



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA**

**NEUROTOXICIDADE E HEPATOTOXICIDADE INDUZIDAS PELA**  
**EXPOSIÇÃO *IN VITRO* AO CHORUME DE ATERRO SANITÁRIO EM RATOS**  
**E CAMUNDONGOS**

**Karine Bertoldi**

**Porto Alegre, 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA**

**NEUROTOXICIDADE E HEPATOTOXICIDADE INDUZIDAS PELA**  
**EXPOSIÇÃO *IN VITRO* AO CHORUME DE ATERRO SANITÁRIO EM RATOS**  
**E CAMUNDONGOS**

Karine Bertoldi

**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  
parcial para obtenção do Título  
de Mestre.

**Porto Alegre, 2012**

*“É mais frequente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento: são os que conhecem pouco, e não os que conhecem muito, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência.”*

Charles Darwin

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe que foi meu exemplo de vida e sempre me incentivou para que eu estudasse e buscasse meus objetivos.

Ao meu pai e à minha irmã Maqueli que estão sempre presentes, me apoiando e me incentivando em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Gustavo por ter me ajudado tanto nessa etapa final do mestrado, auxiliando na construção e revisão da minha dissertação.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório pela ajuda e companheirismo, vocês são demais.

À professora Elaine pela doação dos camundongos que foram de fundamental importância para a realização do meu trabalho.

Ao professor Marco Antônio pela ajuda na construção da idéia e parceria para que este trabalho pudesse ser realizado.

À minha orientadora Ionara pelos anos de trabalho juntas, pela orientação, pelas oportunidades e pelo incentivo à busca por novos conhecimentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia pela oportunidade da realização do mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. RESÍDUOS SÓLIDOS	2
1.2. ATERROS SANITÁRIOS	3
1.3. CHORUME	5
1.4. TRATAMENTO DO CHORUME	7
1.4.1. Tratamento Fotoeletrooxidativo	8
1.5. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS	9
1.6. RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	10
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. CHORUME	16
3.1.2. Tratamento Fotoeletrooxidativo	16
3.1.3. Parâmetros Químicos do Chorume	18
3.2. ANIMAIS	18
3.3. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	19
3.3.1. Preparação das Amostras	19
3.3.2. Incubação com o Chourme	19
3.3.3. Níveis de Radicais Livres	20
3.3.4. Lipoperoxidação	20
3.3.5. Atividade da Enzima Glutathione S-transferase	21
3.3.6. Dosagem de Proteínas	21
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	22
4.1. TRATAMENTO FOTOELETROOXIDATIVO	22
4.2. NEUROTOXICIDADE	23
4.2.1. Níveis de Radicais Livres	23
4.2.2. Lipoperoxidação	28
4.2.3. Atividade da Enzima Glutathione s-transferase	32
4.3. HEPATOTOXICIDADE	36
4.3.1. Níveis de Radicais Livres	36
4.3.2. Lipoperoxidação	36
4.3.3. Atividade da Enzima Glutathione s-transferase	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um aterro sanitário com os principais dispositivos.....	4
<b>Figura 2.</b> Redução do oxigênio, as quatro etapas de redução de um elétron para o oxigênio geram, progressivamente, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila mais água.....	11
<b>Figura 3.</b> Peroxidação lipídica das membranas celulares pela ação de radicais livres.....	13
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do reator: (1) Reservatório de vidro; (2 e 3) Eletrodos de óxido de titânio TiO/RuO <sub>2</sub> ; (4) Tubo de quartzo; (5) Lâmpada de vapor de mercúrio.....	17
<b>Figura 5.</b> Níveis de radicais livres em hipocampo incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação .....	25
<b>Figura 6.</b> Níveis de radicais livres em estriado incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	26
<b>Figura 7.</b> Níveis de radicais livres em cerebelo incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	27
<b>Figura 8.</b> Avaliação do índice de lipoperoxidação em hipocampo incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	29
<b>Figura 9.</b> Avaliação do índice de lipoperoxidação em estriado incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	30
<b>Figura 10.</b> Avaliação do índice de lipoperoxidação em cerebelo incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	31
<b>Figura 11.</b> Atividade da enzima glutathione S-transferase em hipocampo incubado com choro não tratado e choro submetido à fotoeletrooxidação.....	33

- Figura 12.** Atividade da enzima glutathione S-transferase em estriado incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação.....34
- Figura 13.** Atividade da enzima glutathione S-transferase em cerebello incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação.....35
- Figura 14.** Níveis de radicais livres no fígado incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação.....37
- Figura 15.** Avaliação do índice de lipoperoxidação em fígado incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação.....38
- Figura 16.** Atividade da enzima glutathione S-transferase em fígado incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação.....40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Destino final dos resíduos sólidos no Brasil 1989/2008.....	3
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas do chorume não tratado e do chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo.....	23
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros avaliados em diferentes estruturas cerebrais e fígados incubados com o chorume não tratado ou chorume submetido à fotoeletrooxidação comparados ao grupo controle (grupo 0% de chorume).....	41

**ABREVIATURAS**

**CAT** - catalase

**CDNB** – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

**COT** – carbono orgânico total

**DCF** – diclorofluoresceína oxidada

**DCFH-DA** – diacetato de diclorofluoresceína

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**DQO** – demanda química de oxigênio

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético

**ERO** – espécies reativas do oxigênio

**GPx** – glutaciona peroxidase

**GSH** – glutaciona

**GST** – glutaciona S-transferase

**MDA** – malondialdeído

**POA** – processo oxidativo avançado

**SH** – grupo tiol

**SOD** – superóxido dismutase

**TBA** – ácido tiobarbitúrico

**TBARS** – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCA** – ácido tricloroacético

**UV** – ultravioleta

## RESUMO

Atualmente, ocorre um grande aumento na geração de resíduos sólidos como consequência do crescimento populacional, juntamente com a expansão da indústria. O manejo inadequado dos resíduos sólidos gerados pode afetar a saúde pública e o meio ambiente. Neste contexto, os aterros sanitários são uma alternativa adequada de destinação destes resíduos, no entanto a confinamento seguida pela decomposição dos resíduos gera um efluente líquido denominado chorume. O chorume é um líquido escuro de odor desagradável e com alta carga de compostos orgânicos o qual, sem tratamento correto pode causar a poluição das águas subterrâneas e adjacentes. Estudos prévios demonstram uma relação entre a exposição ao chorume e o aumento de radicais livres e índices de lipoperoxidação em diferentes órgãos, inclusive no cérebro e fígado de roedores. Portanto, o estresse oxidativo pode ser um mecanismo bioquímico relacionado à toxicidade de xenobióticos como o chorume de aterros sanitários. A partir dessas informações torna-se necessária a busca por formas de tratamento eficientes para os agentes potencialmente tóxicos presentes no chorume. Uma alternativa de tratamento são os Processos Oxidativos Avançados (POAs) como o tratamento fotoeletrooxidativo que possui elevada capacidade e velocidade de degradação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a neurotoxicidade e hepatotoxicidade induzidas pela exposição *in vitro* ao chorume de aterro sanitário em roedores. Além disso, o chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo também foi testado em roedores para avaliar a eficiência do tratamento. Nossos resultados demonstraram que o chorume pode induzir estresse oxidativo em estruturas cerebrais e fígado tanto em camundongos quanto em ratos. Nós também observamos que o hipocampo é menos vulnerável ao dano oxidativo induzido pelo chorume do que o estriado e o cerebelo. No entanto, o estriado e o cerebelo, são mais suscetíveis ao dano quando comparados ao fígado. O chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo também induziu estresse oxidativo, principalmente, no estriado e no fígado e diminuiu a atividade da enzima glutathione S-transferase no estriado. Adicionalmente, nós podemos sugerir que a fotoeletrooxidação foi incapaz de alterar eficientemente os compostos tóxicos presentes no chorume.

## ABSTRACT

In the last decades, the solid waste has been increasing by great amounts due to world's population growth together with the expansion of the industrialization. The inadequate treatment of the solid waste constitutes an important environmental problem and can affect the public health. In this context, the landfills are an appropriate alternative for the destination of the waste; however, the confinement followed by decomposition of the solid waste produce a liquid effluent known as leachate. Leachate is a dark liquid formed within landfills with elevated concentrations of chemical compounds. The absence of its treatment may cause severe pollution to the groundwater aquifer and to the adjacent surface waters. Previous studies demonstrated a relationship between the leachate exposure and the increase of free radicals and lipid peroxidation in different organs of rodents, including the brain and liver. Therefore, oxidative stress may be a biochemistry mechanism related to toxicity of xenobiotics such as landfill leachate. In view of the toxicity induced by leachate, the development of new technologies of treatment becomes necessary. In this context, one of the alternatives are the Advanced Oxidation Processes such as the photoelectrooxidative process which is formed by combination of two methods and has a high capacity and speed of degradation. The aim of this study was to evaluate the neurotoxicity and hepatotoxicity induced by *in vitro* exposure to landfill leachate in rodents. Moreover, leachate submitted by the photoelectrooxidative process was tested in rodents to evaluate the efficiency of the treatment. Our results showed that the landfill leachate can induce oxidative stress in brain structures and liver in both rats and mice. Additionally, we observed that the hippocampus is less vulnerable to oxidative stress induced by leachate when compared to striatum and cerebellum. However, brain structures are more susceptible to oxidative damage compared to liver. Leachate submitted to photoelectrooxidative process also induced increase on oxidative parameters in different structures evaluated, and decreased the glutathione S-transferase activity in striatum. Finally, we can suggest that photoelectrooxidation was unable to alter efficiently the toxic compounds presents in leachate.

## 1. Introdução

O crescimento da população e da industrialização, juntamente com a melhoria do poder aquisitivo e as mudanças nos padrões de consumo, têm causado um aumento significativo na geração de resíduos sólidos no mundo todo. Estima-se que a geração de resíduos atual seja de aproximadamente 0,5 a 4,5 kg por pessoa diariamente (Li et al., 2006a).

A geração excessiva de resíduos necessita de medidas adequadas de controle, de modo a minimizar situações que acabem por desequilibrar o ecossistema. A determinação da composição química e da potencial toxicidade das substâncias liberadas no meio ambiente é indispensável para a proteção ambiental assim como para a proteção da saúde pública (Gajski et al., 2011). No caso de resíduos sólidos, a decomposição dos mesmos produz um efluente líquido, denominado chorume, cuja composição é variada e complexa. O chorume possui componentes altamente tóxicos e, portanto necessita de tratamento adequado antes de ser despejado no meio ambiente.

Já está bem descrito na literatura que uma pequena quantidade de chorume pode contaminar um grande volume de águas subterrâneas e adjacentes o que pode causar efeitos deletérios em diferentes níveis tróficos e ecológicos (Bakare et al., 2000, Christensen et al., 2001). Neste contexto, a busca por métodos de tratamento eficaz, além da avaliação e controle à exposição de substâncias como o chorume tornam-se fundamentais, visto que várias patologias podem estar relacionadas a interações genéticas e ambientais.

## 1.1. Resíduos Sólidos

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000), o Brasil gerou, em 2000, aproximadamente 161.000 toneladas de lixo urbano por dia, o que equivale a uma média de aproximadamente 0,95 kg por dia por habitante.

Os resíduos sólidos, quando gerenciados de forma inadequada, podem afetar a saúde pública e o meio ambiente. Os impactos provocados pelos resíduos sólidos podem atingir a população em geral através da poluição e contaminação dos corpos d'água e dos lençóis subterrâneos. Isto pode ocorrer de forma direta ou indireta, dependendo do uso da água e da absorção de material tóxico ou contaminado (Ferreira & dos Anjos, 2001). Além disso, o consumo de carne de animais criados próximos aos vazadouros está relacionado à transmissão de doenças aos seres humanos (Machado & Prata Filho, 1999).

Entre as diversas alternativas de destinação dos resíduos sólidos, no Brasil, as três formas mais utilizadas são: vazadouros a céu aberto também conhecidos como "lixões", aterros controlados e aterros sanitários (IBGE, 2000). Nos vazadouros a céu aberto, a disposição final do lixo ocorre através do seu lançamento, em bruto, sobre o terreno sem qualquer cuidado ou técnica especial. Os aterros controlados são locais utilizados para o despejo do lixo coletado, em bruto, onde uma camada de terra é depositada sobre o lixo para minimizar os impactos ambientais. Por outro lado, o aterro sanitário é uma técnica de disposição do lixo, fundamentado em critérios de engenharia e normas operacionais específicas. Este método permite a confinamento segura dos resíduos sólidos em termos de controle da poluição ambiental e proteção à saúde pública (IBGE, 2000). Na Tabela 1, pode-se observar a distribuição dos resíduos sólidos entre os diferentes destinos finais no Brasil em três décadas.

**Tabela 1.** Destino final dos resíduos sólidos no Brasil - 1989/2008.

Ano	Destino final dos resíduos sólidos, por unidades de destino dos resíduos (%)		
	Vazadouro a céu aberto	Aterro controlado	Aterro sanitário
1989	88,2	9,6	1,1
2000	72,3	22,3	17,3
2008	50,8	22,5	27,7

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2008.

Analisando a Tabela 1, pode-se concluir que os vazadouros a céu aberto ainda constituem o destino final mais utilizado (por unidades de destino dos resíduos) nos municípios brasileiros, conforme revelou a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) 2008. Apesar disso, é importante observar que houve um crescimento na utilização de aterros sanitários como destino de resíduos nos últimos anos. Adicionalmente, a PNSB demonstrou que o destino inadequado dos resíduos sólidos encontra-se principalmente nas regiões norte e nordeste do país (IBGE, 2008).

## 1.2. Aterros Sanitários

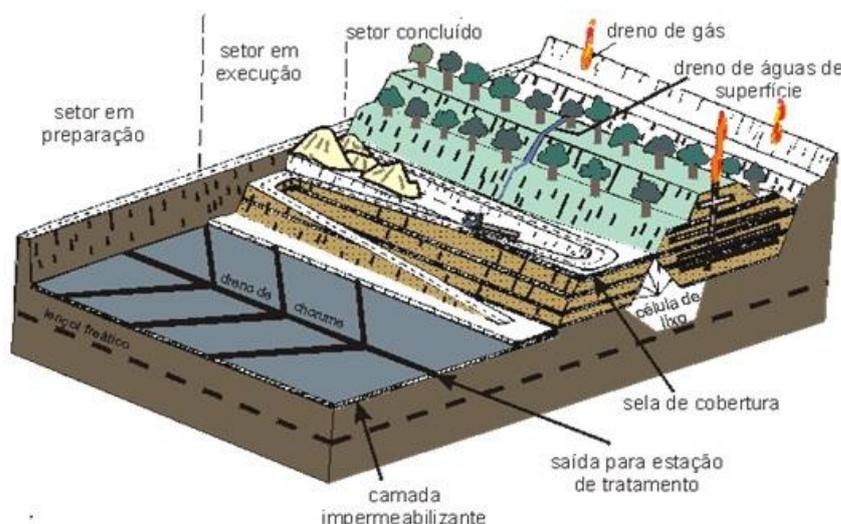
A utilização de aterros sanitários como forma de disposição final continua sendo amplamente aceita e cada vez mais utilizada. A disposição dos resíduos em aterros sanitários é um método de baixo custo relativo e que satisfaz as condições de preservação do meio ambiente (Meira, 2003). Dessa forma, os aterros sanitários tornam-se uma potencial escolha para a destinação de resíduos (Li et al, 2006a).

No Brasil, cerca de 30% dos resíduos coletados são destinados a aterros sanitários, correspondendo, assim como nos países da União Européia

e nos Estados Unidos, a uma das técnicas mais utilizada nas últimas décadas (Ding et al., 2001).

Segundo a norma ABNT NBR 8419/1984, aterro sanitário é “uma técnica de disposição de resíduos urbanos no solo sem causar danos à saúde pública e à sua segurança, minimizando os impactos ambientais, método este que utiliza princípios de engenharia para confinar os resíduos sólidos à menor área possível e reduzi-los ao menor volume permissível, cobrindo-os com uma camada de terra na conclusão de cada jornada de trabalho, ou a intervalos menores, se for necessário”.

