes afetam organismos de todos os níveis tróficos do ambiente aquático. Os componentes químicos destes efluentes industriais despejados no meio ambiente podem ainda serem transportados através da água para sedimentos e organismos distantes de seu local de origem de despejo, devendo-se considerar os impactos globais destes dejetos.

Durante o transporte através da água, esses efluentes são constantemente degradados, o que altera sua composição e diluição, o que significa dizer que os efeitos desses contaminantes podem ser diminuídos assim que aumenta a distância a jusante do local de onde foram despejados (SÖDERGREN, 1993).

Estudos no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica da UFSC apontaram alterações histológicas em tecidos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas à efluentes diluídos de indústria papelreira da produção de polpas branqueadas. Entre as alterações presentes foram observadas: a hiperplasia das brânquias com fusão lamelar e a hiperplasia do tecido hepático que também apresentou muitos vacúolos e no qual as células manifestaram sinais de perda de material intracelular, além da presença de vacúolos ou de alterações da membrana nuclear (SOARES & BAPTISTA, 2002).

Por outro lado, Förlin *et al.*, (1991) apontaram a elevação da atividade EROD (etoxiresorufina-O-desetilase, marcador da atividade enzimática da subfamília CYP1A) em peixes coletados até 40km do ponto de despejo como consequência da exposição ao efluente da produção de polpa. Hodson *et al.* (1991) encontraram atividade de oxigenases de função mista (MFO) reduzida em peixe White sucker (*Catostomus commersonii*) a 95km a jusante do lançamento do efluente da indústria de polpa avaliada em questão num ecossistema fluvial.

Södergren *et al.* (1993), encontraram compostos de efluentes industriais como o tricloroguaiacol em sedimento a 150km distante da área de descarga, num estudo na bacia do Mar Báltico.

Para avaliar as respostas biológicas dos organismos frente à exposição aos dejetos industriais e também seus efeitos tóxicos são utilizados organismos bioindicadores (WALKER *et al.*, 1996).

1.6. BIOINDICADORES e BIOMARCADORES

Algumas metodologias são utilizadas para avaliar a sobrevivência de organismos, e a qualidade da mesma. Análises em organismos-teste permitem que ocorra: detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas; identificação de espécies ou populações em risco de contaminação; magnitude da contaminação e determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos oriundos da intervenção humana (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Como morte é um parâmetro tardio e extremo para avaliar toxicidade, o uso de biomarcadores, que são alterações de natureza bioquímica, fisiológica e morfológica, vêm ganhando espaço em muitos países, inclusive em termos legislativos (JIMENEZ & STEGEMAN, 1990).

A integridade biológica de uma comunidade de peixes é um ótimo indicador da saúde de um ecossistema aquático, sendo o peixe um indicador biológico confiável para medir níveis de possível degradação ambiental. Peixes são sensíveis às mudanças ambientais de diversas naturezas e apresentam uma vida longa, podendo suas populações indicar o nível de êxito na reprodução e também a mortalidade em idades diferenciadas. Consequentemente, podem ser utilizados como registro de mudanças ambientais a longo prazo (KARR *et al.*, 1987).

Cada vez mais bioindicadores, que são os organismos-teste nos quais se estuda a detecção de alterações em níveis morfológicos, fisiológicos, e moleculares, vêm sendo utilizados e se mostrado como ferramentas de extrema relevância no auxílio às investigações que visam detectar perturbações ambientais. Geralmente são utilizados testes de exposição relativamente curta para avaliação dos efeitos agudos e testes de longa duração para avaliação dos efeitos crônicos, apontados por parâmetros específicos. Efeitos comuns indicando alterações no

comportamento fisiológico, imunológico e patológico em peixes são: redução do crescimento, da performance do nado, resistência à doenças alterada e, modificação do padrão reprodutivo (THOMAS, 1990), até mesmo modificações de comportamento e de distribuição populacional (MUNKITTRICK *et al.*, 1994).

Indicadores bioquímicos/fisiológicos em diversos organismos podem revelar condições de sobrevivência adversas antes que manifestações clínicas mais drásticas comecem a aparecer (JIMENEZ & STEGEMAN, 1990).

Biomarcadores têm a capacidade de integrar os efeitos de múltiplos estresses e ajudam a compreender os mecanismos desses efeitos (HUGGETT *et al.*, 1992). Trata-se de células isoladas, sistemas enzimáticos e organelas que são utilizadas em estudos de toxicidade de compostos presentes em efluentes industriais geralmente despejados em rios, e podem contaminar grandes áreas, comunidades, lençóis freáticos e inclusive, o abastecimento hídrico para uso humano (STEGEMAN & JIMENEZ, 1990).

São considerados ferramenta indispensável em programas de monitoramento ambiental por apresentarem boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993).

1.7. MODIFICAÇÕES DO SISTEMA ENDÓCRINO

A exposição aos poluentes ambientais pode, portanto, trazer diminuição no tempo de vida de indivíduos e diminuição da eficiência reprodutiva, causando diversos transtornos na cadeia alimentar e consequências catastróficas a longo prazo na sobrevivência de toda a população (THOMAS, 1990).

Muitos estudos vêm apontando correlações entre exposição aos organoclorados e certas formas de câncer, problemas neurológicos e alterações do sistema hormonal, refletindo este último item diretamente na reprodução de espécies aquáticas e humana por ação dos EDCs (endocrine-disrupting chemicals) (QUEVEDO; BAZAÑES; BARBARIN, 2001).

