

**CESAR APARECIDO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS CINCO ANOS DE  
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO NO MUNICÍPIO DE ARAUCÁRIA,  
PARANÁ**

**CURITIBA**

**2007**

**CESAR APARECIDO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS CINCO ANOS DE  
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO NO MUNICÍPIO DE ARAUCÁRIA,  
PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis

Co-orientador: Prof<sup>º</sup> Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

**CURITIBA**

**2007**

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 O Petróleo .....	1
1.4 Estresse Oxidativo .....	2
1.3 Biomarcadores .....	4
1.4 Biotransformação de Xenobióticos - EROD.....	5
1.5 Catalase .....	6
1.6 Glutathiona S-transferase.....	6
1.7 Lipoperoxidação .....	7
1.8 Colinesterase .....	8
1.9 Histopatologia .....	9
1.10 Objetivo Geral.....	10
1.10.1 Objetivos Específicos .....	10
2. CAPÍTULO I.....	11
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS CINCO ANOS DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO EM ARAUCÁRIA, BRASIL.....	11
2.1 INTRODUÇÃO .....	12
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.2.1 Área de Estudo.....	14
2.2.2 Animais.....	15
2.2.3 Desenho Experimental.....	15
2.2.4 Análise Química da Água.....	16
2.2.5 Biomarcadores Bioquímicos.....	17
2.2.6 Histopatologia.....	18
2.2.7 Análise Estatística.....	19
2.3 RESULTADOS.....	20
2.3.1 Taxa de Mortalidade, Peso e Comprimento .....	20
2.3.2 Análise Química da Água.....	20

2.3.3 Biomarcadores Bioquímicos.....	20
2.3.4 Histopatologia.....	24
2.4 DISCUSSÃO .....	29
2.5 AGRADECIMENTOS .....	36
3. CONCLUSÃO .....	37
4. REFERÊNCIAS .....	38
ANEXO.....	54
Normas Para Publicação.....	55

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema simplificado de biotransformação do benzo(a)pireno e uso de biomarcadores bioquímicos.....	8
Figura 2. Localização da Área de estudo .....	14
Figura 3. Atividade específica da catalase (CAT) de <i>Astyanax</i> sp. expostos às águas teste.....	22
Figura 4. Atividade específica da Glutathione S-Transferase (GST) de <i>Astyanax</i> sp. expostos às águas teste .....	23
Figura 5. Concentração de hidroperóxidos de <i>Astyanax</i> sp. expostos às águas teste.....	24
Figura 6. Índice de lesões branquiais encontrados em <i>Astyanax</i> sp. expostos às concentrações de 50% e 100% de águas teste e grupo controle.....	25
Figura 7. Alterações histopatológicas de brânquias de <i>Astyanax</i> sp. expostos às concentrações de 50% e 100% das águas teste .....	26
Figura 8. Índice de lesões hepáticas encontrados em <i>Astyanax</i> sp. expostos às concentrações de 50% e 100% das águas teste e grupo controle.....	27
Figura 9. Alterações histopatológicas em fígado encontradas em <i>Astyanax</i> sp. expostos às concentrações de 50 % e 100% das águas teste .....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações histopatológicas observadas e seus respectivos fatores de importância.....	19
Tabela 2. Análise química da água coletada para a realização do bioensaio. ....	21
Tabela 3. Frequência das alterações histopatológicas observadas em brânquias e fígado de <i>Astyanax</i> sp. expostos às águas teste e grupo controle.....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - acetilcolina  
AChE - acetilcolinesterase  
Ah - hidrocarboneto aromático  
ARNT - hidrocarboneto aromático nuclear transferase  
As - arsênio  
CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio  
CAT - catalase  
Cd - cádmio  
ChE - colinesterase  
Cr - cromo  
Cu - cobre  
CYP1A - subfamília das isoenzimas do citocromo P450  
CYP450 - citocromo P450  
EROD – etoxiresorufina -O-deetilase  
ERO - espécie reativa de oxigênio  
Fe - ferro  
FSA - fração solúvel do petróleo em água  
GSH - glutathiona reduzida  
GST - glutathiona S-transferase  
H<sup>+</sup> - prótons de hidrogênio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
Hg - mercúrio  
HO<sub>2</sub><sup>•</sup> - perhidroxil  
*hsp90* - *heat shock p 90* (proteína de choque térmico)  
K<sup>+</sup> - íon potássio  
KCl - cloreto de potássio  
LPO - lipoperodoxidação  
MFO - oxidases de função múltipla  
Mg - magnésio  
MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio  
Mn - manganês  
Na<sup>+</sup> - íon sódio

NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio  
Ni – níquel  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - superóxido  
OH<sup>•</sup> - radical hidroxil  
OC - organoclorado  
OP - organofosforado  
PAH - hidrocarboneto policíclico aromático  
Pb - chumbo  
PCB – bifenila policlorado  
RO<sup>•</sup> - alcóxil  
ROO<sup>•</sup> - peróxil  
SOD- superóxido dismutase  
TPH – hidrocarboneto total de petróleo  
V - vanádio  
XO - xantina oxidase  
Zn - zinco



## RESUMO

Os recursos hídricos podem constituir o destino final de diversos poluentes oriundos da atividade antrópica. Acidentes ambientais, como o derramamento de cerca de quatro milhões de litros de petróleo ocorrido em 2000 no Arroio Saldanha, Paraná, Brasil, agrava ainda mais a problemática ambiental. Biomarcadores vem sendo utilizados para avaliar os efeitos dos poluentes em organismos aquáticos. Este estudo avaliou a qualidade da água em três pontos: Arroio Saldanha, tributário do Rio Barigui, ponto zero do derramamento de petróleo, a montante e a jusante do local de derramamento de petróleo, situados no Rio Barigui, através de exposição de 96 horas de *Astyanax* sp., utilizando biomarcadores bioquímicos e morfológicos e análises químicas da água. A água foi coletada nos três pontos e levado ao laboratório para realização dos bioensaios. Os bioensaios foram realizados com um grupo controle (água reconstituída) e duas concentrações da água teste (100 e 50%) de cada ponto de coleta. Os biomarcadores bioquímicos analisados foram as atividades da acetilcolinesterase (AChE) no músculo, etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO) no fígado dos peixes. Análises histopatológicas foram realizadas nas brânquias e fígado. Nas análises químicas foram encontrados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais e surfactantes nas águas analisadas. As atividades específicas da CAT e da GST aumentaram ( $P < 0.05$ ) nos peixes expostos às concentrações testadas do Arroio Saldanha, enquanto à jusante e à montante do ponto de derramamento de petróleo observou-se aumento somente das atividades específicas da CAT e LPO ( $P < 0,0001$ ), sugerindo estresse oxidativo nos peixes expostos a essas águas. A atividade da EROD não foi significativamente diferente do grupo controle ( $P > 0,05$ ). O aumento da LPO nos peixes expostos às águas à jusante e à montante do local de derramamento de petróleo, sugere que os peixes estão expostos a xenobióticos que formam radicais livres e que, provavelmente, o sistema de defesa antioxidante está deficiente, acarretando danos às membranas e a outros constituintes celulares. As análises histológicas nos peixes expostos às águas teste mostraram em todos os pontos e nas concentrações analisadas, alterações nas brânquias, tais como aneurismas, fusão lamelar e necrose, enquanto no fígado necrose, infiltração leucocitária e centros de melanomacrófagos. Os resultados encontrados sugerem que a área do derramamento de petróleo ainda não foi totalmente biorremediada, e que a sua montante e jusante sofrem de contaminação crônica, uma vez que existe atividade industrial adjacente.