Os aterros sanitários necessitam de dispositivos que são indispensáveis para sua execução e operação. Entre eles encontram-se dispositivos de revestimento de fundo para prevenir contaminação do subsolo e das águas subterrâneas, sistemas de coleta de líquidos percolados e gases gerados, sistemas de cobertura final que minimizem as infiltrações e os problemas de erosão, dispositivos de drenagem superficial que reduzem o afluxo de água para o interior da massa de resíduos (Calijuri et al, 2002). A Figura 1 representa de forma esquemática um aterro sanitário e seus principais dispositivos.



**Figura 1.** Representação esquemática de um aterro sanitário com os principais dispositivos (PROIN/CAPES, 1999).

A impermeabilização correta do solo é de fundamental importância para que ocorra uma adequada captação dos líquidos (drenos horizontais) percolados para o tratamento, além de um eficiente sistema de captação (drenos verticais) para queima ou tratamento dos gases liberados durante a decomposição (El Fadel & Khoury, 2000).

O confinamento dos resíduos em celas do aterro sanitário propicia as condições necessárias para que ocorra a decomposição físico-química e biológica dos mesmos, produzindo o chorume (Christensen et al., 2001)

### **1.3. Chorume**

O chorume é um líquido escuro de odor desagradável proveniente da decomposição de resíduos que contêm uma grande concentração de compostos orgânicos e inorgânicos (Christensen et al., 2001).

Segundo D`Almeida & Vilhena (2000), a formação e a composição do chorume são processos complexos e variáveis, influenciados por uma série de fatores. Entre eles, podemos ressaltar três principais: fatores climatológicos (regime de chuvas, escoamento superficial, infiltrações), fatores relativos ao resíduo sólido (composição, densidade e teor de umidade) e fatores relativos ao tipo de disposição (permeabilidade, idade e profundidade do aterro). Além disso, a composição do chorume pode variar conforme a dinâmica dos processos de decomposição que ocorrem dentro das células do aterro.

Os processos de decomposição responsáveis pela formação do chorume também variam com a idade do aterro e podem ser classificados em quatro fases: aeróbia, anaeróbia, metanogênica inicial e de estabilização (Kjeldsen et al., 2002). A decomposição de diferentes resíduos aterrados pode produzir um chorume com elevados teores de metais tóxicos, xenobióticos (substâncias estranhas aos organismos vivos) e microrganismos perigosos para a saúde. Segundo Christensen e colaboradores (2001), as substâncias presentes no chorume podem ser classificadas em quatro grandes grupos:

1. Matéria Orgânica Dissolvida, expressa como Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Carbono Orgânico Total (COT), incluindo

CH<sub>4</sub>, ácidos graxos voláteis e muitos compostos recalcitrantes, como exemplo, compostos húmicos e fúlvicos. As substâncias húmicas são os principais componentes da matéria orgânica do solo (85 a 90%), compostas de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina e originam-se a partir de transformações bioquímicas de compostos como lignina, celulose, hemicelulose, açúcares, aminoácidos (Silva & Mendonça, 2007).

2. Macrocomponentes Inorgânicos: sais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), magnésio (Mg<sup>2+</sup>), sódio (Na<sup>2+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>), amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), ferro (Fe<sup>2+</sup>), manganês (Mn<sup>2+</sup>), cloretos (Cl<sup>-</sup>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), sulfeto (S<sub>2</sub><sup>-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Além de metais potencialmente tóxicos, como cádmio (Cd<sup>2+</sup>), cromo (Cr<sup>3+</sup>), cobre (Cu<sup>2+</sup>), chumbo (Pb<sup>2+</sup>), níquel (Ni<sup>2+</sup>) e zinco (Zn<sup>2+</sup>).
3. Compostos Orgânicos Xenobióticos, que incluem uma variedade de hidrocarbonetos halogenados, compostos fenólicos, alcoóis, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, além de outras substâncias com características tóxicas.
4. Compostos em menor concentração, como boro (B), arsênico (As), selênio (Se), bário (Ba), lítio (Li), mercúrio (Hg) e cobalto (Co), os quais são potencialmente tóxicos

A partir da complexidade dos componentes encontrados no chorume é importante ressaltar que sua toxicidade não pode ser atribuída a uma substância isoladamente nem à soma de todos os seus componentes, mas sim ao efeito sinérgico que ocorre entre as substâncias presentes na sua composição (Silva et al., 2004).

#### 1.4. Tratamento do Chorume

A implantação de sistemas adequados de coleta e tratamento do chorume é essencial devido ao impacto causado ao meio ambiente, principalmente em relação à poluição das águas. A percolação do líquido pode provocar a poluição das águas subterrâneas e superficiais, tanto pela redução do teor de oxigênio dissolvido, como pela eutrofização dos cursos, devido às altas demandas de oxigênio e às elevadas concentrações de nitrogênio no chorume, podendo alterar significativamente a fauna e a flora aquática (Li et al., 2006b). Além disso, já está bem descrito que uma pequena quantidade de chorume pode causar a poluição de um extenso volume de água subterrânea, inutilizando-a para o uso doméstico e outros fins (Bakare et al., 2005; Li et al., 2010).

Ainda não existe uma metodologia padrão aplicável a todos os casos para o efetivo tratamento do chorume de aterro sanitário com viabilidade técnica e econômica que cumpra, efetivamente, os padrões de emissão. As opções disponíveis incluem processos de natureza física, química e biológica. Entre eles, os processos biológicos ainda são os processos mais aplicados, principalmente, devido ao baixo custo (Kjeldsen et al., 2002). Os processos biológicos, na forma de rotinas aeróbias, anaeróbias e facultativas, apresentaram resultados satisfatórios no tratamento de chorume de aterros jovens, os quais são facilmente biodegradáveis. No entanto, à medida que a idade do chorume aumenta, sua composição passa a ser menos biodegradável, contendo na maior parte substâncias de elevada massa molar e estruturas muito complexas, como as substâncias húmicas (Kjeldsen et al., 2002).

Como mencionado, existem diversos problemas na utilização de sistemas biológicos para o tratamento do chorume de diferentes idades. Dessa forma, torna-se relevante a busca por procedimentos que apresentem uma

maior eficiência ou que possam ser integrados aos processos convencionais, de maneira a reduzir suas desvantagens e incrementar sua eficiência.

Dentro deste contexto, os Processos Oxidativos Avançados (POAs) têm sido considerados como uma excelente alternativa para o tratamento do chorume com composição variada, principalmente devido a sua elevada capacidade e velocidade de degradação. Os POAs são definidos como processos que envolvem a geração de espécies transitórias de alto poder oxidante, dentre as quais se destaca o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). Este radical apresenta alto poder oxidante e baixa seletividade, possibilitando a transformação de um grande número de contaminantes tóxicos em tempos relativamente curtos (Domenéch et al., 2001). No entanto, os radicais livres formados durante o processo fotoeletrooxidativo possuem uma meia vida de curta duração. Vários processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, geralmente utilizando ozônio, peróxido de hidrogênio, reagente Fenton, fotocatalise e eletrólise, ou a combinação destes métodos. Entre os POAs destaca-se a utilização do tratamento fotoeletrooxidativo baseado na combinação dos métodos citados acima.

#### **1.4.1. Tratamento Fotoeletrooxidativo**

Existem na literatura, diversas pesquisas sobre a remoção e a degradação de matéria orgânica utilizando diferentes técnicas, tais como a fotoeletroquímica (Pinhedo et al., 2005), fotooxidação-ultravioleta (UV) (Golimowska & Golimowski., 1996), UV (Kang et al., 2004) e ozônio (Rao et al., 2002) . Entre as diferentes técnicas, a fotoeletrooxidação tem sido amplamente estudada no manejo de efluentes complexos. O tratamento fotoeletrooxidativo (ou fotoeletroquímico) é realizado através da combinação do processo eletroquímico com a fotocatalise heterogênea, e consiste na percolação da solução a ser tratada através de um reator eletrolítico onde o ânodo, revestido com óxidos metálicos, permanece sob a incidência da radiação ultravioleta.

Cabe ressaltar que esta combinação resulta em um efeito sinérgico o qual aumenta a eficiência e a velocidade de degradação (Bertazzoli & Pelegrini, 2002), tornando-se uma potencial ferramenta para o tratamento de efluentes tóxicos. Bertazzoli e Pelegrini (2002) demonstraram que o tratamento fotoeletroquímico aplicado em chorume de aterros sanitários municipais apresentou uma redução de 75% da coloração do chorume, além da redução da carga orgânica em 20%.

### **1.5. Estudos Ecotoxicológicos**

A elucidação de processos fisiológicos e patofisiológicos ocasionados por materiais produzidos pela ação antrópica e liberados no ambiente torna-se iminente pelo progressivo aumento na geração de resíduos. Dentre os diferentes impactos, a poluição das águas é considerada um sério problema de saúde pública, além de alterar o ecossistema aquático (Houk, 1992; White et al., 1996). É bem estabelecido que a poluição afeta, de forma direta ou indireta a saúde, diminui a qualidade de vida e ameaça a sobrevivência das espécies (Grover & Kaur, 1999). Segundo Ohe e colaboradores (2004), dependendo da concentração, as toxinas lançadas no ambiente podem causar efeitos diversos, frequentemente interligados, tais como distúrbios fisiológicos em diferentes tecidos e órgãos, redução da longevidade e da fertilidade, e alterações genéticas. Durante os últimos anos, surgiu um grande interesse em desenvolver testes rápidos e simples para identificar substâncias com atividade genotóxica (Ohe et al., 2004).

Nos ambientes aquáticos, os testes de micronúcleos e do cometa são utilizados em diferentes espécies de peixes e vegetais como bioindicadores dos efeitos da exposição a águas contaminadas (Al-Sabati, 1986; Bombail et al., 2001, Grant, 1999, Sánchez-Galán et al., 1998). Estes estudos são adequados para a determinação de letalidade, contudo carecem de avaliação

de outros aspectos, sinais e sintomas, que podem ser encontrados em seres vivos de maior complexidade.

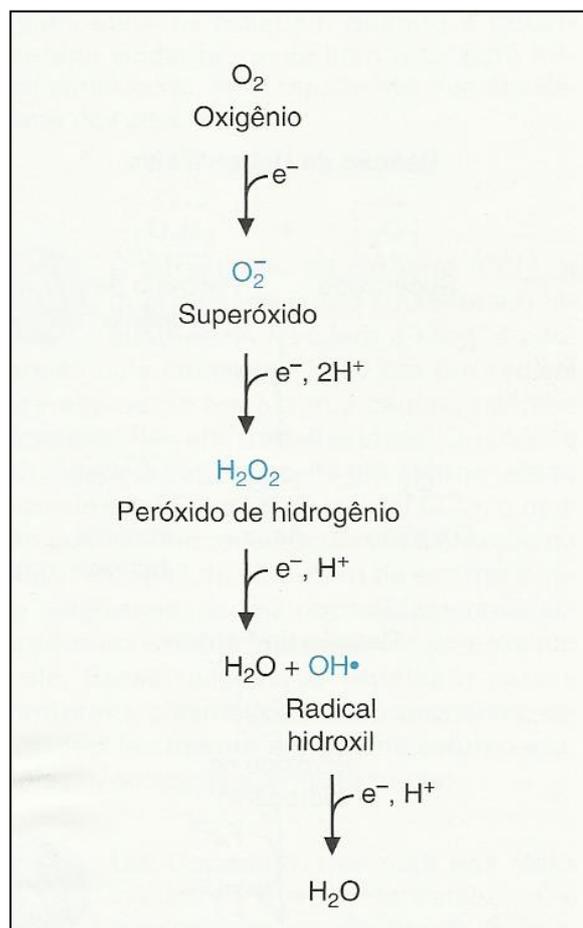
Estudos ecotoxicológicos utilizando mamíferos como animais de experimentação são poucos, portanto os dados de ecotoxicidade nesta classe são escassos. É essencial ponderar que estes estudos podem ter aplicação tanto em seres humanos quanto em outras espécies da classe *Mammalia* que utilizam corpos d'água com despejo de xenobióticos como fonte de água de consumo. 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. Além disso, os efeitos tóxicos nos organismos mais complexos não se limitam à genotoxicidade e letalidade, outros impactos podem ser observados, como hepatotoxicidade e neurotoxicidade.

Alguns estudos realizados em mamíferos demonstraram que a exposição *in vivo* ao choro de aterro causou danos oxidativos e alterações nas defesas antioxidantes em diferentes órgãos como rins, baço, coração, fígado e cérebro de camundongos (Li et al., 2006a;b). Além disso, Li e colaboradores (2010) observaram danos ao DNA e oxidação de proteínas em diferentes órgãos de camundongos induzidos pela exposição ao choro *in vivo*.

## 1.6. Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radicaes livres são átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell & Gutteridge, 1990). Os radicaes livres podem iniciar reações em cadeia através da extração de elétrons de uma molécula das proximidades para completar seus próprios orbitais (Smith et al., 2005). As espécies reativas do oxigênio (EROs) são radicaes livres altamente reativos, contendo oxigênio, ou

compostos que se convertem prontamente nesses radicais livres de oxigênio na célula. Os principais produtos do oxigênio produzidos pela sua redução são: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, como ilustrado na Figura 2 (Smith et al., 2005).

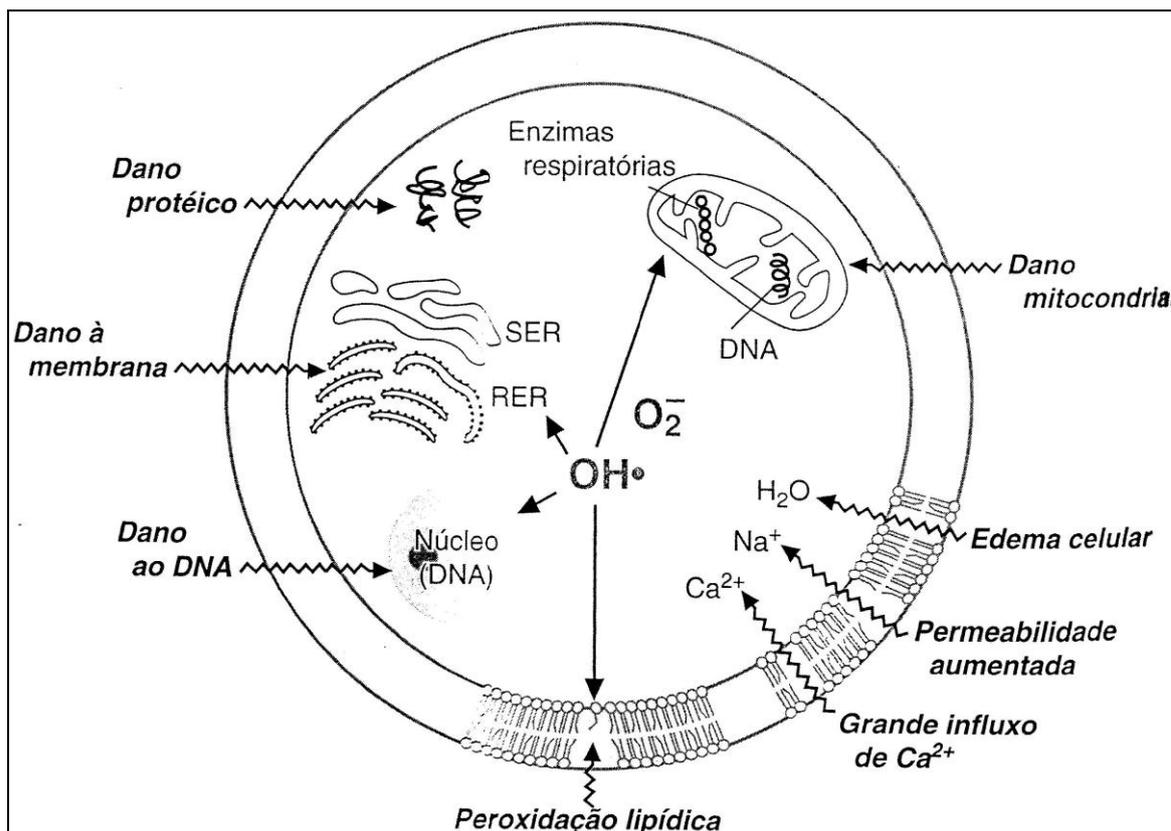


**Figura 2.** Redução do oxigênio, as quatro etapas de redução de um elétron para o oxigênio geram, progressivamente, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila mais água (Smith et al., 2005).