Estudos sobre a desregulação hormonal em peixes sugerem que combinações de misturas químicas complexas, que respondem por alterações na reprodução de peixes, estão presentes em efluentes de

polpa Kraft branqueada (LEHTINEN & TANA, 2001). Além destas alterações, também se demonstrou a habilidade destas misturas químicas em provocar alterações no funcionamento hormonal em tilápias (KENDALL *et al.*, 1998) e trutas expostas (MELLANEN *et al.*, 1996).

Estudos com ácido abiético demonstraram o efeito tóxico desta resina ácida, uma vez que a mesma conferiu efeitos estrogênicos quando exposta em cultivo de células (MELLANEN *et al.*, 1996).

Apesar de várias resinas ácidas apresentarem fácil biodegradação, alguns de seus componentes como o ácido desidroabiético podem permanecer por longos períodos antes que seja totalmente degradado. Por exemplo, Tavandale (1996) demonstrou que estas resinas não sofreram degradação suficiente no sedimento em um período de 40 anos (LEHTINEN & TANA, 2001).

Os peixes apresentam muitas vantagens nos estudos da desregulação hormonal, pois seu mecanismo endócrino é muito similar ao dos mamíferos, mesmo que respeitadas algumas divergências (TAKATSUKI & YAMAGUCHI, 2001).

1.8. DISTÚRBIOS DA REPRODUÇÃO

Muitas destas substâncias químicas encontradas nos efluentes tratados e não tratados de indústrias papeleiras, como os estrógenos sintéticos, desregulam o sistema endócrino e causam uma alteração na diferenciação sexual dos peixes (e.g., ARCAND-HOY e BENSON, 1998; LANGE *et al.*, 2001).

Múltiplos sítios de ação podem ser modificados em decorrência da exposição à determinadas substâncias químicas, causando distúrbios na função reprodutiva dos peixes (KAZETO *et al.*, 2004). A masculinização reportada em áreas de despejo de indústrias papeleiras, como em estudos feitos na Suécia, pode gerar grave desequilíbrio ecológico (LARSSON & FORLIN, 2002).

As alterações nos genes codificadores de enzimas esteroidogênicas pode alterar negativamente a produção de estradiol (E2) (KAZETO *et al.*, 2004). Os desreguladores endócrinos e seus metabólitos podem associar-se ao ligante do receptor fisiológico nas

células das gônadas ou órgãos acessórios sexuais, mimetizando a ação do hormônio e promovendo a estimulação do receptor (agonista). Podem também alterar a afinidade de ligação do receptor pelo hormônio em outros casos, bloqueando ou diminuindo a ligação e sua atividade fisiológica natural (antagonista) (SOARES *et al.*, 1997).

1.9. CARACTERIZAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é originária do continente africano e foi introduzida no Brasil na década de 1950, sendo encontrada em quase todo o país, tanto em cultivos comerciais quanto em reservatórios e açudes.

No Brasil são cultivadas diversas linhagens de tilápias, dentre as quais a de cor cinza e a de cor vermelha merecem destaque pela produção e consumo nacional (KUBITZA, 2006). As tilápias, mais comumente cultivadas, toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido (KUBITZA, 2000). A *O. niloticus* é uma espécie tropical e subtropical, que prefere viver em águas doce e rasa, alimentando-se de fitoplâncton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, fauna bentônica e detritos (IGARASHI, 2008). Sistemáticamente, são peixes teleosteos (Teleostei), possuindo uma das três infraclases da classe Actinopterygii (do grego aktis, raio + pteryx, nadadeira; asa) de peixes ósseos (RODRIGUES, 2009).

Atinge maturidade sexual em torno de seis meses, além de serem altamente prolíferas (podem gerar 4 desovas/ano) (KUBITZA, 2005; FAO, 2010). A maioria das espécies protege sua cria na boca, onde são chocados. Isso ajuda os ovos a ficarem oxigenados e os previne de serem atacados por bactérias, fungos e demais predadores (KUBITZA, 2000). O conforto térmico das tilápias varia entre 27 °C a 32 °C, ficando as temperaturas acima de 38°C e abaixo de 12°C com mortalidades significativas, e esta espécie pode viver até 9 anos (KUBITZA, 2000).

Como regra geral, valores de pH de 6,5 a 9,0 são mais adequados à produção de peixes. Valores abaixo ou acima desta faixa podem prejudicar o crescimento e a reprodução e, em condições extremas, causar a morte dos peixes (OSTRENSKY & BOEGER, 1996).

Ainda apresentam dimorfismo sexual, ou seja, é possível diferenciar machos de fêmeas, no qual os machos apresentam dois orifícios, o ânus e o orifício urogenital (abertura por onde passam urina e sêmen) e as fêmeas apresentam três orifícios, o ânus, a abertura genital (microscópica, semelhante à meia lua) e a urinária (RIBEIRO, 2001), além da diferença de porte entre eles, sendo os machos maiores que as fêmeas (LIMA; LOURES, 2001).