## ABSTRACT

Hydric resources can receive an expressive load of pollutants from anthropical activity. Environmental accidents, such the spilling of about four million liters of oil occurred in 2000 in Arroio Saldanha, Paraná, Brazil, aggravates the environmental problematic. Biomarkers have been used to evaluate the effect of the pollutants in aquatic organisms. This work evaluated the water quality in three sites: Arroio Saldanha, Barigui River tributary, zero point from oil spill, its upstream and downstream from the site of the oil spill, localized in Barigui River, through the 96 hours exposure of *Astyanax* sp., using biochemical and morphological biomarkers and chemical analysis of water. The water was collected in the three points and brought to the lab for the bioassays. The bioassays were realized with a control group (reconstituted water) and two concentrations of the water-test (100% and 50 %) for each collected site. The biochemical biomarkers analyzed were the activity of acetylcholinesterase (AChE) in fish muscle, ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD), catalase (CAT), glutathione *S*-transferase (GST) and lipid peroxidation (LPO) in fish liver. Histopathological analyses were carried out in the fish gills and liver. Polynuclear aromatic hydrocarbons, metals and surfactants were detection in water-test. The specific activity of the CAT and GST increased ( $P < 0.05$ ) in the fishes exposed to the concentrations tested from Arroio Saldanha, while in downstream and upstream sites only the CAT activities and LPO ( $P < 0.0001$ ) increased, suggesting oxidative stress in the fish exposed to these waters. However, the EROD activity was not significantly different from the control group ( $P > 0.05$ ). The increasing of LPO in the fish exposed to upstream and downstream waters of the oil spilling, suggests an exposure to xenobiotics that form free radicals. Probably the antioxidant defense system is deficient, causing damages of the membranes and others cellular constituents. The histological analyses showed in the fishes exposed to the water-test in all the points and also in the analyzed concentrations, alterations in the gills such as aneurisms, lamellar fusion and necrosis. In the liver necrosis, leukocytes infiltration and melanomacrophage centers were observed. The results suggest that the area of the oil spilling was not totally bioremediated, and its upstream and downstream suffer from chronic contamination, due to adjacent industrial activity.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento industrial trouxe muitas comodidades ao homem, mas também contribuiu para a degradação ambiental, seja pela emissão de poluentes atmosféricos, contaminação do solo e da água ou ainda, por acidentes ambientais.

Os contaminantes liberados ao meio ambiente pela ação antrópica, de uma maneira geral, podem causar diversos tipos de danos aos organismos de um ecossistema, tais como comprometer os processos fisiológicos vitais como a respiração, reprodução e crescimento (Stegeman *et al.* 1991). Muitos desses poluentes além de apresentar toxicidade ainda persistem no meio ambiente, e podem vir a bioacumular na cadeia alimentar, colocando em risco à saúde humana.

Entre os contaminantes, destacam-se entre muitos outros, os metais pesados e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), sendo muitos deles reconhecidamente carcinogênicos (Pedrozo *et al.* 2002).

O petróleo, que é um dos insumos mais utilizados pelo homem, pode liberar diversas substâncias poluentes, podendo contaminar o meio ambiente durante a sua extração, transporte, armazenamento, refino e na queima para a produção de energia.

### 1.1 O Petróleo

O petróleo tem se tornado um dos principais contaminantes de vários ecossistemas, especialmente do ambiente aquático, onde cerca de 3,2 milhões de toneladas contaminam o ambiente marinho todos os anos (Pedrozo *et al.* 2002).

A composição química e a natureza física do petróleo podem variar significativamente, sendo constituído, geralmente, por uma mistura complexa de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos organometálicos, contendo principalmente níquel (Ni) e vanádio (V). Atualmente, já foram identificados mais de 270 tipos de hidrocarbonetos na composição dos diferentes derivados do petróleo (Pedrozo *et al.* 2002).

De forma geral, encontram-se três principais grupos de hidrocarbonetos no petróleo: parafínicos, naftênicos e aromáticos. Destes, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos, sobretudo os policíclicos aromáticos, devido ao seu potencial tóxico. Segundo Neff (1978), 75% dos constituintes do petróleo são os hidrocarbonetos de

cadeias longas e curtas, sendo que os de cadeia curta apresentam maior volatilidade, porém maior potencial tóxico aos organismos.

Muitos acidentes com derramamento de petróleo têm ocorrido por todo o mundo. O petróleo, uma vez liberado na água, espalha-se quase que imediatamente. Os componentes polares e de baixo peso molecular solubilizam-se e são lixiviados para fora da mancha de óleo; os componentes voláteis presentes na superfície da água sofrem evaporação, ao mesmo tempo que o óleo derramado se emulsifica na água, e parte dele se solubiliza formando a fração solúvel do petróleo em água (FSA) (ATSDR 1999).

A FSA é uma mistura complexa de PAHs, fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (Neff 1978, Akayshi *et al.* 2004). Segundo USEPA (1995), os peixes podem se expor ao óleo derramado por diferentes vias: pelo contato direto com a contaminação de suas brânquias ou pela ingestão de alimento contaminado. Os peixes expostos ao petróleo podem apresentar alterações cardíacas, respiratórias, hepatomegalia, redução no crescimento, diversas alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais, e a exposição crônica a alguns componentes do petróleo pode provocar anomalias genéticas e carcinoma em organismos aquáticos (Neff 1978, USEPA 1995, Pedrozo *et al.* 2002).

Entre os acidentes com derramamento de petróleo, pode-se citar, dentre outros, o vazamento de cerca de 2,8 milhões de litros de óleo combustível em manguezais na Baía de Guanabara – RJ no ano de 1997 e depois, em 2000 ocorreu mais um vazamento de mais 1,3 milhão de litros na mesma baía. Ainda no ano de 2000, ocorreu o derramamento de cerca de 4 milhões de litros de óleo bruto de petróleo de base parafínica, devido a uma ruptura da junta de expansão de uma tubulação da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR – Petrobrás). O vazamento atingiu uma porção de várzea denominado Arroio Saldanha, na cidade de Araucária – PR, este óleo derramado percorreu 1,8 mil metros até atingir ao Rio Barigui, estendendo-se por cerca de 5 quilômetros rio abaixo (Meniconi *et al.* 2002).

#### 1.4 Estresse Oxidativo

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias eletricamente instáveis, potencialmente reativas com moléculas biológicas e são capazes de causar oxidação e dano irreversível à célula. São espécies reativas de oxigênio, pois existem independentemente na ausência de um elétron não pareado na última órbita

atômica (Halliwell e Gutteridge 2000). São produzidos pelos diversos compartimentos celulares (mitocôndria, microsossomos, peroxissomos e citosol), e são originados de mecanismos enzimáticos como a xantina oxidase (XO), NADPH oxidase, citocromo P-450, e de mecanismos não enzimáticos, envolvendo hemeproteínas e compostos de ferro. Entre eles os mais conhecidos são: radical hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radical perhidroxil ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). O estresse oxidativo se dá quando o estado químico-biológico em que a produção destas espécies reativas ultrapassa a capacidade antioxidante (McCord, 1985). A produção normal de espécies reativas no metabolismo celular é proveniente da geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial, do mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido para causar morte em microorganismos, entre outros mecanismos associados.