A formação de espécies reativas do oxigênio pode ocorrer através de vários processos, como a respiração aeróbica e a exposição a agentes exógenos, os xenobióticos. As EROs são constantemente formadas na célula sendo que, 3 a 5% do oxigênio consumido são convertidos em radicais livres (Smith et al., 2005).

O cérebro é particularmente suscetível ao dano oxidativo, pois gera continuamente uma grande quantidade de radicais livres através da sua atividade oxidativa mitocondrial e do metabolismo de catecolaminas (Perez-Campo et al., 1993). As células do cérebro humano utilizam 20% do oxigênio consumido pelo corpo o qual constitui somente 2% do peso corporal, indicando grande potencial para a geração de EROs (Clarke & Sokoloff, 1999). Além disso, o cérebro possui uma atividade moderada das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) quando comparado a outros órgãos como fígado e rins (Cooper, 1997; Ho et al., 1997). Em certas regiões do cérebro e do fígado, encontram-se altas quantidades de ferro, o qual está diretamente envolvido com a formação de radicais livres altamente reativos, como o radical hidroxila. Adicionalmente, altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados estão presentes no cérebro, os quais são os alvos favoritos ao dano causado por radicais livres nas células. (Meng & Zhang, 2003).

Embora todos os componentes celulares sejam suscetíveis à ação das EROs, a membrana plasmática é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada por três etapas principais: iniciação, propagação e terminação. Esse processo é responsável por diversos danos à função celular incluindo alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, na liberação e recaptção de neurotransmissores, na atividade dos canais-iônicos, nas proteínas de membrana e na função mitocondrial, as quais podem levar a morte celular (Ferreira & Maturaba, 1997; Mattson, 1998). A Figura 3 representa uma injúria celular (membranas celulares) provocada por radicais livres.



**Figura 3.** Peroxidação lipídica das membranas celulares pela ação de radicais livres (Smith et al., 2005).

A lipoperoxidação mediada por radicais livres está diretamente relacionada à fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas, onde os seus marcadores podem ser encontrados em níveis elevados tanto em estruturas cerebrais como em tecidos periféricos. Portanto, o papel da peroxidação lipídica tem sido amplamente investigado no desenvolvimento de doenças como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doença de Huntington (Butterfield et al., 2010; Lee et al., 2011, Ruiperez et al., 2010).

A fim de evitar os danos causados pelas EROs, como a peroxidação lipídica e a modificação de proteínas, existem mecanismos que removem ou tentam impedir a formação excessiva de radicais livres (Dringen, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1999). O mecanismo utilizado consiste em um sistema de defesa antioxidante composto por antioxidantes não enzimáticos como, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), glutathiona (GSH); e enzimáticos como a GPx, CAT e SOD, que interagem e se regeneram em um complexo sistema

de ciclos (Haramaki et al., 1998; Ferreira & Matsubara, 1997). As enzimas de defesa antioxidantes reagem com as EROs e com os produtos celulares das reações em cadeia de radicais livres para convertê-los em produtos não-tóxicos.

O desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua remoção e sequestro pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos resulta em estresse oxidativo (Halliwell and Gutteridge, 1999). Diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo pode estar relacionado à neurotoxicidade de vários xenobióticos (El-Demerdash, 2011; Ross & Moldeus, 1991; Santos, 2007).

Entre as enzimas antioxidantes relacionadas com a detoxificação de xenobióticos destaca-se a família das glutathionas S-transferases (GSTs). A atividade clássica destas enzimas é catalisar a conjugação de uma variedade de compostos xenobióticos, os quais possuem grupos funcionais eletrofilicos, ao grupo tiol (SH) da GSH produzindo formas menos tóxicas e facilitando sua excreção pelo organismo (Habig et al., 1974; Pickett & Lu, 1989). A GSH é um dos antioxidantes celulares mais abundantes podendo prevenir a oxidação do grupo tiol das proteínas tanto diretamente pela reação com espécies reativas quanto indiretamente através das glutathionas S-transferases (Deneke & Fanburg, 1989; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

As GSTs abrangem três grandes famílias de proteínas: citosólicas, mitocondriais e microsossomais, das quais as citosólicas constituem a maior delas (Hayes et al., 2005). Além das três famílias, sete classes de GSTs citosólicas foram identificadas as quais foram designadas pelos nomes de letras gregas alfa, mu, pi, sigma, theta, omega e zeta (Mannervik et al., 2005).

As isoenzimas da GST são expressas de maneira tecido-específica sendo que sua composição em diferentes tecidos varia de forma considerável (Dhanani & Awasthi, 2006). Os níveis de expressão de GST são considerados um fator importante para proteger os órgãos contra os efeitos deletérios de substâncias tóxicas (Yang et al., 2002).

Como as GSTs são enzimas detoxificadoras, alguns estudos têm demonstrado que a redução da atividade da enzima GST está relacionada ao

aumento da toxicidade de algumas substâncias. No entanto, a inibição da GST também pode ser utilizada como uma estratégia para aumentar a eficiência de, por exemplo, substâncias como os pesticidas (El-Demerdash, 2011).

Além da sua principal função de detoxificação, as GSTs também desempenham outras funções fisiológicas como o sequestro e transporte de compostos endógenos hidrofóbicos que incluem hormônios esteróides, heme, bilirrubina, ácido biliar e seus metabólitos (Salinas & Wong, 1999).

Nossa hipótese de trabalho é a de que a exposição ao chorume de aterro sanitário é capaz de aumentar alguns parâmetros de estresse oxidativo e que o tratamento fotoeletrooxidativo seja capaz de reverter este aumento em estruturas cerebrais e fígado de ratos e camundongos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a neurotoxicidade e hepatotoxicidade induzidas pela exposição ao chorume de aterro sanitário submetido ou não ao tratamento fotoeletrooxidativo em diferentes espécies de roedores.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito *in vitro* do chorume sobre o estado oxidativo em hipocampo, estriado, cerebelo e no fígado de ratos e de camundongos.
- Avaliar o efeito *in vitro* do chorume sobre a atividade da enzima glutationa S-transferase em hipocampo, estriado, cerebelo e no fígado de ratos e camundongos.

- Estudar o impacto do tratamento fotoeletrooxidativo no chorume de aterro sanitário sobre os parâmetros de estado oxidativo celular em estruturas cerebrais e fígado de ratos e camundongos.

### **3. Materiais e Métodos**

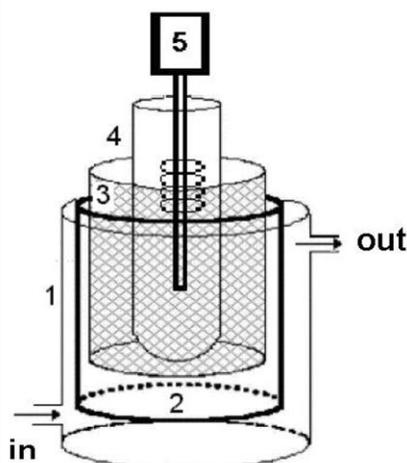
#### **3.1. Chorume**

O chorume bruto e o chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo foram fornecidos pelo Prof. Marco Antonio Siqueira Rodrigues do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário FEEVALE. As amostras do chorume foram coletadas no aterro sanitário industrial de Novo Hamburgo, RS por um pesquisador capacitado utilizando equipamentos de proteção individual no momento da coleta. O material foi transportado da FEEVALE até a UFRGS em carro particular, acondicionado em recipientes adequados e todas as medidas de segurança para o transporte foram tomadas. O chorume foi armazenado em frascos (-2 a -8°C) até o término dos experimentos.

#### **3.1.2. Tratamento Fotoeletrooxidativo**

O tratamento do chorume foi realizado pelo Prof. Marco Antonio Siqueira Rodrigues no Centro Universitário FEEVALE. Os experimentos de fotoeletrooxidação foram realizados em um reator fotoeletroquímico em escala de bancada como mostrado na Figura 4. O reator consiste de um cilindro de vidro com volume de 1,2 litros com dois orifícios aos quais as mangueiras são conectadas, um par de eletrodos, uma lâmpada de vapor de mercúrio sem bulbo - para a emissão da radiação ultravioleta, um tubo de quartzo e uma fonte de corrente. O reator utilizado foi um Avant® 250W e uma lâmpada de

vapor de mercúrio foi usada como fonte ultravioleta. A lâmpada foi imersa na solução, para isso, foi necessário colocá-la dentro de um bulbo de proteção. Como o vidro resiste à passagem da radiação UV, um tubo de quartzo foi utilizado, já que ele permite a passagem de radiação e impede a solução de entrar em contato direto com o interior da lâmpada. Para aperfeiçoar o uso da radiação emitida, os eletrodos foram dispostos concentricamente dentro do reator. Um par de eletrodos comerciais fabricados pela De Nora do Brasil ® foi utilizado, o ânodo e o cátodo possuindo a mesma área de superfície de 475,2 centímetros<sup>2</sup>. Os eletrodos foram revestidos com uma mistura de óxidos de titânio e rutênio, na proporção de 70TiO<sub>2</sub>/30RuO<sub>2</sub>. Durante o experimento, o chorume foi circulado através do reator. Foram tratados 5 litros de chorume, fluindo a uma taxa de 4L/min, com a densidade de corrente fixada em 30 mA/cm<sup>2</sup> sendo que, todo processo de tratamento foi realizado em 3 horas. Resultados anteriores demonstraram que a fotoeletrooxidação proporcionou importantes modificações na matriz do chorume, melhorando sua biodegradabilidade para o tratamento posterior.



**Figura 4** - Representação esquemática do reator: (1) Reservatório de vidro; (2 e 3) Eletrodos de óxido de titânio TiO/RuO<sub>2</sub>; (4) Tubo de quartzo; (5) Lâmpada de vapor de mercúrio.

### 3.1.3. Parâmetros Químicos do Chorume

As análises químicas foram realizadas no Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas (Centro Universitário FEEVALE) com o objetivo de determinar os rendimentos de oxidação e a qualidade da água obtida. Os seguintes parâmetros foram determinados: cloreto, magnésio, condutividade, demanda química de oxigênio, fósforo total, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, pH, sólidos totais, sulfatos, cálcio e cromo. As amostras foram coletadas antes e após o tratamento fotoeletrooxidativo. A metodologia utilizada foi baseada em American Public Health Association (APHA) (Clesceri et al., 1989).

### 3.2. Animais

Para a realização dos experimentos *in vitro*, a fim de comparar e elucidar as diferenças entre ambas as espécies foram utilizados camundongos e ratos. Os camundongos CF1 adultos machos (3-5 meses) pesando, aproximadamente, 30g foram adquiridos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). No trajeto da FEPPS até o Departamento de Farmacologia (UFRGS), os camundongos foram transportados de modo adequado. No biotério da UFRGS os camundongos foram mantidos em caixas (20x30cm), no máximo 6 camundongos por caixa. Os ratos adultos machos Wistar (3-5 meses) com aproximadamente 350g, foram adquiridos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS). Os ratos foram acondicionados, no máximo, 5 por caixa. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério com água e comida *ad libitum*, com temperatura controlada  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e ciclo de 12h claro/escuro. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS, sob o número 20878. Os experimentos bioquímicos envolvendo os animais foram realizados sob condições ambientais e de infraestrutura padrão no laboratório de Neuropsicofarmacologia, no Departamento de Farmacologia, ICBS/UFRGS. O tamanho da amostra para a realização dos estudos *in vitro* foi estimado em 12 camundongos e 12 ratos, considerando a diferença mínima entre as médias, o desvio padrão, o nível de significância – erro tipo I ou  $\alpha$  - de 5% e o poder de confiança de 90%. Para o cálculo amostral foi utilizado o programa estatístico

INSTAT.

### **3.3. Estudo Bioquímico *in vitro***

#### **3.3.1. Preparação das amostras**

Os animais foram decapitados sem anestesia prévia, pois esta poderia interferir nos parâmetros bioquímicos analisados, porém todos os cuidados para minimizar o sofrimento dos animais foram tomados. As estruturas encefálicas (hipocampo, estriado e cerebelo) e o fígado dos animais foram dissecados. As estruturas foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios bioquímicos. Após, as estruturas cerebrais e o fígado foram homogeneizados em uma proporção 1g de tecido para 10mL de tampão (1:10), em fosfato de sódio pH 7,4 (20 mM), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1mM). O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . As estruturas cerebrais e o fígado utilizados para a determinação da atividade da enzima glutathione S-transferase foram homogeneizadas em uma proporção 1g de tecido para 10mL de tampão (1:10), em Tris-HCl pH 7,5 (50mM) (Prigol, 2008). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após, o sobrenadante foi utilizado para a incubação com diferentes concentrações do chorume bruto e do chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo.

#### **3.3.2. Incubação com o Chorume**

O sobrenadante resultante da homogeneização foi incubado com diferentes concentrações de chorume bruto e tratado. O chorume (100%) foi diluído em água destilada para ser utilizado nas concentrações finais de 3, 10 e 30%. O sobrenadante foi incubado com as diferentes concentrações em uma proporção de 50/50  $\mu\text{L}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Após o período de incubação, o sobrenadante foi utilizado para a determinação da lipoperoxidação, através do

método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de radicais livres utilizando diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). O sobrenadante utilizado para avaliar a atividade da enzima glutathione S-transferase foi incubado com o chorume bruto e tratado nas seguintes concentrações, 10, 30 e 50%, também diluído em água destilada na proporção 50/50 µL a 37°C durante 30 minutos.

### **3.3.3 Níveis de Radicais Livres**

Para avaliar os níveis de radicais livres, utilizou-se 2'-7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) com um "probe" (Lebel et al., 1990). Uma alíquota da mistura do sobrenadante do tecido e do chorume foi incubada com DCFH-DA (100 mM) a 37°C durante 30 minutos. A formação de derivados oxidados fluorescentes (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação (488nm) e emissão (525nm). Brancos contendo DCFH-DA (sem a mistura de sobrenadante e chorume) foram processados para a medição da fluorescência. Todos os procedimentos foram realizados protegidos da luz (Driver et al., 2000; Sriram et al., 1997).

### **3.3.4. Lipoperoxidação**

A peroxidação lipídica foi avaliada segundo Bromont e colegas (1989), pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uma alíquota da mistura do sobrenadante do tecido e do chorume foi incubada com 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi fervida durante 30 minutos em um banho de água fervente. Após, n-butano foi adicionado e a mistura foi centrifugada durante 10 minutos. A fase orgânica foi coletada para medir a fluorescência em comprimentos de onda de excitação e emissão de 515 e 553nm, respectivamente. A conversão de 1,1,3,3-Tetrametóxiopropano em malondialdeído (MDA), foi utilizada como padrão (Buege & Aust, 1978; Yagi, 1998).

### **3.3.5. Atividade da enzima Glutathione S Transferase (GST)**

Após a incubação, a mistura contendo sobrenadante dos tecidos e chorume foi usada para a avaliação da atividade da GST. A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foi avaliada segundo Habig e colaboradores (1974), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 1mM de CDNB e 1 mM de glutathione (GSH) à mistura. A conjugação do grupo tiol da glutathione (GSH) com o substrato (CDNB) foi mensurada através de uma leitura cinética durante 5 minutos em um comprimento de 340nm.

### **3.3.6. Dosagem de Proteínas**

A concentração de proteínas totais dos tecidos cerebrais e fígado homogeneizados foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão. A leitura das proteínas foi realizada no comprimento de 595 nm.

## **3.4. Análise Estatística**

Os dados foram coletados e armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel®). Após, foram analisados usando o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn. Os resultados foram expressos como mediana (intervalos interquartis 25/75). A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0.05$ .