Classificação da Tilápia do Nilo:

- *Classe: Actinopterygii
- *Ordem: Perciformes
- *Família: Cichlidae
- Subfamília: Pseudocrenilabrinae
- *Gênero e espécie: *Oreochromis niloticus*
- *Nome comum: Tilápia do Nilo

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a toxicidade dos efluentes de produção de polpas não branqueadas tratados pela indústria utilizando tilápias nilóticas como bioindicador em experimentos de laboratório, usando como referência um grupo de peixes não expostos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Dosagem da concentração plasmática dos hormônios estradiol e testosterona em peixes expostos e não expostos ao efluente;
- 2) Dosagem da concentração de proteínas plasmáticas totais, colesterol total e fração LDL em peixes expostos e não expostos ao efluente;
- 3) Dosagem do hematócrito de peixes expostos e não expostos ao efluente;
- 4) Avaliação do índice hepatossomático de peixes expostos e não expostos ao efluente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PEIXES

Os peixes estudados foram tilápias (*Oreochromis niloticus*) adultas; fêmeas, peso de 70-90 g. São espécies exóticas, invasoras, que têm sido usadas como organismos bioindicadores de poluição por apresentarem ampla distribuição geográfica e características ecológicas conhecidas.

Os peixes foram capturados em um açude no município de São Pedro de Alcântara, SC cuja qualidade da água tem sido mantida sob condições controladas, e em seguida trazidos para o Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica na UFSC. Foi realizado um período de aclimação por 60 dias em tanques de 310L. As condições ambientais do Laboratório foram controladas, com temperatura de 24-26°C, iluminação em fase claro/escuro (12/12h). As tilápias foram alimentadas com ração comercial uma vez ao dia, pela manhã, e mantidas sob oxigenação constante. A classificação sexual foi baseada em observação dos orifícios genitais.

3.2. EFLUENTE

Foi utilizado o efluente final do processo de produção de polpas não branqueadas. O efluente foi previamente tratado pela indústria através da tecnologia de lodo ativado. A indústria está localizada no município de Otacílio Costa, SC. O efluente foi armazenado em bombonas de material plástico, mantidas sob proteção da luz solar e em temperatura de 4 °C.

O efluente chegou ao laboratório com as seguintes características: pH 6,8 e condutividade 0,968; oxigênio dissolvido 7,0 – 7,6 mg/ml, demanda química de oxigênio 432mg/L. As análises físico-químicas da água efluente (DBO, DQO, pH, condutividade elétrica e O₂ dissolvido), foram realizadas segundo as normas descritas por método-padrão APHA (APHA AWWA, 1998).

3.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA

Para estes experimentos foram utilizados 2 grupos de 10 peixes fêmeas, um grupo controle não exposto ao efluente e um grupo exposto ao efluente, mantidos durante 2 semanas em tanques plásticos de 310 L. Foram analisados 5 animais de cada grupo, em cada semana, sendo que os peixes foram expostos ao efluente diluído (1/50) e de maneira idêntica, 5 peixes controle, não expostos ao efluente. O sangue foi coletado da veia caudal com uma agulha 25x7G acoplada a uma seringa de 3ml e heparinizada. O sangue coletado foi depositado em tubos eppendorf dispostos em recipiente com gelo. Com o sangue desses tubos tipo eppendorf, preencheram-se tubos capilares para micro-hematócrito vedados com massa apropriada. Em seguida, o sangue foi centrifugado. Paralelamente, preparou-se um tubo de microhematócrito para mensuração do hematócrito. Com a centrifugação do sangue obteve-se o plasma para a realização das dosagens bioquímicas. Após a coleta de sangue, fez-se a eutanásia dos peixes por secção da medula espinhal. Em seguida, foi medido o corpo e coletado o fígado para pesagem.

3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas de metabólitos sangüíneos e parâmetros hematológicos foram realizados através de técnicas convencionais em análises clínicas. A determinação da concentração de estradiol e testosterona foram feitas por imunofluorescência. Os metabólitos plasmáticos: proteínas totais, colesterol total e fração LDL - foram dosados por colorimetria utilizando-se kits comerciais.

3.5. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

A mensuração do peso dos peixes foi feita logo após a eutanásia. Em seguida, pesou-se o fígado e gônadas para então poder estipular os índices somáticos respectivos. A formula empregada para este cálculo foi a seguinte: $IS = \text{peso do tecido} / \text{peso total do indivíduo}$.

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com a auxílio do software StatGraph. Para as análises entre grupo testado e grupo

controle, foi utilizado o Teste t, e quando ocorreram diferenças significativas, foi utilizado o Teste Anova entre os dados do grupo testado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Recentes evidências mostraram que os mecanismos pelos quais os desreguladores endócrinos agem são muito mais vastos do que se costumava acreditar, atuando em inúmeras vias que abrangem hormônios endócrinos e o sistema reprodutivo (SCHUG *et al.*, 2011). Estas substâncias, podem portanto, influenciar de diversas maneiras a quantidade e a qualidade final reprodutiva considerada normal nestes organismos.

Estudos prévios demonstraram que efluentes da produção de polpas branqueadas com cloro molecular afetam as concentrações plasmáticas de hormônios tais como estradiol e testosterona em machos e fêmeas de tilápia, embora demonstrando comportamentos diferenciados entre grupos de machos e grupos de fêmeas (ZUNINO, 2006). No atual estudo, foram avaliados os efeitos de efluentes da produção de polpas não branqueadas em fêmeas. Esses resultados são importantes, pois podem demonstrar que não são apenas os compostos organoclorados, provenientes do branqueamento, os responsáveis pela toxicidade dos efluentes. Em outras palavras, efluentes oriundos do ramo industrial de papel e celulose possuem componentes químicos que podem, intrinsecamente, apresentar toxicidade e, em especial, atuarem como desreguladores hormonais.