Durante a degradação de xenobióticos pelo citocromo P450 (CYP450), pode ocorrer a formação do radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que ao ser dismutado pela enzima Superóxido Dismutase (SOD), gera peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que por sua vez, na presença de metais de transição (ferro e cobre) pode gerar o radical hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), e este reagir inespecificamente com constituintes celulares (Figura 1) (Lionel e Marta 2003).

As principais conseqüências ao estresse oxidativo em sistemas biológicos são:

1. Lipoperoxidação da membrana celular;
2. Oxidação de proteínas;
3. Lesão DNA/RNA celular.

A oxidação de proteínas decorre da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis, causando também agregação e fragmentação de aminoácidos. Os danos mais graves relacionados aos EROs são aqueles causados ao DNA e RNA, pois se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese (Barreiros *et al.* 2006). A cisão do anel desoxirribose dos ácidos nucléicos, pelos radicais livres, promove mutações e inibição da síntese protéica (Oliveira 1999). As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema biológico são desintoxicadas por mecanismos de defesa antioxidante que são encontrados em todas as espécies de animais e nos diferentes tipos de tecidos, inclusive nos organismos aquáticos (Avci *et al.* 2005).

### 1.3 Biomarcadores

Segundo Walker *et al.* (1996), os biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, o efeito e, em alguns casos, o grau de contaminação. Após introduzida a substância química no ambiente, os organismos expostos podem incorporar o contaminante por diversas vias de absorção. Uma vez absorvidos, os poluentes atuam em locais de ação que representam seu mecanismo molecular de toxicidade (Klemz, 2002). A interação deste poluente com um receptor, a uma enzima ou ao próprio material genético, podem resultar efeitos moleculares que, por sua vez, levam a efeitos fisiológicos. Estes efeitos podem afetar a espécie em questão, interferindo no sucesso reprodutivo ou em relações interespecíficas, causando alterações na dinâmica populacional (Stegeman e Lech 1991). Desta forma, os efeitos da contaminação ambiental podem ser observados na comunidade e, conseqüentemente, todo o ecossistema pode ser negativamente afetado.

Os efeitos iniciais dos poluentes são observados nas respostas bioquímicas e moleculares, ou seja, no nível bioquímico celular, desta forma, as alterações dos poluentes podem ser reversíveis, e assim, medidas preventivas podem ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente (Huggett *et al.* 1992).

A avaliação ambiental possibilita a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas a evitar ou mitigar danos ambientais diretos ou indiretos. A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais ou através da medida de parâmetros biológicos (Amorim 2003).

Os biomarcadores podem ser classificados em diferentes classes:

1. Biomarcadores de exposição: são aqueles que indicam exposição a um poluente, mas não provêm informação sobre o grau de adversidade do efeito que esta alteração provoca (Walker *et al.* 2001). Um exemplo de um biomarcador específico de exposição é a indução de metalotioneínas devido à contaminação por metais. Estas proteínas têm um papel na desintoxicação e em certa tolerância a metais (Lagadic *et al.* 1994).
2. Biomarcadores de efeito: são aqueles que realmente demonstram o efeito adverso de um químico em particular, ou um grupo de químicos, sobre o organismo. Inibição da acetilcolinesterase (AChE), por exemplo, é considerada um importante biomarcador de efeito, pois bloqueia a passagem do impulso nervoso pelo acúmulo de acetilcolina.

#### 1.4 Biotransformação de Xenobióticos - EROD

A biotransformação ou desintoxicação de xenobióticos se dá normalmente em duas fases. A fase I consiste em reações de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação destas substâncias reativas, provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas do organismo como substâncias inertes (Siroká e Drastichová 2004)..

O citocromo P450 (CYP450) representa a principal via metabólica de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas e fazem parte do sistema de oxidases de função múltipla (MFO) (Lin e Lu 1998). Tais monooxigenases participam tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, e inúmeros tipos de xenobióticos. Essas reações ocorrem, principalmente, no fígado; contudo existe expressão em menor grau por todo o organismo, incluindo intestino, pulmão e rim, entre outros (Nebert 1991, Di Giulio *et al.* 1993). A subfamília CYP1A é responsável pela desintoxicação de diversas substâncias poluentes, tais como os PAHs. As MFOs são constituídas pelos seguintes componentes: NADPH e a enzima NADPH citocromo P450 redutase, citocromo b<sub>5</sub> e a enzima citocromo b<sub>5</sub> redutase, além do próprio CYP450 (Bucheli e Fent 1995, Regoli *et al.* 2005).

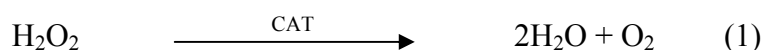
O receptor que regula a expressão gênica do CYP1A é conhecido como receptor Ah (hidrocarboneto aromático). A indução é iniciada pela ligação do xenobiótico a um complexo protéico que compreende o Ah complexado com a proteína 90 (*heat shock p 90 – hsp90*) com o xenobiótico, que depois da hsp90 se dissociar deste complexo receptor-indutor, o produto formado se liga a uma enzima chamada ARNT (hidrocarboneto aromático nuclear transferase), e todo este complexo é transferido para o interior do núcleo celular, promovendo a transcrição do RNAm (Stegeman e Hann 1994, Buchelli e Fent 1995). A indução das isoenzimas do CYP450 é uma resposta sensível a determinados xenobióticos, podendo ser utilizado como biomarcador.

Entre as subfamílias de interesse a ser utilizado como biomarcador destaca-se a CYP1A1, que pode ser medido através da atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e esta tem sido bastante utilizada para avaliar a exposição de organismos aquáticos à poluentes ambientais, tais como os PAHs, as bifenilas policloradas (PCBs) e os policlorinados dibenzofuranos (PCDF) (Payne *et al.* 1987, Bucheli e Fent 1995, Rocher *et al.* 2006). A EROD catalisa uma reação de *O*-desalquilação, dependente de

NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina, o produto formado na reação, a resorufina, pode ser medido por espectrofluorímetro (Stegeman e Hann 1994).

### 1.5 Catalase

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica que é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em oxigênio e água (Equação 1), foi proposto por vários pesquisadores que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (Mallick e Rai 1999).



O mesmo autor relata que a CAT é a única, entre as enzimas degradantes de  $H_2O_2$ , que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse. A atividade da catalase está associada com os peroxissomos ou pequenos corpos que estão associados ao metabolismo de ácidos graxos. Durante a oxidação do ácido graxo peroxissomal é produzido  $H_2O_2$ , e a CAT atua degradando esse peróxido a fim de evitar que o mesmo venha a formar  $OH^{\bullet}$  que pode vir a causar danos às membranas (Hugget *et al.* 1992).

### 1.6 Glutathione S-transferase

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima essencial para a proteção aos danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (George 1993; Marionnet *et al.* 2006).

A GST catalisa a conjugação da glutathione a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação (Figura 1). Diversas GSTs foram caracterizadas em animais, associadas a metabolização de compostos xenobióticos e toxinas. Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutathione reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides; atuam



com peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo (Dixon e Laphorn 2002).