## **4. Resultados**

#### **4.1. Tratamento Fotoeletrooxidativo**

A Tabela 2 mostra as diferenças do chorume antes e depois do tratamento fotoeletrooxidativo. Por meio da tabela pode-se observar que houve uma redução na maioria dos parâmetros investigados no chorume submetido à fotoeletrooxidação quando comparado aquele não tratado. A concentração de substâncias como cloreto, fósforo total, nitrito, nitrogênio amoniacal, sólidos totais, sulfatos, cálcio e magnésio foram diminuídas após o tratamento fotoeletrooxidativo. Além disso, também houve uma diminuição no pH, na demanda química de oxigênio e na condutividade do chorume avaliado. Entre os parâmetros avaliados, o único aumento foi observado em relação ao nitrato. Adicionalmente, não foram encontradas concentrações de cromo nas amostras avaliadas.

**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas do chorume não tratado e do chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo.

<b>Parâmetro</b>	<b>Chorume não tratado</b>	<b>Chorume - Fotoeletrooxidação</b>
Cloreto (mg L <sup>-1</sup> )	475,5	102,9
Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )	3,9	2,3
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	490,3	57,0
Fósforo Total (mg L <sup>-1</sup> )	1,9	0,2
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	16,7	44,1
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	8,5	0,2
Nitrogênio Amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	111,3	14,1
pH	7,2	7,0
Sólidos Totais (mg L <sup>-1</sup> )	1800,5	1632,0
Sulfatos (mg L <sup>-1</sup> )	191,0	117,0
Cálcio (mg L <sup>-1</sup> )	114,1	3,2
Cromo (mg L <sup>-1</sup> )	n.d	n.d
Magnésio (mg L <sup>-1</sup> )	47,9	4,2

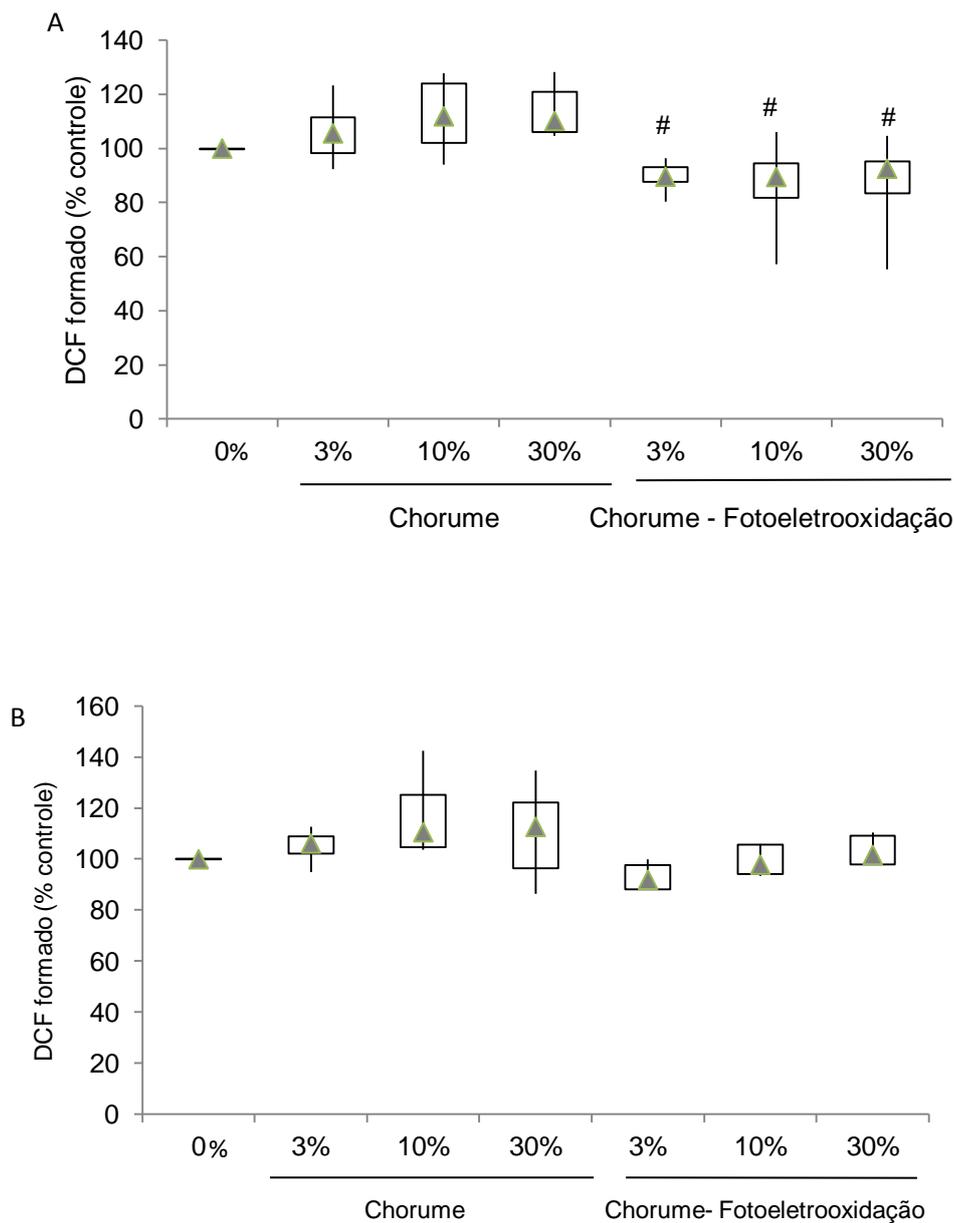
DQO= demanda química de oxigênio; n.d= nada encontrado

## **4.2. Neurotoxicidade**

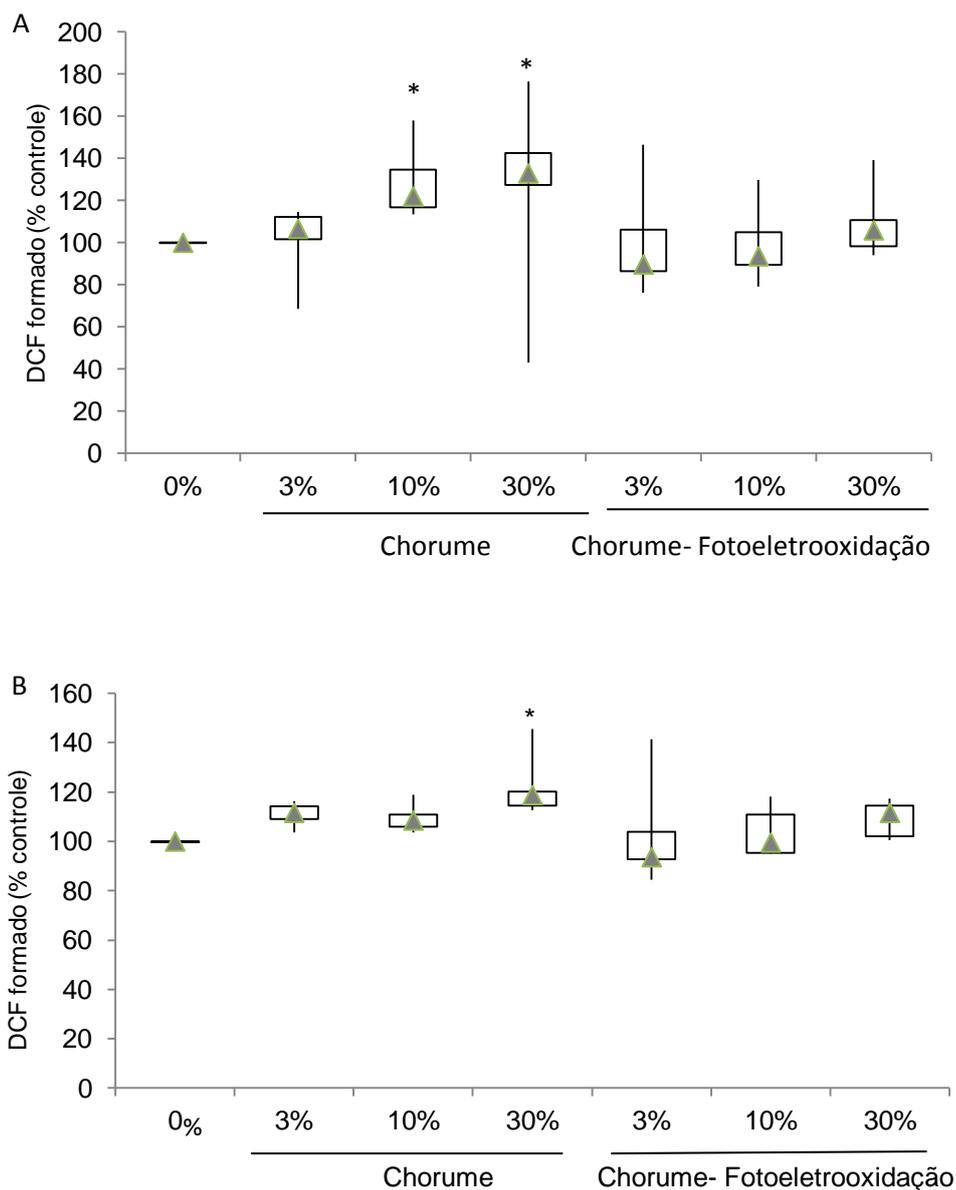
### **4.2.1. Níveis de Radicais Livres**

Os níveis de radicais livres foram quantificados nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e cerebelo de ratos e camundongos após incubação com diferentes concentrações do chorume não tratado e do chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo. No hipocampo de ratos, os níveis de radicais livres presentes no sobrenadante incubado com o chorume não tratado foram significativamente maiores comparados ao incubado com o chorume submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo, no entanto não foram diferentes do grupo controle (Fig. 5A). Já no hipocampo de camundongos, não houve diferença

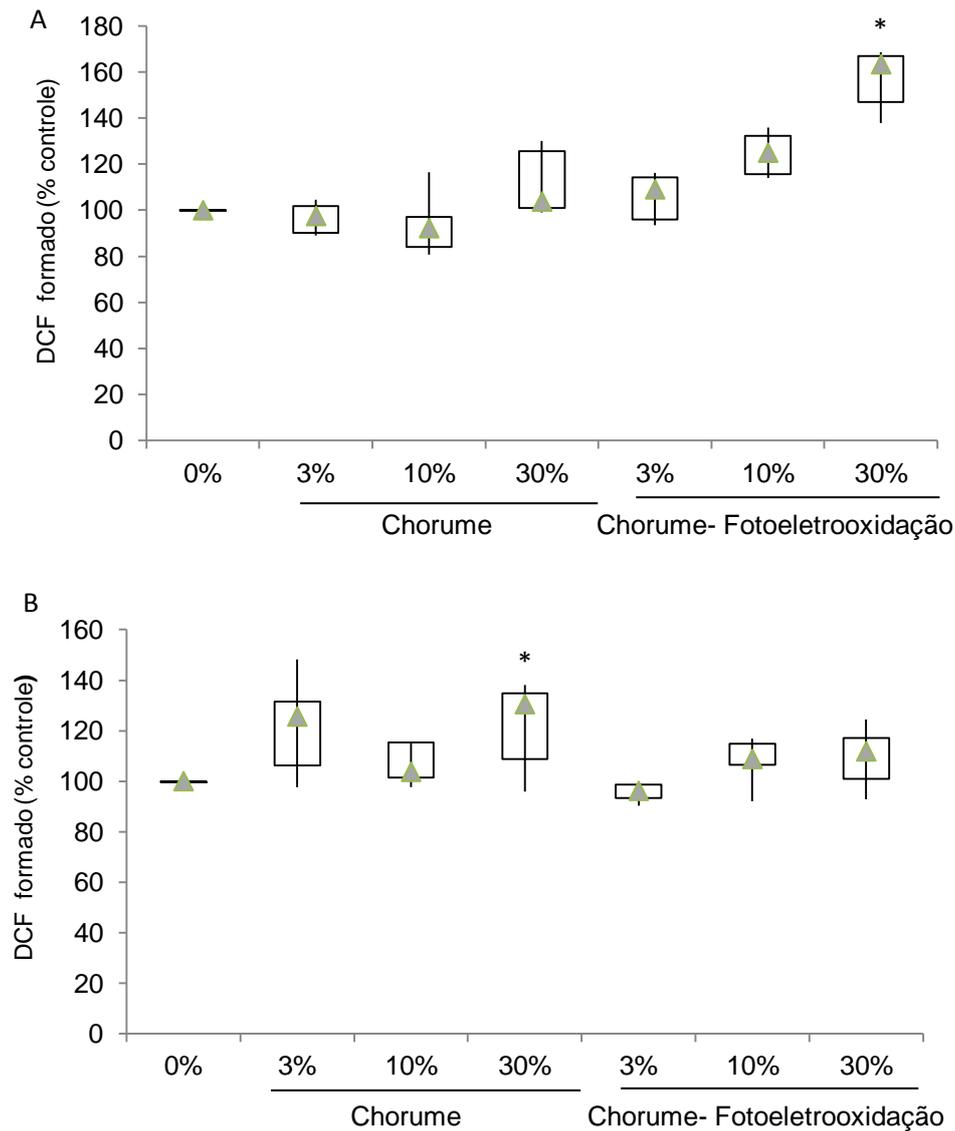
significativa nos níveis de radicais livres verificados em ambos os chorumes (Fig. 5B). O chorume sem tratamento aumentou os níveis de radicais livres no estriado de ratos nas concentrações de 10% e 30%, no entanto este aumento não foi observado na mesma estrutura incubada com o chorume tratado (Fig. 6A). No estriado de camundongos o chorume não tratado aumentou os níveis de radicais livres na maior concentração. Já na incubação com o chorume submetido à fotoeletrooxidação um perfil semelhante ao dos ratos foi encontrado, onde não houve alteração nos níveis de radicais livres (Fig. 6B). No cerebelo de ratos, não houve alterações nos níveis de radicais livres quando incubado com o chorume sem tratamento, no entanto a maior concentração do chorume submetido à fotoeletrooxidação aumentou esses níveis (Fig. 7A). Nos camundongos, um perfil diferente foi observado, houve um aumento nos níveis de radicais livres somente na maior concentração do chorume não tratado, enquanto que nos outros grupos os níveis permaneceram inalterados (Fig.7B).



**Figura 5.** Níveis de radicais livres em hipocampo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de DCF formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW= 52,33;  $p < 0,0001$ ;  $n=11$ ; **(B)** Camundongos:  $n=6$ . #= valores significativamente diferentes de todos os grupos de chorume sem tratamento fotoeletrooxidativo.



**Figura 6.** Níveis de radicais livres em estriado incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de DCF formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW=31,93;  $p < 0,0001$ ;  $n=10$ ; **(B)** Camundongos: KW= 25,99;  $p=0,0002$ ,  $n=7$ . \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.