4.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES FÊMEAS AO EFLUENTE

4.1.1. EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA

A avaliação dos resultados do presente experimento com o grupo das fêmeas demonstrou que a exposição dos peixes ao efluente pode promover a redução da concentração plasmática de testosterona na primeira semana, seguida pelo aumento da concentração na segunda semana (Figura 1). Embora a tendência de alteração seja semelhante à

observada para peixes machos em estudos anteriores, a variação ao longo do tempo de exposição apresentou diferença significativa, caracterizada por redução e aumento subsequente. Portanto, considerando-se que os efeitos foram semelhantes para ambos os efluentes já testados, efluente de polpa-branqueada e não-branqueada, os mecanismos bioquímicos operantes da desregulação hormonal, provavelmente, também podem ser semelhantes. O aumento da testosterona plasmática observado pode promover alterações nos caracteres sexuais secundários dos peixes, pela nova relação entre testosterona e estradiol, porém, esses possíveis efeitos não foram avaliados neste estudo.

Os chamados desreguladores endócrinos podem agir de diversas maneiras, podendo provocar interferências na síntese, transporte, secreção, atividade e eliminação dos hormônios naturais. Neste caso, componentes químicos ativos do efluente promoveram aumento da biossíntese ou liberação do hormônio no sangue, fato esse que certamente irá influenciar na capacidade reprodutiva deste organismo.

Alguns estudos anteriores envolvendo peixes expostos à efluentes de indústrias de papel e celulose demonstraram que decréscimos nos níveis circulantes de esteróides sexuais gonadais (testosterona, estradiol, ketotestosterona) coincidem com o decréscimo do tamanho da gônada. Estudos anteriores feitos em peixes White sucker (*Catostomus commersonii*) expostos à efluentes de polpas mostraram que ambos os sexos apresentaram baixos níveis de hormônios sexuais em zonas de exposição aos efluentes, e tiveram afetadas as funções do eixo pituitária-gonadal. Isso inclui redução dos níveis de gonadotrofina II, LH (hormônio luteinizante), redução dos esteróides sintetizados pelos ovários, e alteração do metabolismo esteróide periférico (HEWITT *et al.*, 2007).

Figura 1: Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - nos níveis de testosterona plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa a média de duas semanas do grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; "a" representa valores estatisticamente não diferentes do controle; "b" valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

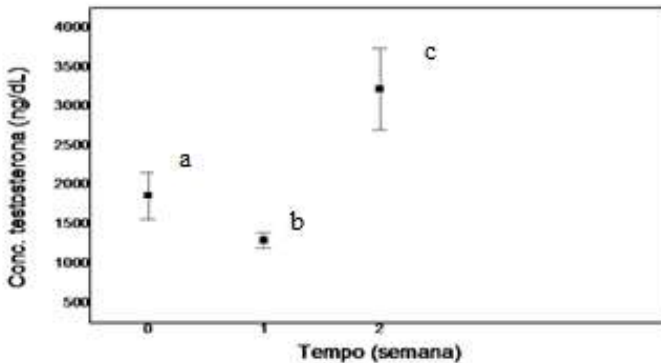


Figura 1. NUNES, 2015

4.1.2. EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL

No presente estudo, a exposição dos peixes a concentração de efluente ocasionou uma diminuição da concentração plasmática de estradiol (figura 2), resultado esse que também foi encontrado anteriormente em outros estudos com outro tipo de efluente.

A concentração plasmática do hormônio estradiol dos peixes expostos ao efluente se reduziu na primeira semana, e continuou significativamente menor do que o controle na segunda semana. (Figura 2).

Figura 2 : . Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - nos níveis de estradiol plasmático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa a média de duas semanas do grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; "a" representa valores estatisticamente não diferentes do controle; "b" valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

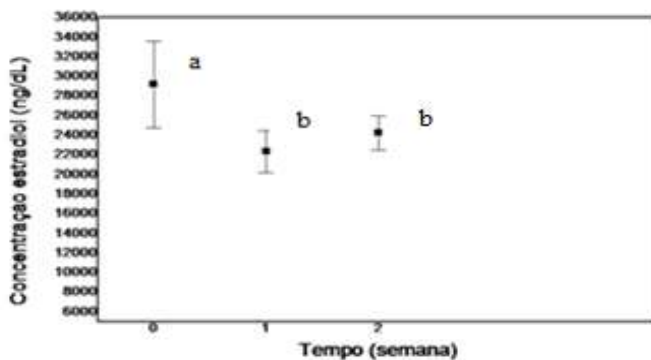


Figura 2. NUNES, 2015

Portanto, as alterações hormonais observadas nesse estudo seguiram um direcionamento semelhante às observadas em estudos anteriores, indicando um aumento de testosterona e uma diminuição de estradiol, sugerindo um efeito androgênico provocado pela exposição ao efluente. Portanto, notou-se um aumento na relação hormonal entre testosterona e estradiol quando comparado com o grupo controle (Figura 1 comparada com a Figura 2).