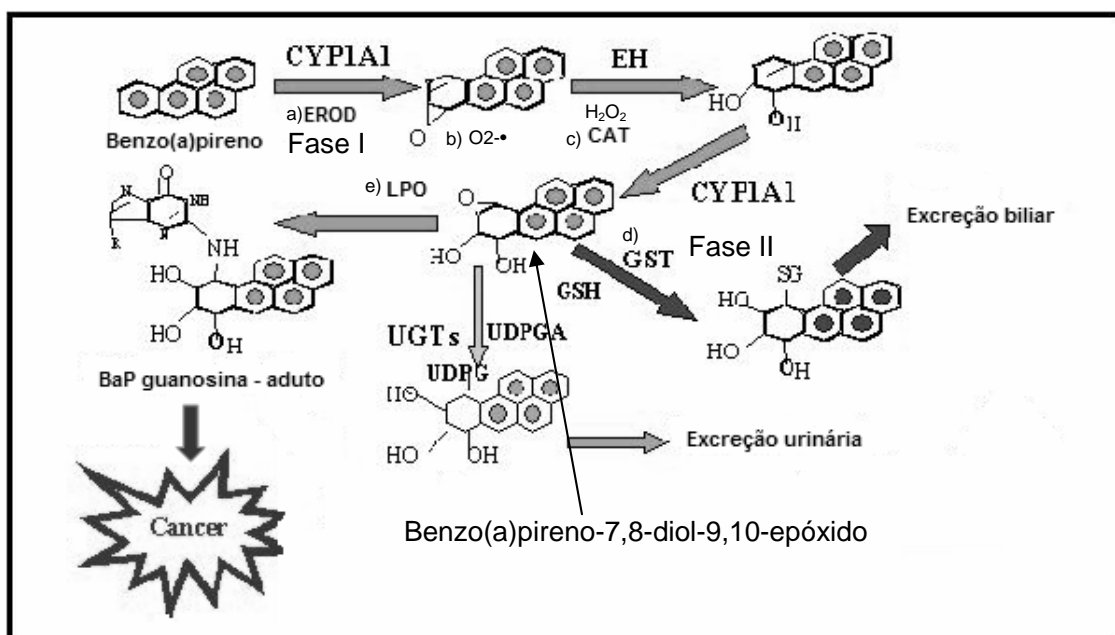
As GSTs são codificadas por uma superfamília de genes, cada uma produzindo isoenzimas com ampla especificidade de substratos. Apesar de catalisarem reações similares, as GSTs possuem pouca identidade de seqüência de aminoácidos, e estão presentes no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutationa em uma variedade de compostos (Riol *et al.* 2000). Segundo George (1993), as GSTs solúveis são classificadas em quatro grupos:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  e  $\theta$ , sendo que o grupo  $\alpha$ , existente no fígado, é de grande importância para a desintoxicação de substâncias provenientes da fase I promovida pelo gene P4501A1.

### 1.7 Lipoperoxidação

O estresse oxidativo pode causar a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares com formação de novos radicais livres. A peroxidação lipídica, ou lipoperoxidação (LPO), é um dos danos mais importantes causados pelas EROs, sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A peroxidação dos ácidos graxos da membrana inicia-se através da retirada de prótons  $H^+$  do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, com posterior produção de dienos conjugados e formação de hidroperóxidos lipídicos. Com a participação de metais catalíticos (ferro e cobre) há decomposição dos hidroperóxidos e formação de outras espécies reativas mais deletérias à célula, como o radical alcóxil ( $RO\cdot$ ) e peróxil ( $ROO\cdot$ ) (Oliveira 1999).

As EROs, reagindo com os lipídios presentes nas membranas causam, entre outros, a perturbação ou destruição da função das membranas das células e organelas essenciais, incluindo o processo de transporte de nutrientes, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (Meagher e Fitzgerald 2000). Em consequência da lipoperoxidação, há perda de integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade; alteração no fluxo de íons transmembrana; disfunção no transporte de  $Na^+/K^+$ , influxo excessivo de cálcio e posterior ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases, que autoliticamente produzem colapso das estruturas celulares e oxidação de proteínas. Ainda, a alteração da fluidez da membrana ao alterar as trocas iônicas podem acarretar o

influxo excessivo de cálcio, o qual ativa enzimas autolíticas causando proteólise e morte celular (Oliveira 1999; Meagher e Fitzgerald 2000; Barreiros *et al*, 2006).



**Figura 1.** Esquema simplificado de biotransformação do benzo(a)pireno e uso de biomarcadores bioquímicos. **a)** Fase I: enzimas do citocromo P450, por exemplo, EROD iniciam processo de oxidação do xenobiótico. **b)** Durante o processo de biotransformação ocorre geração do íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que é dismutado gerando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). **c)** A catalase (CAT) atua degradando o  $H_2O_2$  formado. **d)** Fase II: reação enzimática, a qual se conjuga a glutatona utilizando, por exemplo a GST, para eliminação do organismo por excreção biliar, ou por excreção urinária, através de reação da substância a ser eliminada, com a uridilglucoronil transferase (UGTs). **e)** Em caso de deficiência do sistema antioxidante, pode ocorrer a peroxidação lipídica (LPO) com formação de hidroperóxidos. Como a substância formada é, normalmente, mais reativa que a original, como o benzo(a)pireno-7-8-diol9,10epóxido, pode ligar-se com o DNA e formar aduto (quebra) de DNA e desencadear o início do processo de formação do câncer. Adaptado de Lionel e Marta (2003).

### 1.8 Colinesterase

O termo colinesterase (ChE) é geralmente utilizado para referir-se as atividades das “pseudocolinesterases” ou butirilcolinesterase e também a atividade da acetilcolinesterase (AChE) ou “colinesterase verdadeira”. Estas duas enzimas diferem na afinidade pelo substrato, bem como na velocidade de degradação deste e em sua

localização e concentração em uma determinada espécie (Nicareta 2004). Em peixes, a butirilcolinesterase está localizada principalmente no soro e tem como especificidade a hidrólise da propionilcolina e butirilcolina, enquanto a acetilcolinesterase é encontrada no músculo, cérebro e eritrócitos e tem afinidade em hidrolisar a acetilcolina (Ach) que é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (Goodman e Gilman 1996; Range e Dale 2000; Klemz 2002).

A inibição da AChE por poluentes tem sido amplamente estudada e já foi considerada um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados (OP), porém outros estudos tem indicado que outras substâncias como metais pesados, organoclorados e PAHs também podem vir a inibi-la (Payne *et al.*, 1996; Martinez-Tabche *et al.*, 1997; Akaishi *et al.* 2004), mas a concentração necessária para promover este efeito é relativamente mais alta (Sturm *et al.* 1999). Essa inibição causada pelo anticolinesterásicos pode ser reversível ou irreversível. Compostos organofosforados, por exemplo, formam um complexo inibidor enzimático muito estável e que não sofre dissociação espontânea significativa, e desta forma, a enzima fica permanentemente fosforilada e a recuperação de sua atividade depende da síntese de nova enzima (Adams 1992; Goodman e Gilman 1996; Range e Dale 2000).

A AChE é muito importante à manutenção e equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos, pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que é transformado em colina e acetato que reage com uma molécula de água e produz ácido acético, e por fim a enzima é reativada e a fração colina é prontamente reabsorvida por um processo de transporte sódio-dependente (Habig e Di Giulio 1991; Adams 1992; Beyers e Sikoski 1994; Klemz 2002). Quando a atividade da AChE é inibida ocorre um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, o que pode paralisar algumas funções vitais do organismo (Stenesh 1998).