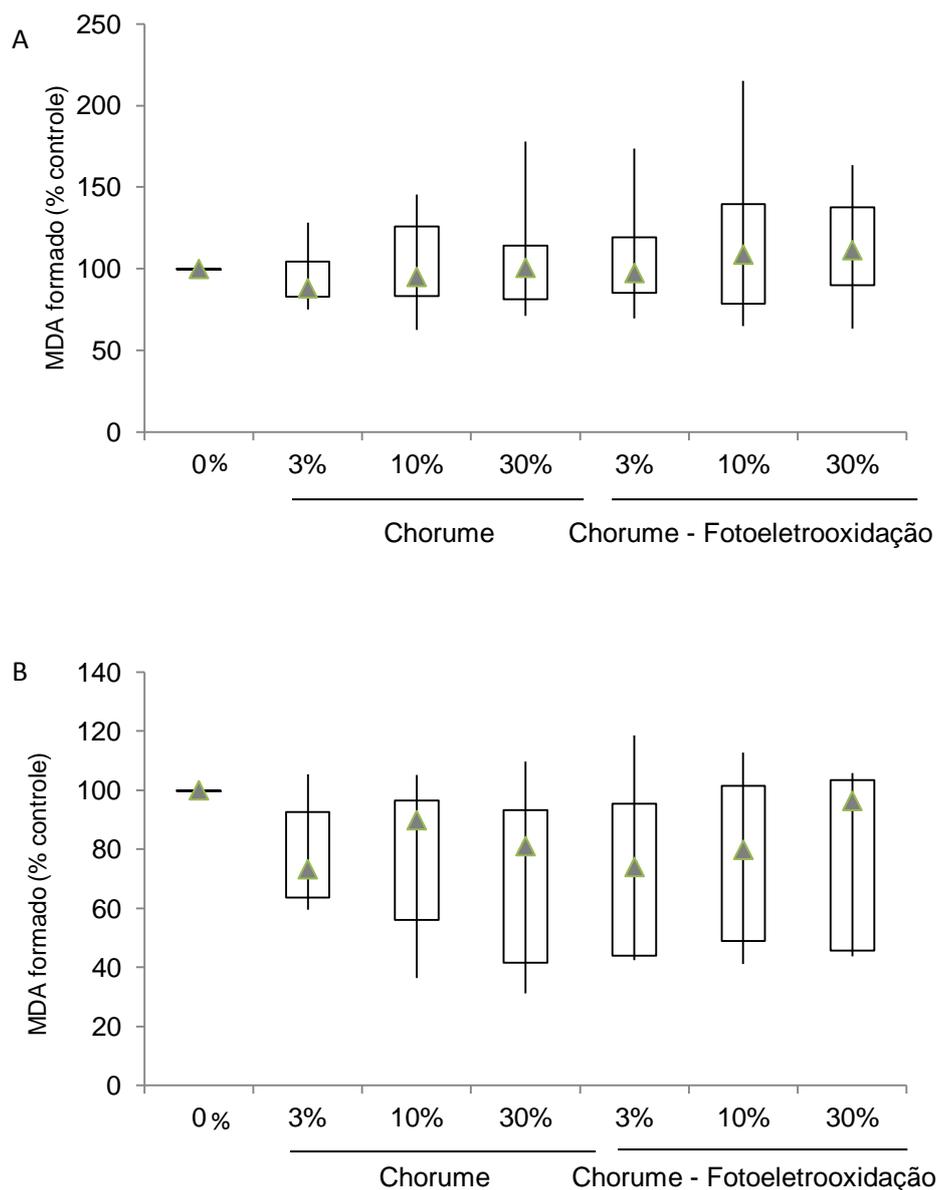


**Figura 7.** Níveis de radicais livres em cerebelo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de DCF formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW= 30,80;  $p < 0,0001$ ,  $n = 7$ ; **(B)** Camundongos: KW= 25,39;  $p = 0,0003$ ,  $n = 8$ . \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.

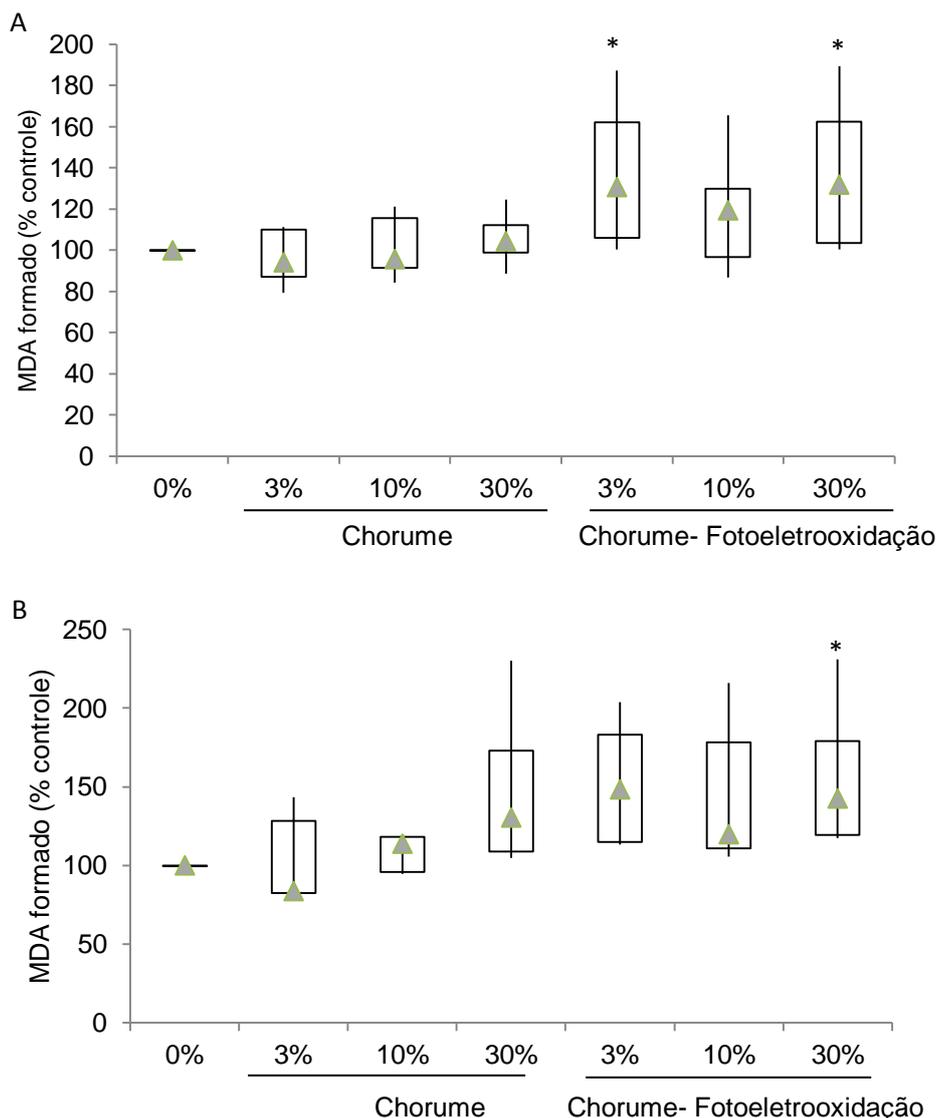
#### 4.2.2. Lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi avaliada nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e cerebelo de ratos e camundongos incubados com diferentes concentrações de chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação.

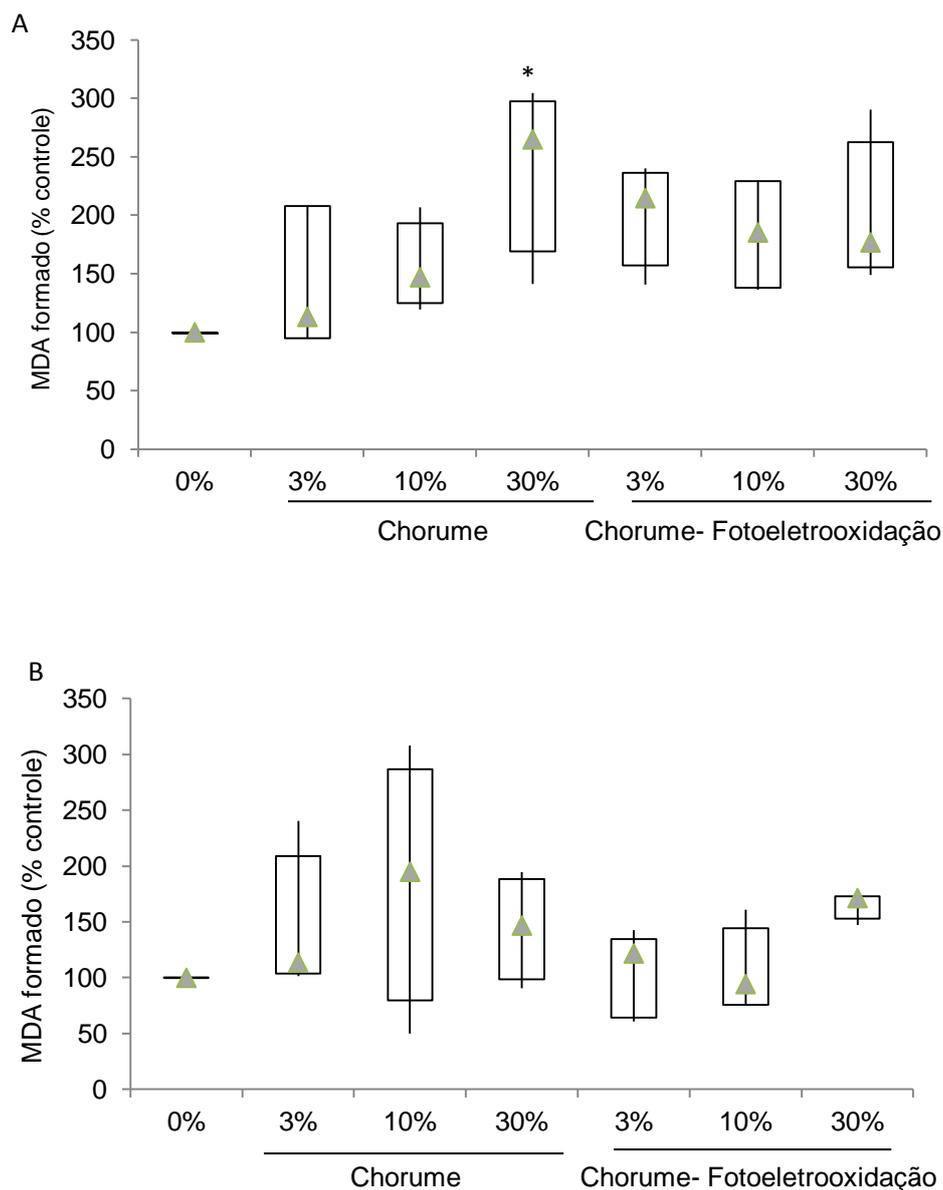
No hipocampo de ratos não houve alterações na lipoperoxidação quando incubado com ambos os chorumes (Fig. 8A). O mesmo perfil foi observado em hipocampo de camundongos (Fig. 8B). O chorume submetido à fotoeletrooxidação aumentou os índices de lipoperoxidação no estriado de ratos nas concentrações de 3% e 30%, perfil que não foi observado na incubação com o chorume não tratado (Fig. 9A). No estriado de camundongos, o aumento da lipoperoxidação foi observado quando incubado com o chorume submetido à fotoeletrooxidação na maior concentração; já a incubação com o chorume não tratado não mostrou alterações desse parâmetro (Fig. 9B). No cerebelo de ratos, houve um aumento da lipoperoxidação quando incubado com a concentração 30% do chorume não tratado, no entanto este aumento não foi observado na incubação com o chorume submetido à fotoeletrooxidação (Fig. 10A). Em camundongos, a incubação do cerebelo com ambos os chorumes não demonstrou alterações significativas neste parâmetro (Fig. 10B).



**Figura 8.** Avaliação do índice de lipoperoxidação em hipocampo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de MDA formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: n=11; **(B)** Camundongos: n=6.



**Figura 9.** Avaliação do índice de lipoperoxidação em estriado incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de MDA formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's: **(A)** Ratos: KW= 22,68; p= 0,0009, n=11; **(B)** Camundongos: KW=19,32; p= 0,0037, n=7. \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.

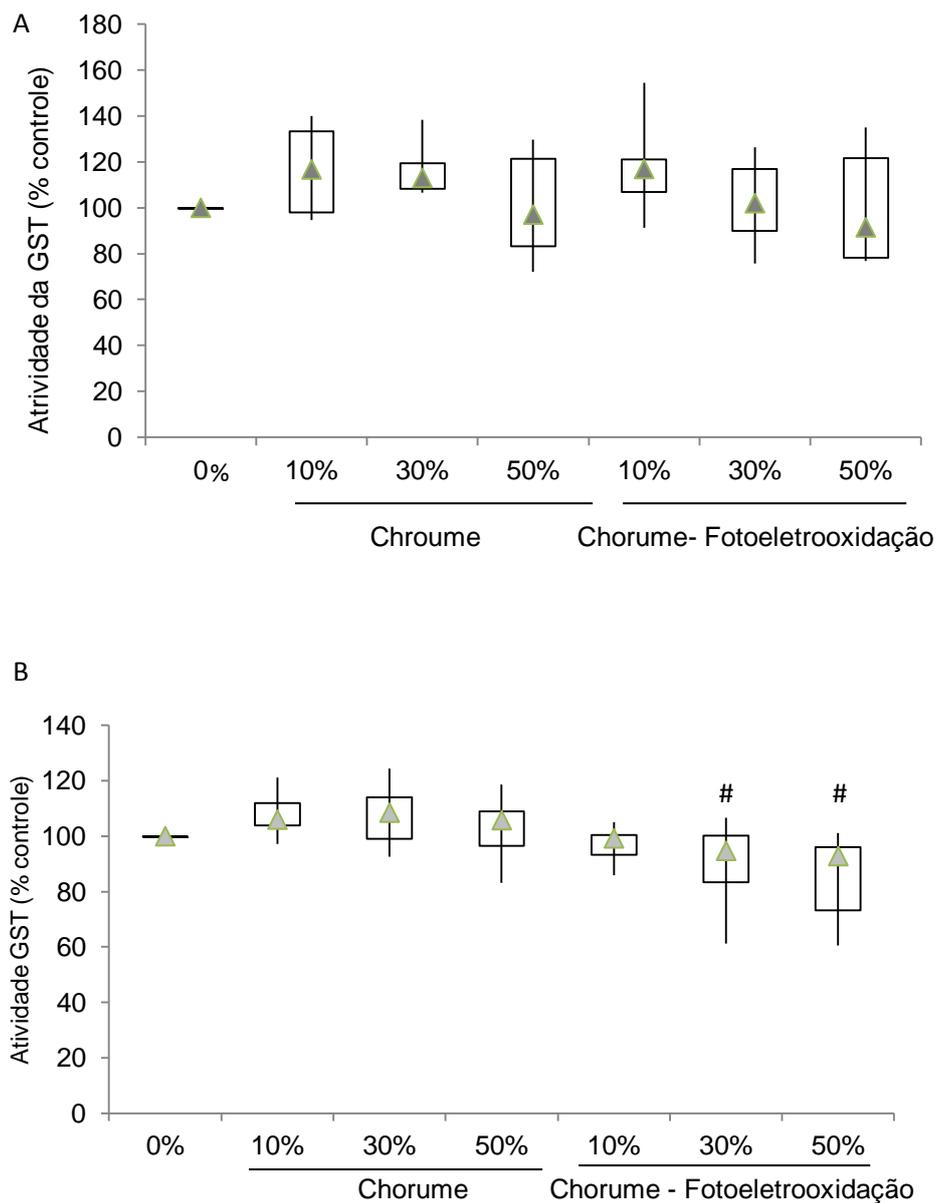


**Figura 10.** Avaliação do índice de lipoperoxidação em cerebelo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de MDA formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW=16,69;  $p= 0,0105$ ,  $n=6$ ; **(B)** Camundongos:  $n=7$ . \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.