Em testes com 11 efluentes de indústrias de fábricas de celulose e papel, mostraram a indução VTG (vitelogenina, substância precursora do vitelo dos ovos cuja síntese é induzida por estradiol e substâncias estrogênicas) como a resposta mais freqüente. Num estudo na América do Sul, trutas expostas 29 dias em laboratório à sedimentos recolhidos abaixo da descarga de 4 indústrias de celulose e papel no rio Biobio (Chile) mostraram indução plasmática de VTG, indicando alteração na reprodução dos peixes. O aumento do nível de VTG também foi

associado ao aumento do tamanho das gônadas e da presença de folículos ovarianos mais maduros em fêmeas (HEWITT *et al.*, 2007).

4.1.3. EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL

A análise da Figura 3 demonstra que ocorreu uma diminuição dos níveis de colesterol na primeira e segunda semanas, sendo que o perfil da variação foi muito semelhante ao do hormônio estradiol. Este resultado mostrou que, neste caso, o aumento da concentração hormonal de origem esteróide foi coerente com os níveis da concentração plasmática de colesterol. Tal resultado corrobora a suposição de que o efluente foi capaz de alterar a biossíntese dos hormônios esteróides.

Figura 3: Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - nos níveis de colesterol total plasmático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa a média de duas semanas do grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; "a" representa valores estatisticamente não diferentes do controle; "b" e "c" valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

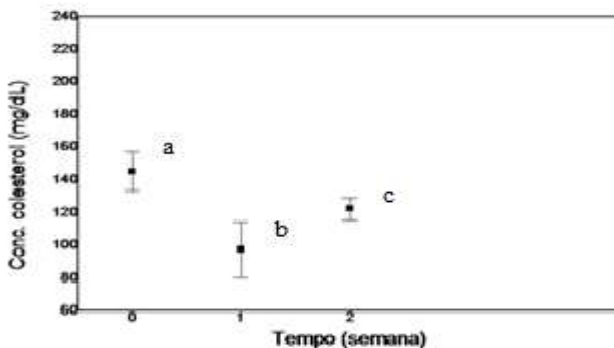


Figura 3. NUNES, 2015

Estudos no Canadá com efluentes de produção de polpas identificaram compostos químicos que podem afetar os níveis de esteróides em *Fundulus heteroclitus*. Outros estudos também demonstraram que compostos reduziram prontamente a biodisponibilidade de testosterona em poucos dias (HEWITT *et al.*, 2007).

Por outro lado, um dos pontos cruciais na regulação da via esteroidogênica para produção de hormônios esteróides depende da proteína regulatória envolvida na translocação do colesterol para dentro da membrana mitocondrial (StAR) e a disponibilidade da mesma para ação do citocromo P450, os quais iniciam a biossíntese de esteróides (STOCCO, 2000). Recentes estudos mostraram que resinas ácidas tipo ácido abiético podem reduzir a expressão gênica desta proteína em zebrafish exposto a mesma (SOARES *et. al.*, 2015). O efluente utilizado neste estudo contém resinas ácidas em sua composição.

4.1.4. EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE LDL

A concentração da fração LDL não apresentou alteração significativa até a segunda semana (Figura 4), comportamento esse que não correlacionou exatamente com o aumento da testosterona ou a redução de estradiol, como seria de se esperar, uma vez que a biossíntese de hormônios esteróides é realizada a partir da fração LDL de colesterol. Esse resultado pode significar que o passo limitante da biossíntese nesse caso, é o metabolismo de colesterol na gônada.

Figura 4: Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - nos níveis de colesterol total plasmático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa a média de duas semanas do grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; "a" representa valores estatisticamente não diferentes do controle; e "b" valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

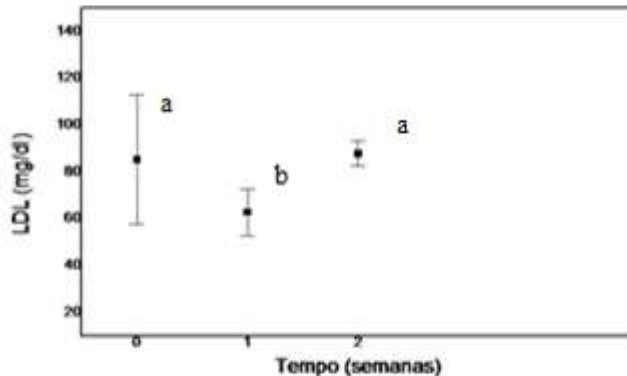


Figura 4. NUNES, 2015

4.1.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO NO ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

Para o índice hepatossomático, ocorreu um aumento na primeira semana e uma discreta redução na segunda, porém, não retornou para os níveis estatisticamente semelhantes aos do grupo controle.

Este aumento nas primeiras semanas (Figura 5) pode representar uma resposta à exposição do organismo aos xenobiontes, porém, o fígado parece começar a se adaptar a exposição. Neste caso, os mecanismos operantes no fígado que pudessem explicar o resultado obtido não foram avaliados neste estudo.