## 1.9 Histopatologia

A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição à estressores no indivíduo, representando um nível intermediário de organização biológica (Akaishi *et al.* 2004, Mela 2004). Segundo Myers e Fournie (2002), as lesões detectadas em tecidos ou órgãos representam uma integração dos efeitos cumulativos dos agentes estressores a nível bioquímico e fisiológico. Essas lesões podem refletir os efeitos resultantes da exposição a um ou vários xenobióticos

(Hinton *et al.* 1992). O uso dos biomarcadores morfológicos em avaliação ambiental permite detectar os efeitos agudos e crônicos de exposição dos indivíduos à xenobióticos, pois permite avaliar seus efeitos diretamente ao nível das células e tecidos, em contraste aos biomarcadores bioquímicos, que detectam os efeitos do agente tóxico a nível de enzimas e proteínas (Hinton *et al.* 1992).

Segundo Akayshi *et al.* (2004), os biomarcadores morfológicos juntamente com os parâmetros bioquímicos permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes.

## 1.10 Objetivo Geral

Avaliar, através de análise química da água e de bioensaio, a qualidade da água do Arroio Saldanha após cinco anos do derramamento de petróleo através de biomarcadores de contaminação ambiental.

### 1.10.1 Objetivos Específicos

Verificar a presença de poluentes nas águas do Arroio Saldanha, ponto zero do derramamento de petróleo e, à sua montante e à sua jusante, através de análises químicas da água.

Avaliar em *Astyanax* sp. expostos por 96 h às águas do Arroio Saldanha, ponto zero do derramamento de petróleo e, à sua montante e à sua jusante:

- O estresse oxidativo através de análises da CAT, GST e LPO.
- A neurotoxicidade através da análise de acetilcolinesterase.
- A indução metabólica através da análise de EROD.
- O comprometimento estrutural das brânquias e fígado através de análises histopatológicas.

## 2. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS CINCO ANOS DE  
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO EM ARAUCÁRIA, BRASIL

(Artigo a ser enviado à publicação na revista Archives of Environmental Contamination and Toxicology, segundo normas em anexo, com adaptações).

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos podem se constituir o destino final de diversos poluentes oriundos da atividade antrópica. Rios em ambiente urbano recebem diariamente diversos tipos de substâncias, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) que afetam a comunidade biótica, diminuindo sua população e, podendo levar à extinção de muitas espécies. Acidentes ambientais, como o derramamento de cerca de quatro milhões de litros de petróleo ocorrido no ano 2000 no Arroio Saldanha, afluente do rio Barigui - Brasil, já em franco estado de degradação, agrava ainda mais a problemática ambiental.

Atualmente, a poluição com óleo de petróleo tem se tornado uma preocupação global nos ecossistemas aquáticos. O petróleo ou seus derivados, após atingir o ambiente aquático, pode passar por diferentes processos que determinam o impacto sobre o ecossistema, como a evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, biodegradação e absorção pela biota (Saeed e Mutairi 1999; Akaishi *et al.* 2004). O petróleo é constituído por cerca de 75% de hidrocarbonetos, destes os de cadeias curtas são os mais voláteis, mas apresentam o maior potencial tóxico aos organismos, sendo que os PAHs são substâncias lipossolúveis e algumas delas potencialmente carcinogênicas (Neff 1978; Brauner *et al.* 1999; Pedrozo *et al.* 2002).

Os biomarcadores são respostas biológicas mensuráveis e têm sido largamente utilizados como ferramentas para se avaliar a exposição a poluentes ambientais (Walker *et al.* 1996, Regoli *et al.* 2005, Rocher *et al.* 2006). As alterações histopatológicas, juntamente com os parâmetros bioquímicos, permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos aos agentes estressores, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes (Akaishi *et al.* 2004).

A indução das monooxigenases do CYP450 é uma ferramenta para se avaliar os efeitos do petróleo sobre os organismos aquáticos, especialmente em peixes (Payne e Penrose 1975; Andersson e Förlin 1992; Livingstone 1993), pois tem se mostrado como uma resposta biológica bastante sensível aos PAHs (Regoli *et al.* 2005, Rocher *et al.* 2006). Entretanto, também poderá haver resposta do CYP450, em geral do CYP1A, à exposição a outros poluentes antropogênicos, tais como os PCBs, os policlorinados dibenzofuranos (PCDF) e dibenzodioxinas (Stegeman e Hann 1994). A exposição a esses xenobióticos estimula a taxa de transcrição do gene CYP1A, resultando no aumento de níveis específicos do mRNA, sendo esta mais alta em peixes tratados com

hidrocarbonetos aromáticos não halogenados, refletindo em metabolismo mais rápido destes compostos quando comparado aos PAHs, onde a taxa metabólica é mais baixa (Courtenay *et al.* 1993, Van der Widen *et al.* 1993).

Os PAHs e metais pesados também estão associados à formação de radicais livres podendo gerar estresse oxidativo (Di Giulio *et al.* 1993, Machella *et al.* 2004, Stephensen *et al.* 2003, Barreiros *et al.* 2006, Srivastava *et al.* 2006, Sturve *et al.* 2006, Park *et al.* 2006). Espécies reativas de oxigênio (EROs), tal como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), podem ser produzidas durante o processo de desintoxicação de xenobióticos. Além disso, a presença de metais de transição como o  $Fe^{2+}$ , pode catalisar a formação do radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) a partir de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e este reagir inespecificamente com alvos celulares tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (Henriques 2004, Barreiros *et al.* 2006), sendo a catalase (CAT) uma enzima importante na degradação desta  $H_2O_2$  formada (Yu 1994). A reação de conjugação realizada por enzimas tal como a glutathione S-transferase (GST) é importante às células, pois atuam na hidrólise de substâncias lipofílicas, às quais podem ser excretadas como substâncias inertes no organismo (George 1993, Hermes-Lima 2004). Deficiência no sistema antioxidante dos organismos pode levar a aumento de hidroperóxidos, onde estes, por conseguinte, podem provocar a lipoperoxidação e danificar estruturas celulares (Regoli *et al.* 2005).

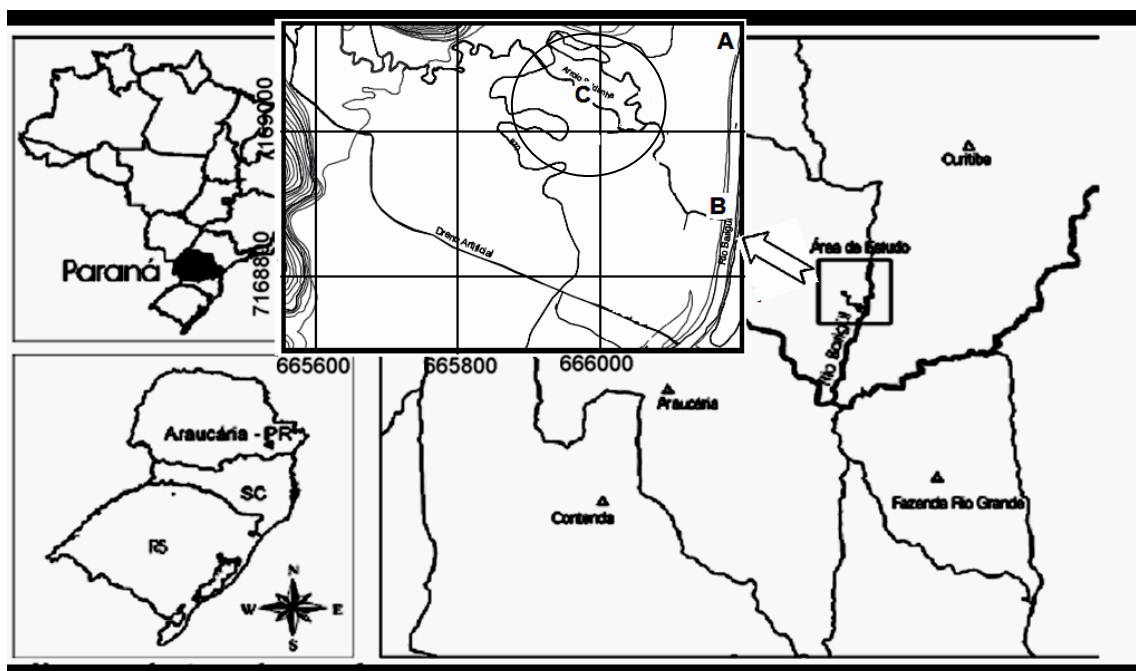
Diversos compostos, tais como metais pesados, organofosforados (OP), carbamatos e detergentes podem inibir a AChE (Galgani *et al.* 1992, Schmidt e Ibrahim 1994, Sturm *et al.* 1999). Porém, outros estudos também têm mostrado que os constituintes de óleo de petróleo, sobretudo os PAHs podem causar inibição da AChE (Nikunen 1985, Payne *et al.* 1996, Martinez-Tabche *et al.* 1997, Akaishi *et al.* 2004) e levar a danos ecológicos, tais como diminuição na taxa de reprodução e comprometer a sobrevivência da espécie.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através de bioensaio e da análise química da água, a qualidade da água do Arroio Saldanha após cinco anos do derramamento de petróleo através de biomarcadores de contaminação ambiental.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Área de Estudo