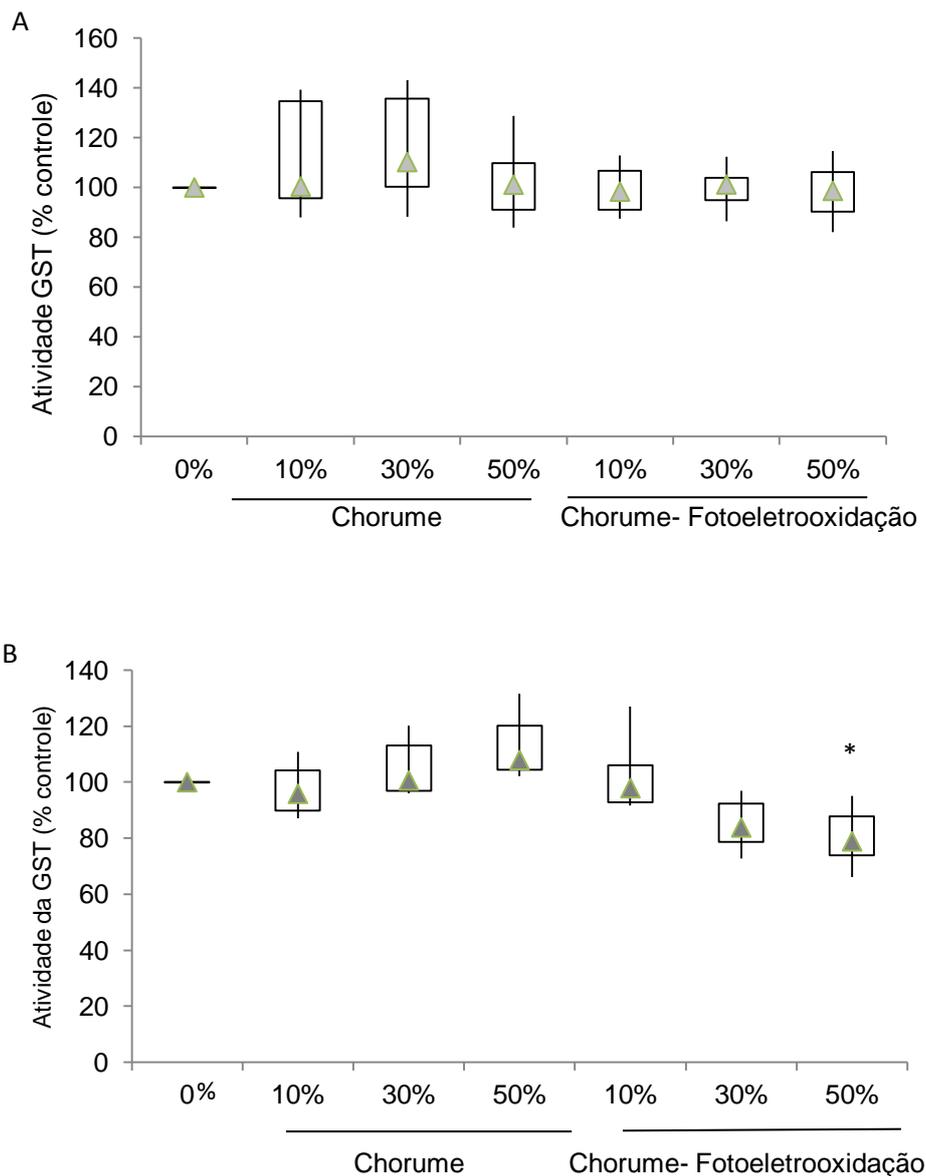
### 4.2.3. Atividade da Enzima Glutathiona S-Transferase

A atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) foi avaliada em homogeneizados de hipocampo, estriado e cerebelo de ratos e de camundongos incubados com diferentes concentrações de chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação.

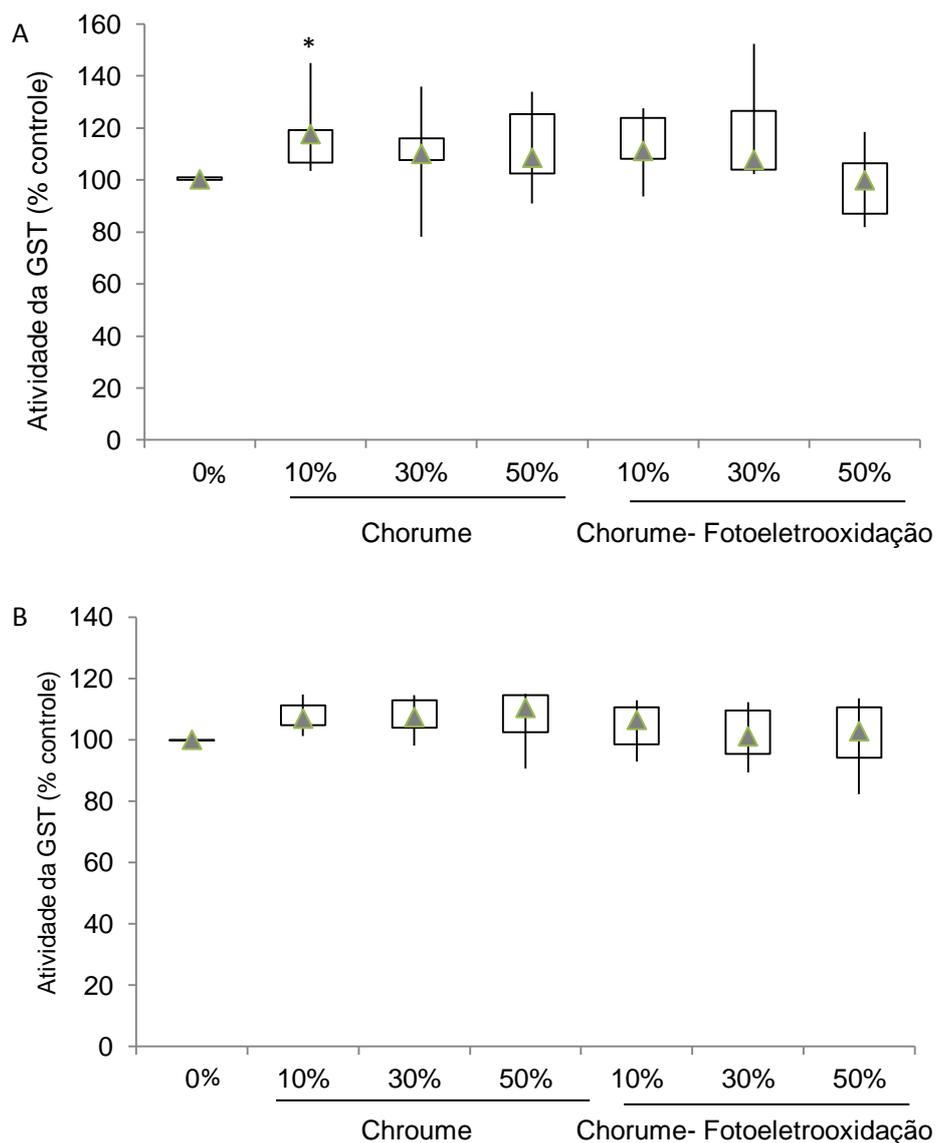
A atividade da GST não foi alterada no hipocampo de ratos incubado com ambos os chorumes (Fig. 11A). No hipocampo de camundongos, houve uma redução na atividade da enzima GST quando incubado com o chorume submetido à fotoeletrooxidação nas maiores concentrações, 30 e 50% comparado aos grupos incubados com chorume sem tratamento (Fig. 11B). Ambos os chorumes não alteraram significativamente a atividade da GST no estriado de ratos (Fig. 12A). No entanto, em estriado de camundongos a incubação com o chorume submetido à fotoeletrooxidação na maior concentração reduziu significativamente a atividade da GST. (Fig. 12B). No cerebelo de ratos incubado com o chorume não tratado na menor concentração (10%), houve um aumento da atividade da GST, porém a incubação com o chorume submetido à fotoeletrooxidação não alterou a atividade da enzima (Fig. 13A). A incubação do cerebelo de camundongos com ambos os chorumes não modificou sinificativamente a atividade da GST (Fig. 13B).



**Figura 11.** Atividade da enzima glutathiona S-transferase em hipocampo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de atividade da enzima GST. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: n=8; **(B)** Camundongos: KW= 31,92; p<0,0001; n=11. # = valores significativamente diferentes dos grupos 30 e 50% de chorume sem tratamento.



**Figura 12.** Atividade da enzima glutathiona S-transferase em estriado incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de atividade da enzima GST. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: n=8; **(B)** Camundongos: KW= 37,31; p<0,0001; n=8. \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.



**Figura 13.** Atividade da enzima glutationa S-transferase em cerebelo incubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de atividade da enzima GST. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW= 19,93; p=0,0029; n=8; **(B)** Camundongos: n=10. \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.

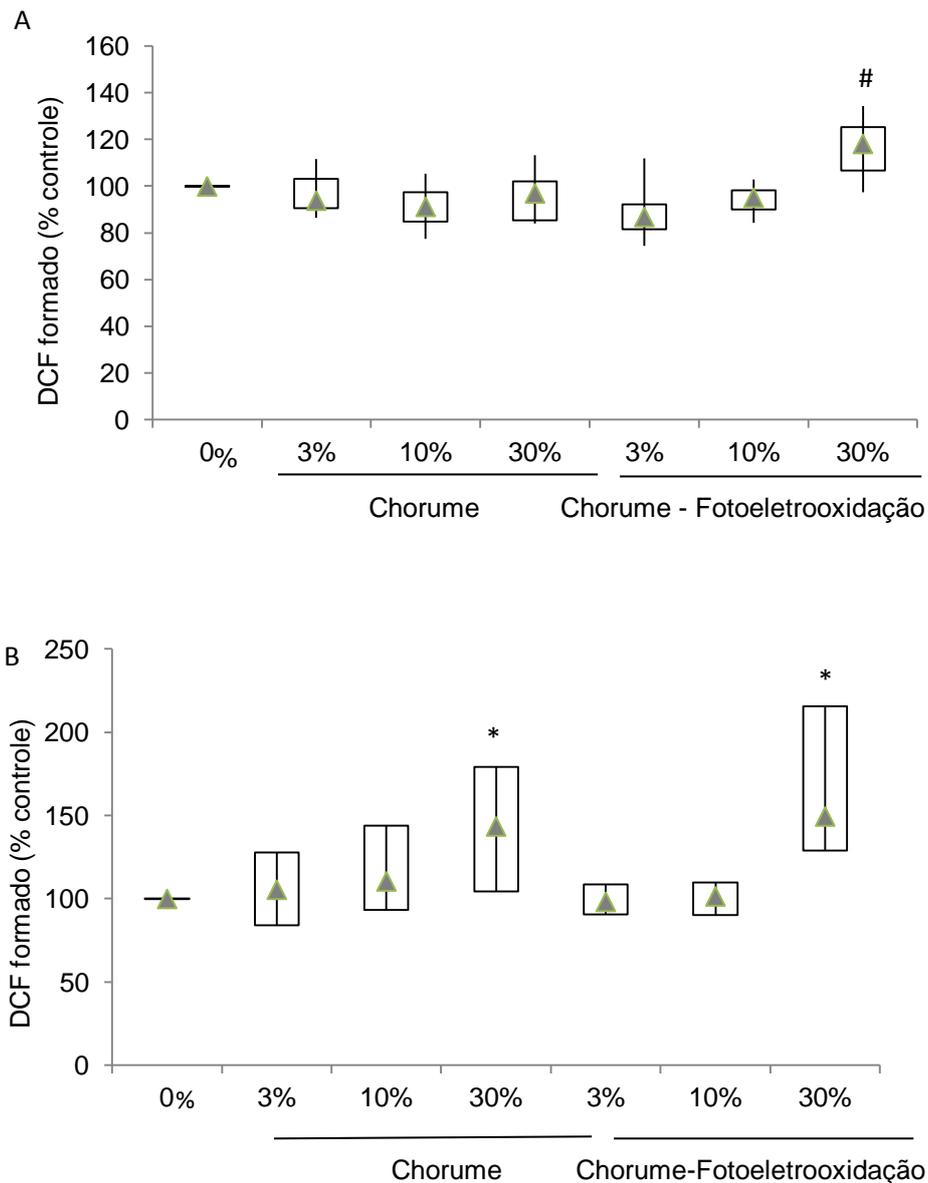
### **4.3. Hepatotoxicidade**

#### **4.3.1. Níveis de Radicais Livres**

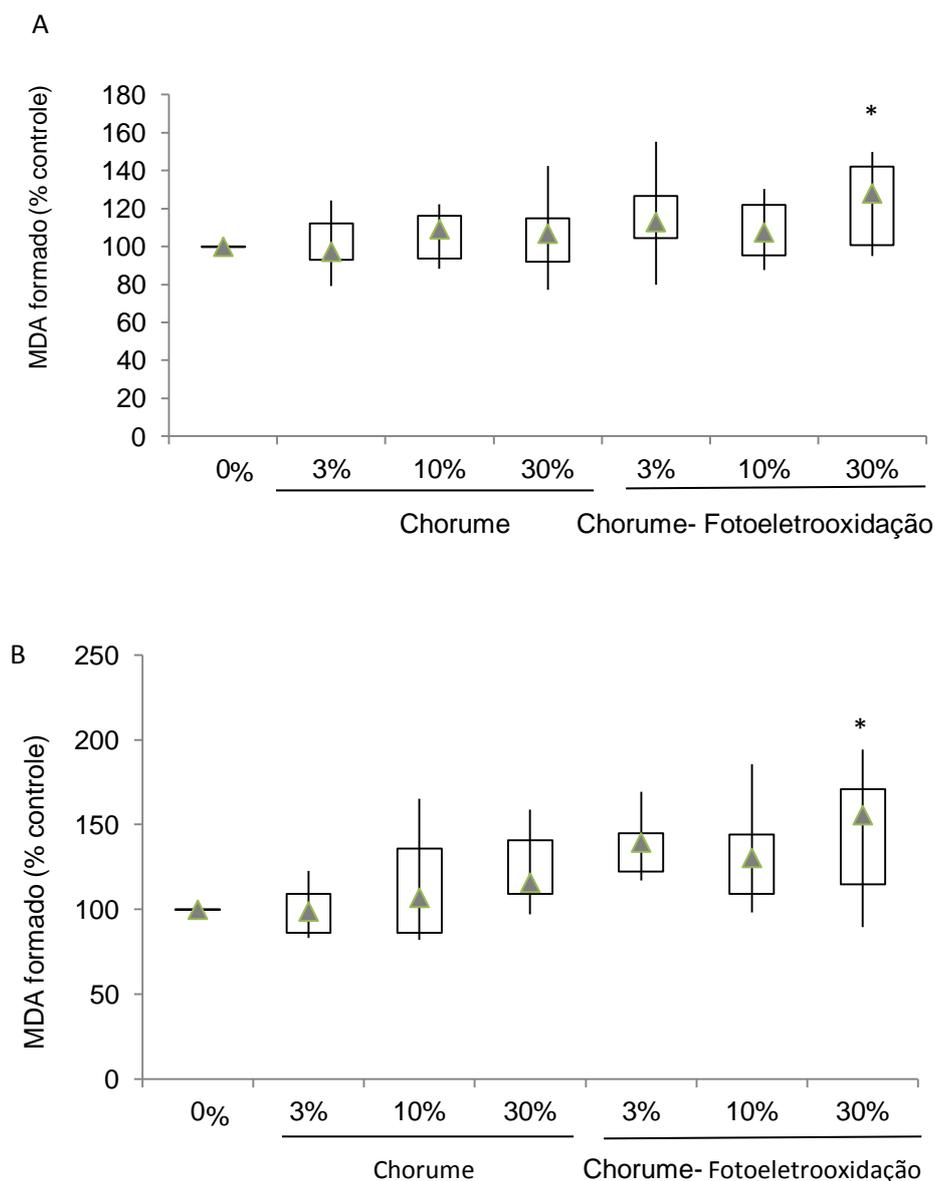
Os níveis de radicais livres foram avaliados no fígado de ratos e camundongos incubados com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação. Em ratos houve um aumento significativo nos níveis de radicais livres na incubação com a maior concentração de choro me submetido à fotoeletrooxidação comparado aos demais grupos menos o grupo controle (Fig. 14A). Já no fígado de camundongos, a maior concentração dos chorumes não tratado e submetido à fotoeletrooxidação aumentaram significativamente os níveis de radicais livres (Fig. 14B).

#### **4.3.2. Lipoperoxidação**

A lipoperoxidação foi avaliada no fígado de ratos e camundongos incubados com diferentes concentrações de choro me não tratado e de choro me submetido à fotoeletrooxidação. A incubação com a maior concentração do choro me submetido à fotoeletrooxidação aumentou significativamente os níveis de lipoperoxidação no fígado de ratos (Fig. 15A) e no fígado de camundongos (Fig. 15B).