Figura 5: Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - no índice hepatossomático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa o grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; “a” representa valores estatisticamente não diferentes do controle; “b” valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

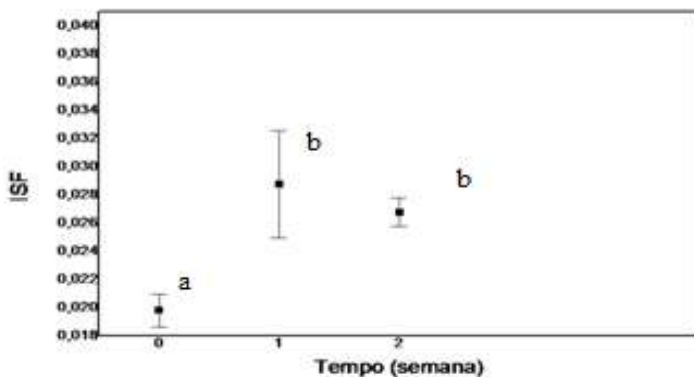


Figura 5. NUNES, 2015

Porém, estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram efeitos característicos de estresse oxidativo, tais como a indução de enzimas, por exemplo, o Citocromo P450 e outras defesas não enzimáticas antioxidantes, particularmente, GSH (glutaciona peroxidase). A relação deste grupo de enzimas oxidativas e a biossíntese de esteróides também é bem conhecida (UNESP, 2015). Em peixes, assim como em mamíferos, um dos sítios importantes ou mais operantes do processo de desintoxicação, nos quais ocorre a metabolização dos xenobiontes, é constituído primariamente pelo fígado. Um conhecido mecanismo de “defesa” operado pelo fígado na biotransformação de xenobióticos, é a produção de citocromos conhecidos como P450, relatados em diversos trabalhos mundialmente (JOHSEN *et. al.*, 1995; PLAA & HEWITT, 1989).

4.1.6

EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

Neste estudo, foi demonstrado que a concentração das proteínas totais aumentou na primeira e segunda semanas (Figura 6). Neste caso, o aumento de proteínas totais plasmáticas pode estar diretamente relacionado com o aumento da perda de proteínas teciduais, por exemplo pelo fígado, bem como pela liberação de proteínas envolvidas em processos de defesa do organismo pela exposição do mesmo ao efluente, como acontece no caso dos citocromos P450. Em outras palavras, poderia ocorrer algum tipo de interação entre compostos presentes no efluente e as proteínas séricas que estão envolvidas nas funções imunológicas e/ou endócrinas. Dois importantes grupos de proteínas envolvidas na função endócrina são; globulina transportadora de hormônios sexuais, as quais se ligam a estradiol, testosterona e dehidrotestosterona, e globulinas transportadoras de corticosteróide, as quais se ligam a glicocorticóides e progesterona.

Figura 6: Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1/50 - nos níveis de proteína total plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3. O tempo = 0 representa a média de duas semanas do grupo de peixes controle, não expostos. Os símbolos; "a" representa valores estatisticamente não diferentes do controle; "b" valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente.

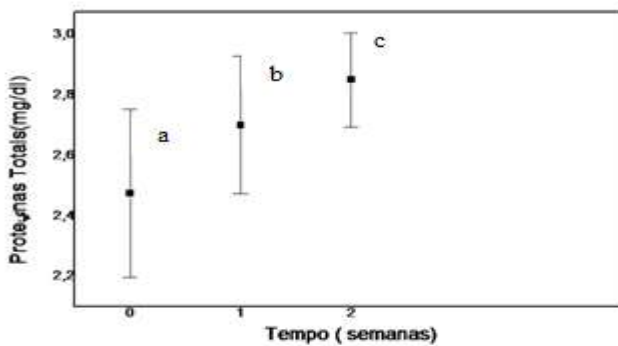


Figura 6. NUNES, 2015.

4.1.7 HEMATÓCRITO

O hematócrito é um dos mais importantes exames hematológicos, em especial dos eritrócitos. É um exame rápido, de boa reprodutibilidade e preciso, que exige uma pequena quantidade de sangue para sua realização. A avaliação de seu resultado indica o volume ocupado pelos eritrócitos contidos em determinada quantidade de sangue. Atualmente, a técnica do microhematócrito, a qual foi utilizada neste estudo, é a mais difundida.

Os resultados obtidos nas dosagens do hematócrito neste estudo (Figura 7) demonstraram que os peixes expostos ao efluente apresentaram hematócrito mais elevado do que os peixes controle.

Hematócrito mais elevado pode indicar um aumento no número de células sanguíneas ou um aumento do volume dessas células. Neste caso, com base nos nossos resultados anteriores, o aumento do hematócrito provavelmente é devido ao aumento do volume celular, uma resposta típica em resposta ao estresse provocado nos peixes.

Dados do hematócrito neste estudo (figura 7):

Figura 7: . Efeito de exposição ao efluente – Concentração de 1/50 – nos níveis de hematócrito plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante e pH 6,6-7,3.

peixe	T=0	1a semana	2a semana
controle	22% +/- 3%	21% +/- 4%	23% +/- 3%
exposto	22% +/- 4%	27% +/- 3%	26% +/- 5%

Figura 7. NUNES, 2015

5. CONCLUSÃO

O efluente estudado apresenta fortes indícios de ação endócrino desreguladora e de apresentar significativa toxicidade aos organismos utilizados como bioindicadores, as tilápias do Nilo. Ao estabelecer uma nova relação entre os hormônios esteróides testosterona e estradiol, os peixes expostos apresentaram níveis que apontam para um potencial masculinizante, o qual certamente poderá influenciar no sucesso reprodutivo do organismo. A longo prazo, estes efeitos podem comprometer na relação entre machos e fêmeas destes organismos no seu habitat, bem como comprometer demais níveis tróficos em casos de redução populacional.