O Arroio Saldanha está localizado na cidade de Araucária, Estado do Paraná – Brasil (Figura 2). Possui cerca de dois mil metros de extensão de planície inundável, e é considerado o ponto zero do acidente de derramamento de petróleo ocorrido em julho de 2000, tendo recebido em suas várzeas cerca de quatro milhões de litros de petróleo, sendo este constituído por 71 % de hidrocarbonetos saturados, 18% de compostos aromáticos, entre estes os PAHs, sendo o fluoreno um dos policíclicos aromáticos mais abundantes (Meniconi *et al.* 2002), e metais pesados, como o Hg. As regiões à montante e à jusante do local do derramamento de petróleo, situadas no Rio Barigui, sofrem influência da área industrial adjacente, o que compromete ainda mais a qualidade da água desta região.



**Figura 2.** Localização da Área de estudo. **A:** Montante do local do derramamento de petróleo – Rio Barigui (666.169 – 7.169.169). **B:** Jusante do local do derramamento de petróleo – Rio Barigui (666.171 – 7.168.861). **C:** Arroio Saldanha, tributário do Rio Barigui, ponto zero do acidente com derramamento de cerca de quatro milhões de litros de petróleo ocorrido no ano de 2000 (665.939 – 7.169.061). Coordenadas em UTM. Fonte: Barddal *et al.* 2004.



### 2.2.2 Animais

*Astyanax* sp. O gênero *Astyanax* pertence à família Characidae e sub-família Tetragonopterinae, da ordem Characiformes. É um peixe dulcícola, amplamente distribuído no Brasil. É de pequeno porte (5 – 15 cm) e apresenta grande valor ecológico como espécie forrageira (Gerry 1977, Godoy 1975). Indivíduos adultos de *Astyanax* sp. foram coletados do criadouro comercial Parque Costa, localizado em Curitiba – Brasil e aclimatizados em água filtrada no laboratório por 15 dias antes do experimento. A temperatura foi mantida em ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ ) com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial (Alcon Guppy).

### 2.2.3 Desenho Experimental

*Coleta de água.* A água teste foi coletada em novembro de 2005, seguindo os protocolos descritos por IAP (2004e), em três pontos: no Arroio Saldanha, tributário do Rio Barigui, ponto zero do derramamento de petróleo e, à sua montante e à sua jusante, situados no próprio Rio Barigui (Figura 2). Foi levada ao laboratório e dividida em duas concentrações: A primeira com 50% de água teste e 50% de água reconstituída com 0,0065 g/L de  $\text{CaCl}_2$ , 0,1335 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,0004 g/L de KCl e 0,0105 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , pH entre 7,2 e 7,3. A segunda concentração foi de 100% de água teste. Após foram acondicionadas em aquário e aeradas. O aquário com o grupo controle recebeu apenas água reconstituída. A água coletada nos três locais foi submetida à análise química de hidrocarbonetos, PAHs, metais e surfactantes.

*Exposição dos animais.* 140 indivíduos de *Astyanax* sp. foram divididos em sete grupos de dois aquários de 12 litros de água cada com 10 animais por aquário, no total de 20 indivíduos para cada grupo a ser testado (controle, Arroio Saldanha 50% e 100%, montante 50% e 100% e jusante 50% e 100%). Os peixes ficaram expostos por 96 h nas mesmas condições da aclimatização (fotoperíodo e temperatura), com exceção de que os animais não foram alimentados durante o experimento. Após 96 h, os indivíduos foram colocados em aquário com água e solução alcoólica de benzocaína a 2% para serem anestesiados. Posteriormente, foram medidos, pesados e sacrificados por secção medular. De cada exemplar, foi coletado o segundo arco branquial direito e fragmentos

do fígado para análises histopatológicas por microscopia de luz. Para análise dos biomarcadores bioquímicos etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST), lipoperoxidação (LPO) pools com dois ou três fragmentos de fígados foram coletados e imediatamente submersos em nitrogênio líquido para posterior análise. Um fragmento de músculo dos peixes foi coletado para avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE).

#### 2.2.4 Análise Química da Água

*PAHs e Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs)*: 100 mL das amostras de águas teste foram extraídos em sistema de extração em fase sólida e o eluato concentrado à temperatura de 44° C até 0,5 mL e completado o volume para 1,0 mL com acetato de etila (IAPc 2004). A concentração dos hidrocarbonetos e os PAHs foi determinada através do Sistema Varian Saturno 2000 GC-MS, com Cromatógrafo Varian 3600, detector de massa ION-TRAP. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

*Metais*. Para análise de metais, 100 mL das amostras de águas teste foram digeridas em ácido nítrico concentrado sob aquecimento (IAPa 2004), foram preparadas soluções estoques padrões de 1000 mg/L dos metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn) para posterior curva de calibração. As concentrações dos metais foram determinadas utilizando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica AA-20 Plus-Varian. Para a determinação de mercúrio (Hg), foram adicionados a outra alíquota de 100 mL das amostras de águas teste, ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico concentrado e permanganato de potássio a 5% e deixado repousar. Após, foi adicionado persulfato de potássio a 5% e deixado em banho-maria a 65-70° por 2 h, onde foi adicionado cloridrato de hidroxilamina a 3%, em seguida lido em espectrofotômetro com gerador de vapor VGA-76 (IAPb 2004). Os valores foram expressos em  $\text{mg.L}^{-1}$ . As análises foram realizadas no Laboratório de Absorção Atômica do Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

*Surfactantes*. 250 mL das amostras de águas teste foram tratadas com solução 1,0 M de NaOH e posteriormente neutralizadas com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Após, foi adicionado à

amostra solução de azul de metileno e feito a extração das substâncias surfactantes com clorofórmio, e preparado uma solução padrão de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de dodecil sulfato de sódio (DDS) para posterior curva de calibração (IAPd 2004). A determinação da concentração dos surfactantes foi feita em Espectrofotômetro UV – VIS a 652 nm. Os resultados foram expressos em  $\text{mg.L}^{-1}$  de DDS. As análises foram realizadas no Laboratório de Físico Química do Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

#### 2.2.5 Biomarcadores Bioquímicos

*Extração enzimática.* As amostras de músculo e fígados foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M com pH 7,5 e pH 6,5 respectivamente e, em seguida centrifugadas a  $10000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante do músculo foi utilizado para realizar a análise de AChE, enquanto o do fígado para as análises de EROD, CAT, GST e LPO.