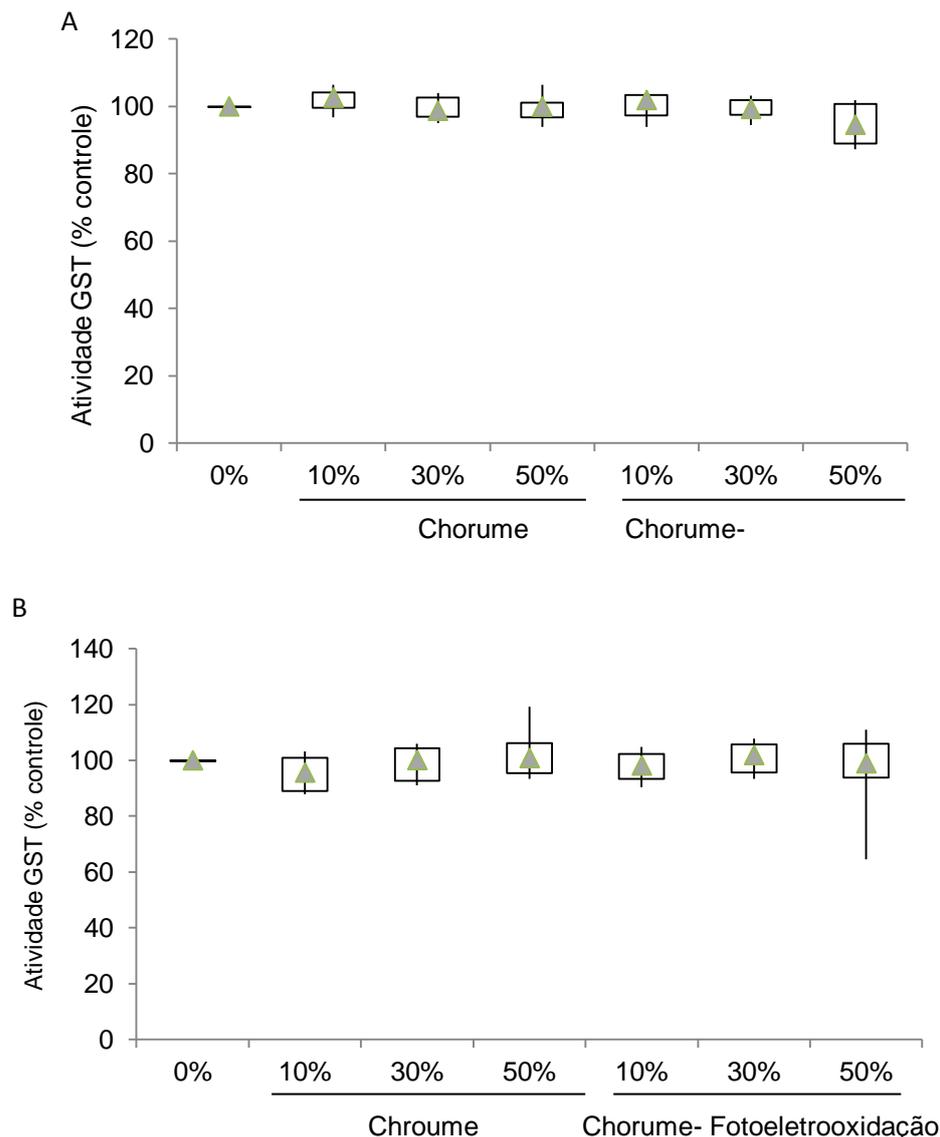
**Figura 14.** Níveis de radicais livres no fígado incubado com chorume não tratado e chorume submetido  fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de DCF formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW=30,99;  $p < 0,0001$ ;  $n=11$ ; **(B)** Camundongos: KW=29,46;  $p < 0,0001$ ;  $n=8$ . # = valores significativamente diferentes dos outros grupos menos do grupo 0%; \* = valores significativamente diferentes do grupo 0% de chorume.



**Figura 15.** Avaliação do índice de lipoperoxidação no fígado incubado com choro me não tratado e choro me submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de choro me considerados 100% de MDA formado. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: KW= 12,82; p= 0,0460; n=11; **(B)** Camundongos: KW=23,60; p=0,0006; n=11. \*= valores significativamente diferentes do grupo 0% de choro me.

### **4.3.3. Atividade da Enzima Glutathiona S-Transferase**

A atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) foi avaliada no fígado de ratos e camundongos. Não houve alterações da atividade da GST no fígado de ratos incubado com ambos os chorumes (Fig. 16A). Em camundongos a atividade da GST também não foi alterada pela incubação com as diferentes concentrações de chorume testadas (Fig. 16B).



**Figura 16.** Atividade da enzima glutathiona S-transferase no fígado de ratos cubado com chorume não tratado e chorume submetido à fotoeletrooxidação de ratos (A) e camundongos (B). Resultados expressos como porcentagem de controle, sendo valores do grupo 0% de chorume considerados 100% de atividade da enzima GST. Valores expressos em mediana (intervalos interquartis 25/75), Kruskal Wallis seguido de Dunn's. **(A)** Ratos: n=8; **(B)** Camundongos: n=12.

As Tabelas 3A e 3B abaixo mostram um resumo dos resultados aqui apresentados de ratos e camundongos, respectivamente.

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados em diferentes estruturas cerebrais e fígados incubados com o chorume não tratado ou chorume submetido à fotoeletrooxidação comparados ao seu respectivo grupo controle (grupo 0% de chorume), **(A)** Ratos e **(B)** Camundongos.

A

<b>Ratos</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Radicais Livres</b>	<b>Lipoperoxidação</b>	<b>Atividade GST</b>
<b>Chorume sem tratamento</b>	Hipocampo	=	=	=
	Estriado	↑	=	=
	Cerebelo	=	↑	↑
	Fígado	=	=	=
<b>Chorume-Fotoeletrooxidação</b>	Hipocampo	=	=	=
	Estriado	=	↑	=
	Cerebelo	↑	=	=
	Fígado	=	↑	=

(= = não alterou; ↑= aumentou; ↓= diminuiu)

B

<b>Camundongos</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Radicais Livres</b>	<b>Lipoperoxidação</b>	<b>Atividade GST</b>
<b>Chorume não tratado</b>	Hipocampo	=	=	=
	Estriado	↑	=	=
	Cerebelo	↑	=	=
	Fígado	↑	=	=
<b>Chorume - Fotoeletrooxidação</b>	Hipocampo	=	=	=
	Estriado	=	↑	↓
	Cerebelo	=	=	=
	Fígado	↑	↑	=

(= = não alterou; ↑= aumentou; ↓= diminuiu)

## 5. Discussão

O tratamento fotoeletrooxidativo reduziu a concentração da maioria das substâncias presentes no chorume de aterro sanitário avaliado. A degradação da amônia ocorreu, principalmente, devido ao processo de oxidação indireta onde o poluente foi destruído através de fortes oxidantes gerados pelas reações eletroquímicas (Rodrigues et al., 2008). O aumento na concentração de nitrato encontrado após a fotoeletrooxidação está relacionado ao processo onde na presença de cloreto, o cloro é gerado na superfície do ânodo ( $2\text{Cl}^- \leftrightarrow \text{Cl}_2(\text{eletrodo}) + 2\text{e}^-$ ) e como resultado da oxidação da amônia ocorre a formação de nitrato. Além disso, o tratamento reduziu a demanda química de oxigênio em 88,3% quando comparado ao chorume sem tratamento. A significativa redução do DQO está relacionada à habilidade do tratamento fotoeletrooxidativo em decompor a matéria orgânica (Rodrigues et al., 2008).

No presente estudo, nós demonstramos que a incubação com o chorume pode induzir estresse oxidativo tanto em estruturas cerebrais quanto em fígado de roedores. Nossos resultados mostraram que o chorume não tratado aumentou os níveis de radicais livres no estriado de ambas as espécies, avaliados pelos níveis de DCF formado. No cerebelo, o chorume também alterou os níveis de radicais livres. No entanto, no hipocampo tanto de ratos quanto de camundongos, a incubação com o chorume não aumentou os níveis de radicais livres comparados ao grupo controle. Além disso, as estruturas cerebrais de ratos e camundongos responderam de forma diferente à incubação com o chorume.

De acordo com os nossos resultados, podemos sugerir que a toxicidade do chorume pode estar relacionada ao aumento nos níveis de radicais livres encontrado. Recentemente, Li e colaboradores (2010) sugeriram que a genotoxicidade induzida pelo chorume em células de mamíferos teria como possível mecanismo de ação a formação de radicais livres. É importante ressaltar que o dano oxidativo induzido pelas EROs está envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças, inclusive em doenças neurodegenerativas.

Os radicais livres podem atacar as membranas celulares iniciando uma reação em cadeia e levando a uma desintegração e desestabilização celular como resultado da peroxidação lipídica (Muthuswamy, 2006). O aumento nos

níveis de conteúdo de TBARS é um importante indicador de lipoperoxidação (Celik and Suzek, 2009). De acordo com Meng & Zhang (2006), a peroxidação lipídica pode ser produzida através do efeito tóxico de algumas toxinas químicas sobre os organismos vivos. No cerebelo de ratos, os níveis de lipoperoxidação foram aumentados quando incubado com chorume não tratado, no entanto em camundongos não houve alterações nos índices de lipoperoxidação. Por outro lado, nossos resultados mostraram que houve um aumento nos níveis de lipoperoxidação no estriado de ambas as espécies incubados com chorume submetido à fotoeletrooxidação. Conseqüentemente, podemos propor que o tratamento fotoeletrooxidativo produziu compostos indutores da lipoperoxidação no estriado de ratos e camundongos.

Os resultados encontrados sugerem que algumas estruturas cerebrais como o estriado e o cerebelo, podem ser mais suscetíveis ao estresse oxidativo induzido pelo chorume quando comparadas ao hipocampo. No entanto, o cerebelo demonstrou alterações tanto no nível de radicais livres quanto na lipoperoxidação somente quando incubado com as maiores concentrações testadas de chorume. Já no estriado, a incubação com chorume em menores concentrações foi capaz de alterar os parâmetros de estresse oxidativo avaliados, sugerindo uma maior suscetibilidade desta estrutura cerebral ao dano oxidativo induzido pelo chorume. A diferença encontrada entre as estruturas pode estar relacionada com a heterogeneidade regional às neurotoxinas e com a distinta capacidade antioxidante observada em diferentes áreas cerebrais (Siqueira et al., 2005). Além disso, tecidos e órgãos possuem diferentes taxas de atividade metabólica e de consumo de oxigênio, fatores que podem ser responsáveis, pelo menos em parte, à suscetibilidade de alguns órgãos aos agentes tóxicos ambientais (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

Estudos recentes demonstraram que a exposição ao ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), uma toxina que inibe a cadeia respiratória no complexo II, é mais prejudicial ao estriado do que a outras regiões cerebrais, tal sensibilidade pode estar relacionada ao aumento na geração de EROs (Herrera-Mundo & Stiges, 2010; Singh et al., 2010). Em outro estudo, demonstrou-se que o efeito neurotóxico da 6-hidroxidopamina no sistema dopaminérgico estriatonigral em ratos ocorre através da produção de radicais livres além de induzir alterações comportamentais incluindo uma diminuição da

atividade locomotora espontânea relacionada à dopamina e déficits comportamentais ipsilateral (Heim et al., 2001). Adicionalmente, quando comparados ao hipocampo, o cerebelo e, principalmente, o estriado contêm baixos níveis endógenos de alfa-tocoferol (vitamina E), o que pode estar relacionado à maior sensibilidade destas estruturas cerebrais aos danos oxidativos (Bergamini et al., 2004; Santos et al., 2011; Martin et al., 2000). Em acordo, alguns autores sugerem que a vulnerabilidade a espécies reativas de determinadas regiões parece ter correlação com a concentração de ácidos graxos poliinsaturados e vitamina E (Tyurin et al., 1989; Macevilly & Muller, 1996). Outros fatores como as diferenças na capacidade antioxidante e conseqüentemente no estado redox celular podem modular o estado tiol e contribuir para a sensibilidade dos tecidos às neurotoxinas (Siqueira et al., 2005) devem ser considerados.

Já está bem descrito na literatura que o estresse oxidativo pode estar relacionado à neurotoxicidade de vários xenobióticos (El-Demerdash, 2011; Ross & Moldeus, 1991; Santos, 2007). Li e colaboradores (2006a;b) descreveram que diferentes concentrações de chumbo podem aumentar os níveis de TBARS em diferentes órgãos como rins, baço, coração, além do cérebro e do fígado. No trabalho de Li e colaboradores (2006a;b), os níveis de TBARS foram avaliados no homogenizado de cérebro total no entanto, como discutido anteriormente, diferentes respostas ao estresse oxidativo podem ser encontradas em regiões específicas do cérebro (Muthuswamy, 2006; Siqueira et al., 2005). Neste contexto, torna-se relevante avaliar as estruturas cerebrais individuais já que, o uso do homogenizado cerebral total poderia mascarar as alterações que ocorrem em regiões distintas (Pleshakova et al., 1998).

Além das alterações bioquímicas relacionadas aos xenobióticos, alterações comportamentais também foram observadas. Em um estudo recente, Siqueira e colaboradores (2011) demonstraram que camundongos expostos ao efluente de curtume não tratado tiveram um aumento no comportamento do tipo ansioso enquanto que, aqueles expostos ao efluente submetido ao tratamento fotoeletrooxidativo não demonstraram o mesmo perfil, podendo-se sugerir que o tratamento foi efetivo para o efluente de curtume.

Juntamente com a avaliação da neurotoxicidade, foram avaliados os efeitos da incubação do chumbo em fígado de ratos e camundongos. Nós

observamos que os fígados de camundongos foram mais sensíveis ao chorume sem tratamento, visto que houve um aumento nos níveis de DCF formado, o qual não foi encontrado em ratos. No entanto, houve um aumento da lipoperoxidação nos fígados de ambas as espécies incubados com o chorume submetido à fotoeletrooxidação. O resultado encontrado no fígado está de acordo com os dados obtidos com o estriado, onde houve um aumento nos níveis de lipoperoxidação de ambas as espécies quando incubados com chorume submetido à fotoeletrooxidação. Estes dados contrariam a nossa hipótese de trabalho formulada, a qual previa que o tratamento fotoeletrooxidativo reduziria os compostos tóxicos presentes no chorume. Porém, no momento, não podemos explicar o possível mecanismo pelo qual o tratamento fotoeletrooxidativo causou o aumento nos índices de lipoperoxidação no fígado e no estriado das espécies estudadas.

É importante destacar que a incubação com o chorume em menores concentrações induziu um aumento em ambos os parâmetros de estresse oxidativo avaliados no estriado, enquanto que no fígado foram necessárias maiores concentrações. O fígado é um órgão de extrema importância que desempenha diversas funções, entre elas, a degradação e a excreção de substâncias (Tarla et al., 2006). Evidências indicam que o fígado possui uma maior capacidade de regeneração e adaptação às alterações metabólicas do que o cérebro (Tarla et al., 2006), além de ser menos vulnerável aos danos oxidativos (Leipnitz et al., 2009). Adicionalmente, o cérebro é particularmente sensível ao ataque dos radicais livres devido à sua alta taxa de metabolismo oxidativo associada à produção de EROs e grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell & Gutteridge., 2007).

Além do estado oxidativo, avaliado através dos níveis de radicais livres e da lipoperoxidação, os efeitos da incubação *in vitro* do chorume com as estruturas cerebrais e o fígado foram avaliados sobre a atividade da enzima glutathione S-transferase. Nós encontramos uma redução na atividade da enzima GST no estriado de camundongos incubado com a maior concentração (50%) do chorume submetido à fotoeletrooxidação, no entanto este resultado não foi encontrado no estriado de ratos.

Fiander e Schneider (1999) descreveram que algumas isoformas de GST têm especificidade relativamente alta para os produtos do estresse

oxidativo. Neste contexto, as GSTs podem ser consideradas defesas antioxidantes desempenhando um papel fundamental na proteção contra o dano induzido por radicais livres (Hayes e Pulford, 1995; Fiander e Schneider, 1999). Em um estudo realizado por Luchese e colaboradores (2009), demonstrou-se que a inibição da atividade da GST induzida pela exposição à fumaça de cigarro pode estar associada à depleção dos níveis de GSH e ao aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Portanto, em alguns casos a redução da atividade da GST pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao aumento da lipoperoxidação em diferentes tecidos.