Resultados obtidos neste estudo, como os valores do índice hepatossomático, nível de proteínas plasmáticas totais e hematócrito, sugerem efeitos de toxicidade, indicando um estresse tóxico que estes organismos sofrem ao serem submetidos à exposição de efluentes desta natureza, sugerindo efeitos negativos na qualidade de vida e, também podendo sugerir uma possível redução no tempo de vida dos indivíduos expostos.

Trabalhos complementares são necessários para apontar quais substâncias presentes no efluente são responsáveis por tais efeitos e, quais os mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios encontrados. Porém, é possível inferir os níveis tóxicos encontrados nos organismos expostos ao efluente estudado, e concluir que o tratamento oferecido a este efluente foi insuficiente para abster os organismos-teste de efeitos correlacionados com a qualidade e manutenção da vida dos mesmos.

6. REFERÊNCIAS

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** 20th Edition. United Book Press, Inc., Baltimore, Maryland, 1998.

ARCANDO-HOY, L., BENSON, W.H., **Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption**. Environ. Toxicol. Chem. 17, p. 49–57, (1998).

BAINY, A.C.D. **How to Evaluate the Safety Chemical Substances in Aquatic Environments**. Ciência e Cultura, n.45, p. 10-11. (1993).

BAPTISTA, I. E. ; SOARES, C. H. L. ; ROSA, C. E. . **Caracterização do estresse metabólico em peixes expostos a efluente do processo de produção de polpas branqueadas**. In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da SETAC LA, 2002, Vitória. VII ECOTOX e V Reunião da SETAC LA - Ecotoxicologia e os novos desafios no Monitoramento Ambiental - Livro de Resumos. Vitória: Gráfica ITA, p. 122-122, (2002).

BRACELPA, 2015. Estatísticas, Disponível em <<http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/139>>. Acesso em 28/06/2015.

CARLBERG, G.E., *et al.* **Environmental impact of organochlorine compounds discharged from the pulp and paper industry**. Papperi já Puu - Paper och Trä, 4: p. 337-341, (1987).

COSTA, R., **Meio ambiente, preocupação das pesquisas com papel**, 2004.

COLODETTE, J.L.; SILVA, M.R. **Mill Experience using a Hot Acid Stage for Eucalyptus Kraft Pulp Bleaching. In: International Pulp Bleaching Conference**, Atlanta. p. 287-297. (2002).

CPRH – Companhia Pernambucana do Meio Ambiente. **Roteiro Complementar de Licenciamento e Fiscalização: Indústria de papel e Celulose Recife**: p95,(1988).

FÖRLIN, L., et al. Biochemical and physiological effects of pulp mill effluent on fish. In: **Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluent**. Proceedings of the SEPA Conference, Stockholm, p. 19-21 November, 1991.

HODSON, P.V., et al. Review of biochemical, physiological, pathological and population responses of white sucker to BKME in St. Maurice river, Quebec. In **Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluent. Proceedings of the SEPA Conference**, p. 19-21. Stockholm, November, 1991.

HUGGETT, R.J., KIMERLE, R.A., MEHRLE, P.M., BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Edit by Lewis. p. 346. Boca Raton, 1992.

IGARASHI, M.A. **Característica do agronegócio da tilápia cultivada no Brasil: uma força ascendente**. PUBvet, v. 2, n. 25, 18 p., 2008.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. Archives on Veterinary Science, v. 13, n. 1, p. 54-

53, 2008.

JIMENEZ, B.D. & STEGEMAN, J.J. **Detoxication Enzymes as Indicator of Environmental Stress on Fish: Biological Indicators of Stress in Fish.** American Fisheries Society Symposium, 8: p.67-79,(1990).

KARR, J.R., P.R. YANT, K.D., SCHLOSSER. **Spatial and temporal variability of the index of biotic integrity in three Midwestern streams.** Transactions of the American Fisheries Society 116:1-11 In: THOMAS, P. Molecular and Biochemical Answers of Fish goes and STRESSORS and it the Uses Potential of them / of them Monitoring Environmental. The University of Texas Marine Science Institute Port Aransas, Texas , 1987.

KAZETO, Y., PLACE, A.R., TRANT, J.M. **Effects of Endocrine disrupting Chemicals on the Expression of CYP19 genes in zebrafish (Danio rerio) juveniles.** Aquatic Toxicol 69:25-34, (2004).

KENDALL, R. DICKERSON, R., GIESY, J. **Principles and process for avaluating endocrine disruption in wildlife ed. SETAC,** Society of Environmental Science Technology, v. 18(8): 236A-248A, 1998.

KRINSTAD, K.P., LINDSTROM, K. **Spent liquors from pulp bleaching.** Environmental Science Technology, 18(8):p.236A-248A, (1984).

KUBITZA, F. **Questões Tilápias: qualidade das águas, sistemas de cultivo, planejamento de produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade.** Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro, v. 10, n. 59, p. 44-53, 2000.

_____. **Tilápia em água salobra e salgada.** Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 15, n. 88, p. 14-18, 2005.