*Etoxiresorufina-O-deetilase.* A atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) foi medida segundo o método de Burke e Mayer (1974), modificado por Silva de Assis (1998). O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-de-etilação. A medida da intensidade da fluorescência correspondeu à concentração da resorufina produzida por unidade de tempo. A reação foi medida no espectrofluorímetro Shimadzu (excitação 530nm, extinção 590 nm). Os resultados foram expressos em  $\text{pmol/min/mg}$  proteína.

*Acetilcolinesterase.* A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida de acordo com Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O reagente de cor DTNB-5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e o substrato iodeto de acetiltiocolina foram adicionadas às amostras e lidas a 415 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol/min/mg}$  proteína.

*Catalase.* A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984) em comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/min/mg}$  proteína.

*Glutathione S-transferase.* A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida em 340 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN de acordo com o método de Keen et al. (1976), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH) como substrato. A atividade foi expressa em *nmol/min/mg* proteína.

*Lipoperoxidação.* A análise de lipoperoxidação (LPO) foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos do ensaio FOX (Jiang *et al.* 1992). Em microplaca foram adicionados à amostra, xilenol orange, ácido sulfúrico, hidroxitolueno butilado (BHT) e sulfato ferroso amoniacal, todos em solução de metanol a 90% do volume final da solução reação. Após 30 minutos, as amostras foram lidas a 560 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos *mmol/min/mg* proteína.

*Proteína.* A concentração de proteína foi medida de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

## 2.2.6 Histopatologia

*Microscopia de luz.* As amostras de brânquias e fígado foram fixadas em ALFAC (álcool a 80%, formaldeído a 40% e ácido acético a 5%), desidratados em séries gradativas de etanol e emblocados em Paraplast. Foram cortados à espessura de 5  $\mu$ m e corados com hematoxilina e eosina, sendo avaliado todo o material corado. As imagens foram obtidas através do fotomicroscópio Axiophot ZEISS.

*Índices histopatológicos.* As alterações encontradas nas brânquias e fígado foram avaliadas pelo método descrito por Bernet *et al.* (1999), onde essas alterações receberam fatores de importância patológica (Tabela 1) de acordo com sua reversibilidade, sendo **1** para lesões reversíveis, **2** para lesões reversíveis, em alguns casos e, **3** para lesões irreversíveis. Para o grau de ocorrência também foram atribuídos valores que variaram de 0 (ocorrência inexistente) a 6 (ocorrência severa). O índice foi calculado de acordo com a equação 2:

$$I = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w) \quad (2)$$

Onde,  $I$  é o índice histopatológico,  $pr$  é o tipo da alteração no órgão,  $alt$  é a alteração,  $a$  é o valor de escore da ocorrência para uma alteração específica do órgão,  $w$  é o fator de importância para a referida alteração.

**Tabela 1.** Alterações histopatológicas observadas e seus respectivos fatores de importância.

Órgão	Tipo de alteração ( $pr$ )	Fator de importância ( $w$ )
<i>Brânquias</i>	Alterações estruturais	1
	Aneurisma	1
	Necrose	3
<i>Fígado</i>	Melanomacrófagos	1
	Infiltração leucocitária	2
	Necrose	3

### 2.2.7 Análise Estatística

Os dados numéricos obtidos das análises dos biomarcadores bioquímicos, e dos índices histopatológicos de brânquias e fígado dos *Astyanax* sp. dos grupos controle e testes, foram avaliados através da análise de variância – ANOVA critério único, seguido pelo teste de Tukey. A regra de decisão ( $\alpha$ ) foi de 0,05 para todos os testes aplicados.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Taxa de Mortalidade, Peso e Comprimento

A taxa de mortalidade dos organismos expostos após 96 h variou de 0 a 10% para todos os grupos e concentrações, exceto para o grupo de concentração de 50% do Arroio Saldanha onde a taxa foi de 20%. A média  $\pm$  desvio padrão do peso e do comprimento total dos indivíduos foi de  $11.70 \pm 3.45$  g e  $9.39 \pm 0.80$  cm, respectivamente.

### 2.3.2 Análise Química da Água

Na água coletada para o bioensaio do Arroio Saldanha foram encontrados fluoreno e criseno, PAHs provenientes de fontes de petróleo, surfactantes e metais potencialmente carcinogênicos, tal como mercúrio (Tabela 2). Outros metais, PAHs e surfactantes também foram constatados nas águas à montante e à jusante do local de derramamento de petróleo (Tabela 2).

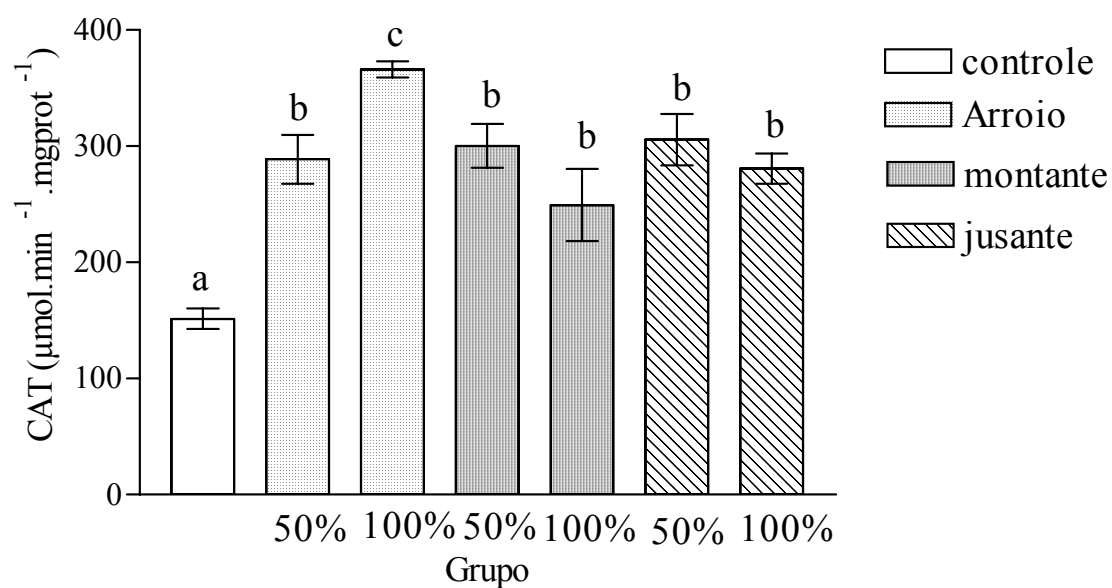
### 2.3.3 Biomarcadores Bioquímicos

A atividade da 7-etoxiresorufina do fígado de *Astyanax* sp., não foi induzida em nenhum dos grupos testes em relação ao controle ( $P > 0,05$ ). Houve aumento significativo na atividade específica da catalase ( $P < 0,0001$ ) para todos os grupos em relação ao controle e entre os grupos de concentração de 50% e de 100% (Figura 3).