A diferente resposta entre as espécies aqui descrita está de acordo com a literatura. Em um estudo realizado por Moysés e colaboradores (2012), ratos Wistar foram submetidos ao tratamento crônico com efluente de curtume e não foram observadas alterações no estado oxidativo de estruturas cerebrais e fígado. Já em outros trabalhos, camundongos expostos cronicamente ao efluente de curtume apresentaram tanto alterações no estado de ansiedade (Siqueira et al., 2011) quanto nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados (Siqueira, comunicação pessoal). Segundo alguns autores, as diferenças fisiológicas entre as espécies podem resultar em variações nas formas de metabolização de drogas ou xenobióticos (Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003).

Diferentemente, no fígado, tanto de ratos quanto de camundongos, incubado com o chorume com e sem tratamento não foram observadas alterações na atividade da enzima GST. Como descrito anteriormente, as isoenzimas da GST são expressas de maneira tecido-específica sendo que sua composição em diferentes tecidos varia de forma considerável (Dhanani & Awasthi, 2006). Em um estudo realizado por Raza e colaboradores (2000), a modulação do estresse oxidativo e do metabolismo de xenobióticos em ratos com diabetes crônica induzida por streptozocina foi avaliada. A atividade da enzima GST foi encontrada aumentada no cérebro, no entanto inalterada no fígado dos animais, sugerindo que as alterações na atividade da GST podem estar relacionadas a alterações tecido-específicas além de expressão de isoenzimas diferentes em tecidos distintos. Adicionalmente, Bhagwat e colegas (1998), sugeriram que existe uma seletividade nos efeitos de diferentes

xenobióticos sobre a expressão e a atividade catalítica de isoenzimas da GST em diferentes compartimentos subcelulares dos tecidos.

## **6. Conclusão**

O chorume de aterro sanitário pode induzir um estado de estresse oxidativo em estruturas cerebrais e fígado de roedores. Estes resultados sugerem que a toxicidade do chorume pode estar relacionada ao dano oxidativo devido à formação de radicais livres. Além disso, demonstramos que diferentes estruturas cerebrais podem responder de formas distintas à toxicidade induzida pelo chorume, tanto em ratos quanto em camundongos. Adicionalmente, o tratamento fotoeletrooxidativo não foi capaz de alterar eficientemente os compostos tóxicos presentes no chorume testado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K., Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios* 47: 147-154, 1986.
- BAKARE, A.A, MOSURO, A.A., OSIBANJO, O. Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis on roots of *Alium cepa* (L). *J. Environ. Biol.* 21, 251-260, 2000.
- BAKARE, A.A., MOSURO, A.A., OSIBANJO, O. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by landfill leachates *Mutat Res.* 582(1-2), 28-34, 2005.
- BHAGWAT, S.V., MULLICK, J, AVADHANI, N.G, RAZA, H. Differential response of cytosolic, microsomal, and mitochondrial glutathione S-transferases to xenobiotic inducers. *Int J Oncol.* 13(2):281-288, 1998.
- BERGAMINI, C. M., GAMBETTI, S., DONDI, A., CERVELLATI, C. Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage. *Curr Pharm Des.* 10(14), 1611-26. 2004.
- BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. *Química Nova.* v. 25, p. 477-482, 2002.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-10, 1978.
- BOMBAIL, V., AW, D., GORDON, E. E BATTY, J., Application of the comet and micronucleus assay to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44: 383-392, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- BROMONT, C., MARIE, C., BRALET, J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20, 918-924, 1989.
- BUTTERFIELD, D.A., BADER, M., LANGE, M.L., SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801: 924-9, 2010.
- CALIJURI, M., MELO, A. L. O., LORENTZ, J. F. Identificação de áreas para a implantação de aterros sanitários com uso de análise estratégica de decisão. *Informática Pública.* v. 4, p. 231-250, 2002.
- CHRISTENSEN, T. H., BJERG, P. P. L., JENSEN, D. L., CHRISTENSEN, A., BAUM, A., ALBRECHTSEN, H. J., HERON, G. Biochemistry of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry.* v. 16, p. 659-718, 2001.
- CLARKE, J.B. & SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic neurochemistry*, 6th ed. (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds), Philadelphia: LippincottRaven, pp 637-669, 1999.

CLESCERI, L. S., GREENBERG, A. E., TRUSSEL, R. R. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 17th ed. APHA, New York, pp. 222–340, 1989.

COOPER, A.J.L., KRISTAL, B.S., Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378:793-802, 1997.

DHANANI, S. & AWASTHI, Y.C. Glutathione S-transferase isozyme composition of human tissues, in *Toxicology of Glutathione Transferases.* pp 321-338, 2006.

D'ALMEIDA, M. L. O. & VILHENA, A. Lixo Municipal: Manual de Gerenciamento Integrado. 2ª ed. IPT/CEMPRE. São Paulo, 2000.

DENEKE, S.M. & FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1):L163-73, 1989 .

DING, A., ZHANG, Z.; FU, J., CHENG, L. Biological control of leachate from municipal Landfills. *Chemosphere.* v. 44, p. 1-8, 2001.

DOMÈNECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea.* Cap. 1, Rede CYTED, La Plata, 2001.

DRINGEN R. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267(16):4903, 2000.

DRIVER, A.S., KODAVANTI, P.R.S., MUNDY, W.R. Age-related in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 175– 181, 2000.

EL-DEMERDASH, F.M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol.* 49(6), 1346-1352, 2011.

EL FADEL, M. & KHOURY, R. Modeling Settlement in MSW Landfills: a critical review. *Environmental Science and Technology.* v. 30, p. 327-361, 2000.

FERREIRA, J.A. & ANJOS, L. F. Aspectos de saúde coletiva e ocupacional associados à gestão dos resíduos sólidos municipais. *Cad. Saúde Pública,* Rio de Janeiro, 17(3),689-696, 2001.

FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 43(1), 61-68, 1997.

FIANDER, H., SCHNEIDER, H. Compounds that induce isoforms of glutathione S-transferase with properties of a critical enzyme in defense against oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 262(3):591-595, 1999.

GAJSKI, G., OREŠČANIN, V., GARAJ-VRHOVAC, V. Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. *Ecotoxicol Environ Saf.* [Epub ahead of print], 2011.

GARDÈS-ALBERT, M. JORE, D., FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 2-30, 1991.

GOLIMOWSKI, J. & GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 325 III-133, 1996.

GRANT, W. F., Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.* 426: 107–112, 1999.

HABIG, W.H., PABST. M.J., JAKOBY. W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* Nov 25;249(22):7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8. Review, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press, Oxford, pp. 268–340, 2007.

HARAMAKI, N., STEWART, D.B., AGGARWAL, S., IKEDA, H., REZNICK, A.Z., PACKER, L. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 25(3), 329-339, 1998.

HAYES, J.D., PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30(6): 445-600, 1995.

HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45: 51–88, 2005.

HEIM, C., KOLASIEWICZ, W., KURZ, T., SONTAG, K. Behavioral alterations after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the striatum effect of  $\alpha$ -tocopherol. *Pol J Pharmacol.* 53(5),435-448, 2001.

HERRERA-MUNDO, N., SITGES, M. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. *J Neurochem.* 114(2), 597-605, 2010.

HO, Y.S., MAGNENAT, J.L., BRONSON, R.T., CAO, J., GARGANO, M., SUGAWARA, M., FUNK, C.D.,. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272:16644-16651, 1997.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents—a review, *Mutat. Res.* 277:91–138. 1992.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Plano Nacional de Saneamento Básico. 2000.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. 2008.

KANG, S.J., ALLBAUGH, T.A., REYNHOUT, J.W., ERICKSON, T.L., OLMSTEAD, K.P., THOMAS, L., THOMAS, P. Selection of an ultraviolet disinfection system for a municipal wastewater treatment plant. *Water Sci Technol.* 50(7), 163-169, 2004.

KJELDSEN, P., BARLAZ, M. A., ROOKER, A. P., BAUN, A., LEDIN, A., CHRISTENSEN, T. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. *Environmental Science and Technology.* v. 32, p. 297-336, 2002.

LEBEL, C.P., ALI, S.F., MCKEE, M., BONDY, S.C. Organometal induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2,7-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104, 17–24, 1990.

LEE, J., KOSARAS, B., DEL SIGNORE, S.J., CORMIER, K., MCKEE, A., RATAN, R.R., KOWALL, N.W., RYU, H. Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice. *Acta Neuropathol* 121: 487-98, 2011.

LEIPNITZ, G., SEMINOTTI, B., FERNANDES, C.G., AMARAL, A.U., BESKOW, A.P., DA SILVA, L.B., ZANATTA, A., RIBEIRO, C.A., VARGAS, C.R., WAJNER, M. Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *J Dev Neurosci.* 27(4), 351-356, 2009.

LI, G., SANG, N., GUO, D. Oxidative damage induced in hearts, kidneys and spleens of mice by landfill leachate. *Chemosphere* 65, 1058–1063, 2006a.

LI, G., SANG, N., WANG, Q. Oxidative damage induced in brains and livers of mice by landfill leachate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 134–139, 2006b.

LI, H., HAN, M., HOU, L., LI, G., SANG, N. Landfill leachate ingestion induces protein oxidation and DNA–protein crosslinks in mouse viscera. *Journal of Hazardous Materials* 174, 54–58, 2010.

LIMON-PACHECO, J., GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674:137–147, 1996.

LUCHESE, C., STANGHERLIN, E.C., GAY, B.M., NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(1):248-54, 2009.

MACEVILLY, C.J., MULLER, D.P., Lipid peroxidation in neural tissues and fractions from vitamin E-deficient rats. *Free Radic Biol Med.* 20(5):639-648, 1996.

MACHADO, A.V. & PRATA FILHO, D.A. Gestão de resíduos sólidos urbanos em Niterói. 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1999.

MANNERVIK, B., BOARD, P.G., HAYES, J.D., LISTOWSKY, I., PEARSON, W.R. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:1–8, 2005.

SMITH, C., MARKS, A.C., LIEBERMAN, M. *Bioquímica Médica Básica de Marks: uma abordagem clínica*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c. xii, 977 p. (439-458), 2005.

MARTIN, A., PRIOR, R., SHUKITT-HALE, B., CAO, G., JOSEPH, J.A. Effect of fruits, vegetables, or vitamin E--rich diet on vitamins E and C distribution in peripheral and brain tissues: implications for brain function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 55(3), B144-B151, 2000.

MEIRA, J.C.R. *Chorume do aterro sanitário de Goiânia: tratamento por floculação/coagulação/degradação fotoquímica e custos operacionais*. Florianópolis. Tese de Mestrado em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

MENG, Z. & ZHANG, Q. Oxidative damage of dust storm fine particles instillation on lungs, hearts and livers of rats. *Environ Toxicol Phar*. 22, 277–282, 2006.

MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett*. 143(1):9-16, 2003.

MOYSES, F., BERTOLDI, K., ELSNER, V., SPINDLER, C., SANCHES, E., RODRIGUES, M.A.S SIQUEIRA, I.R., Exposition to untreated and treated tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats., submetido *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2012.

MUTHUSWAMY, A.D., VEDAGIRI, K., GANESAN, M., CHINNAKANNU, P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of l-carnitine and dl-a-lipoic acid. *Clinica Chimica Acta* 368, 84 – 92, 2006.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology*. 183(1-3):29-37, 2003.

OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*. 567(2-3),109-149, 2004.

PÉREZ-CAMPO, R., LÓPEZ-TORRES, M., ROJAS, C., CADENAS, S., BARJA, G. A comparative study of free radicals in vertebrates – I. Antioxidants enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 105, 749– 755, 1993.

PLESHAKOVA, O.V., KUTSYI, M.P., SUKHAREV, S.A., SADOVNIKOV, V.B., GAZIEV, A.I. Study of protein carbonyls in subcellular fractions isolated from liver and spleen of old and g-irradiated rats. *Mech. Ageing Dev*. 103, 45–55, 1998.

PICKETT, C.B. & LU, A.Y. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem*. 58, 743-764, 1989.

PINHEDO, L., PELEGRINI, R., BERTAZZOLI, R., MOTHEO, A.J. Photoelectrochemical degradation of humic acid on a (TiO<sub>2</sub>)<sub>0.7</sub>(RuO<sub>2</sub>)<sub>0.3</sub> dimensionally stable anode. *App Catal B*. 57, 75-81. 2005.

PRIGOL, M., WILHELM, E.A., SCHNEIDER, C.C., NOGUEIRA, C. Protective effect of unsymmetrical dichalcogenide, a novel antioxidant agent, in vitro and an in vivo model of brain oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* 176, 129–136, 2008.

RAO, M.V., LEE, H.I., DAVIS, K.R. Ozone- induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32(4), 447-456, 2002.

RAZA, H., AHMED, I., JOHN, A., SHARMA, A.K. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. *J Biochem Mol Toxicol*;14(3):131-139, 2000.

RODRIGUES, M.A.S., AMADO, F.D.R., XAVIER, J.L.N., STREIT, K.F., BERNARDES, A.M., FERREIRA, J.Z. Application of photoelectrochemical electro dialysis treatment for the recovery and reuse of water from tannery effluents. *J Clean Prod* 16, 605- 611, 2008.

ROSS, D. & MOLDEUS, P. Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey C (ed) *Membrane lipid oxidation*. CRC Press, Boca Raton, pp 151–170, 1991.

RUIPEREZ, V., DARIOS, F., DAVLETOV, B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res* 49: 420-8, 2010.

SALINAS, A.E., WONG, M.G. Glutathione S-transferases—a review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279–309, 1999.

SANCHEZ-GALAN, S., LINDE, A. R., IZQUIERDO, J. I. E., GARCIA-VAZQUEZ, E., Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods biomonitor freshwaters ecosystems. *Mutat. Res.* 412: 218-225, 1998.

SANTOS, N.A., MARTINS, N.M., CURTI, C., PIRES BIANCHI, M. DE L., DOS SANTOS, A.C. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chem Biol Interact.* 170(3), 177-186, 2007.

SANTOS, P.S., COSTA, J.P., TOMÉ ADA, R., SALDANHA, G.B., DE SOUZA, G.F., FENG, D., DE FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. *Eur J Pharmacol.* 668(1-2), 65-71, 2011.

SILVA, A. C., DEZOTTI, M., SANT'ANNA G. L. Treatment and detoxification of a sanitary landfill leachate. *Chemosphere.* v. 55, p. 207-214, 2004.

SILVA, I.R. & MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.275-374, 2007.

SINGH, S., MISIAK, M., BEYER, C., ARNOLD, S. Brain region specificity of 3 nitropropionic acid- induced vulnerability of neurons involves cytochrome c oxidase. *Neurochem Int.* 57 (3), 297-305, 2010.

SIQUEIRA, I.R., FOCHESSATO, C., DE ANDRADE, A., SANTOS, M., HAGEN, M., BELLO-KLEIN, A., NETTO, C.A. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 23(8), 663-671, 2005.

SIQUEIRA, I.R., VANZELLA, C., BIANCHETTI, P., RODRIGUES, M.A., STÜLP, S. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: The effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicol Teratol.* 33(4),481-484, 2011.

SRIRAM, K., PAI, K.S., BOYD, M.R., RAVINDRANATH, V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 749, 44–52, 1997.

TARLÁ, M.R., RAMALHO, F., RAMALHO, L.N., SILVA, T. DE C., BRANDÃO, D.F., FERREIRA, J., SILVA, O. DE C., ZUCOLOTO, S. Review. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 21(1), 63-66, 2006.

TYURIN, V. A., KOROL'KOV, S. N., KAGAN, V. E. Transbilayer distribution of  $\alpha$ -tocopherol and asymmetry of lipids in membranes of nerve tissue. *Biochem.* 54, 757-763, 1989.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B., BLAISE, C. Sorption of organic genotoxins to particulate matter in industrial effluents, *Environ. Mol. Mutag.* 27: 140–151, 1996.

YAGI, K. In: Armstrong D. (ed.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 108: Free radical and Antioxidant Protocols, Humana Press Inc, Totowa, NJ, p. 101-106, 1998.

YANG, Y., SHARMA, R., ZIMNIAK, P., AWASTHI, Y.C. Role of alpha class glutathione S-transferases as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.* 182(2),105-115, 2002.