_____. **Questões mais frequentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de tilápia.** Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 16, n. 97, p. 14-23, 2006.

JOHNSEN, K.; TANA, K.; LEHTINEN, K.; STUTHRIDGE, T.; MATTSSON, K.; HEMMING, J.; CARLBER, G. **Experimental Field Exposure of Brown Trout to River Water Receiving Effluent from an Integrated Newsprint Mill.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 40. p. 184-193. (1995).

LANGE, R., HUTCHINSON, T.H., CROUDACE, C.P., SIEGMUND, F., SCHWEINFURTH, H., HAMPE, P., PANTER, G.H., SUMPTER, J.P. **Effects of the synthetic estrogen 17-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*).** Environ. Toxicol. Chem. 20, p. 1216–1227, (2001).

LARSSON DGJ, FÖRLIN L. **Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: Temporary recovery after a short-term shutdown.** Environ Health Perspect 110:739-742, (2002).

LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

LIMA, S.; LOURES, B. R. R. **Fisiologia de peixes.** In: MOREIRA, L. M. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da aquicultura moderna.** Canos: ULBRA. p. 91 – 121. , (2001).

MUNKITTRICK, K.R., KRAAK, G.J.V. **Receiving water environmental effects associated with discharges from Ontario pulp mills.** Pulp & Paper Canada, 95(5):p.57-59 (1994).

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo. Guaíba: Agropecuária, 211 p. (1996).

PATT, R., GEHR, V., MATZKE, W. et al. **New approaches in bleaching of recycled fibers.** Tappi Journal, Atlanta, v.79, n.12, p. 143-151, (1996).

PLAA, G.L.; HEWITT, W.R. **Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury.** In: Principles and Methods of Toxicology. Hayes, A.W. (Ed.). 2nd Edn. Raven Press, New York, USA., ISBN: 9780881674392, pp: 399-628.(1989).

QUEVEDO, A.; BAZAÑES, L.I.; BARBARIN, M.P.; **El árbol como matéria prima.** Disponível em: [http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/ industrial/ libro-12.pdf](http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/industrial/libro-12.pdf)>. (2001).

RIBEIRO, R. P. Espécies exóticas. In: MOREIRA, L. M. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da aquicultura moderna.** Canoas: ULBRA, p. 91-121. (2001).

SCHUG, T.T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J.J. **Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 127. p. 204-215. (2011).

SOARES, C.H.L. **“Papel e celulose, Biotecnologia e Meio Ambiente”**. Florianópolis – SC: Edit. Seloverde, 2004.

SOARES, C.H.L.; DURÁN, N. **Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained into E1-pulp bleaching effluent by fungal treatment**. Applied Biochemistry and Biotechnology v. 82, n.3, p. 956-968. (2001).

SOARES, C.H.L., et al. Histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to pulp bleaching effluent. **Caderno de Resumos do International Symposium on Biology of Tropical Fishes**, Manaus, p. 116. (1997).

SÖDERGREN, A. **Bleached Pulp Mill Effluents; Composition, fate and effects in the Baltic Sea: Swedish**. Environmental Protection Agency Report 4047. (1993).

STEGEMAN, J.J., M. Brouwer, R.T. Di Guiulo, L. Forlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders and P.A. Van Veld. **Molecular Responses to Environmental Contamination – enzyme and protein systems as indicator of chemical exposure and effect**. In **Biomarkers- Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, edit by R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.A. Mehrle and H.L. Bergman, Lewis Publishers, p. 235-335, Chelsea. 1992.

STOCCO, D.M., **The role of StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future**. J. Endocrinol 164:p.247-253, (2000).

STUS, W.L. **Color stripping of recycled wood-free papers using ozone**. Kalamazoo, Michigan: Western Michigan University. 59p. (A Thesis to requirements for the Senior Design PAPR 473 Course), 1996.

SUNTIO, L.R.; SHIU, W.Y.; MACKAY, D.A **Review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents.** *Chemosphere* v.17, n. 7, p. 1249-1290, (1988).

TALKA, E.; PRIHA, M. **Fractionation and identification of some biologically active compounds in bleached Kraft mill effluents.** *Paperi ja Puu – Paper och trä.* V. 3, p. 221-228. (1987).

TAKATSUKI, A., YAMAGUCHI, I. **Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds.** *Riken Review* N° 42: Focused on Ecomolecular Science Research, 2001.

THOMAS, P. **Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring in “Biological Indicators of Stress in Fish”** 8th Symposium of The American Fisheries Society Ed. Adams, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 9-28. (1990).

THOMPSON, G. *et al.* **The treatment of pulp and paper mill effluent: a review.** ELSEVIER. *Bioresource Technology* 77 275-286 (2001).

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. In the Evaluation of Toxicological Data for the Protection of Public Health.** p. 339-413. Oxford, 1977.

UNESP, 2015. Graduação Engenharia Aulas, Disponível em < <http://www.bio.ibilce.unesp.br/~tercilia/graduacao/engenharia/aulas/reticulo.PDF>>. Acesso em 28/06/2015.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B.
Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis. p.321. Londres. (1996).

ZUNINO, P.A.A. **Avaliação da Desregulação Endócrina em Peixes Expostos a Efluentes de Indústria de Papel e Celulose.** Florianópolis, 2006.