**Tabela 2.** Análise química da água coletada para a realização do bioensaio.

Parâmetro	A. Saldanha	Montante	Jusante	Limites <sup>3</sup>
<i>Hidrocarbonetos*</i>				
Hidrocarbonetos Totais (TPHs)	<100,00	<100,00	<100,00	<100,00
<i>PAHs *</i>				
Acenafteno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Acenaftileno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Antraceno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Benzo(a)antraceno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Benzo(a)pireno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	0,70
Benzo(b)fluoranteno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	24,34	***
Benzo(g,h,i)perileno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Benzo(k)fluoranteno <sup>2</sup>	<1,00	49,56	<1,00	***
Criseno <sup>1</sup>	5,06	<1,00	<1,00	***
Dibenzo(a,h)antraceno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Fenantreno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Fluoranteno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Fluoreno <sup>1</sup>	11,99	<1,00	<1,00	***
Indeno(1,2,3cd)pireno <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Naftaleno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Pireno <sup>1</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	***
Σ PAHs	17,05	49,56	24,34	
<i>Metais**</i>				
As	<0,005	<0,005	<0,005	0,033
Cd	<0,002	<0,002	<0,002	0,01
Pb	<0,01	<0,01	<0,01	0,033
Cu	<0,008	<0,008	<0,008	0,013
Cr	0,04	<0,02	<0,02	0,05
Fe	1,93	1,07	0,93	5,00
Mn	0,126	0,13	0,042	0,50
Hg	0,0017	<0,001	<0,001	0,002
Ni	0,02	<0,02	0,02	0,025
Zn	<0,03	0,18	0,09	5,00
Σ metais	2,12	1,38	1,08	
<i>Surfactantes**</i>	0,13	0,60	0,77	0,50

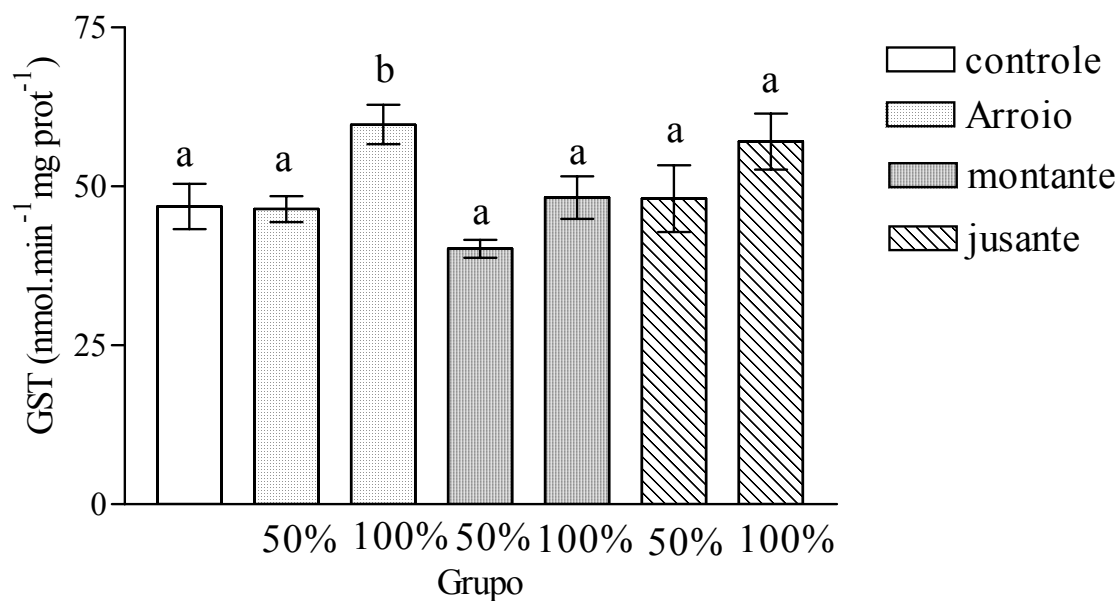
\*Concentração expressa em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . \*\*Concentração expressa em  $\text{mg.L}^{-1}$ . \*\*\*Não contemplado pela legislação vigente. **1:** Compostos provenientes de fontes de petróleo, **2:** Compostos pirogênicos; fontes dos compostos de acordo com Page *et al.* 1999. **3:** Limites de acordo com a Resolução CONAMA 357/05 para rio classe 3 (BRASIL 2005).



**Figura 3.** Atividade específica da catalase (CAT) de *Astyanax* sp. expostos às águas teste. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (teste de Tukey).  $P < 0,0001$  para os grupos avaliados por análise de variância.

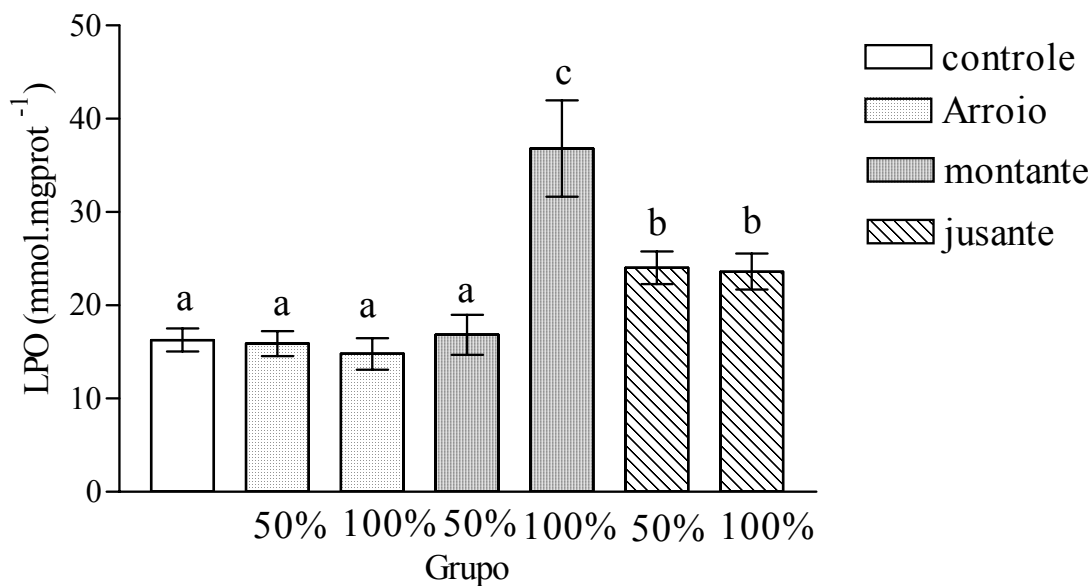
A atividade específica da Glutathione S-Transferase (GST) aumentou ( $P < 0,05$ ) somente no grupo de concentração de 100% de água teste do Arroio Saldanha (Figura 4). Para os demais grupos não houve aumento significativo ( $P > 0,05$ ).





**Figura 4.** Atividade específica da Glutathione S-Transferase (GST) de *Astyanax* sp. expostos às águas teste. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (teste de Tukey).  $P < 0,05$  para os grupos avaliados por análise de variância.

A concentração de hidroperóxidos (LPO) aumentou no grupo à jusante do derramamento de petróleo na concentração de 50% ( $P < 0,05$ ) e 100 % ( $P < 0,0001$ ) de água teste em relação ao controle, enquanto que a Montante do ponto de derramamento de petróleo somente para a concentração de 100% de água teste ( $P < 0,0001$ ) (Figura 5).

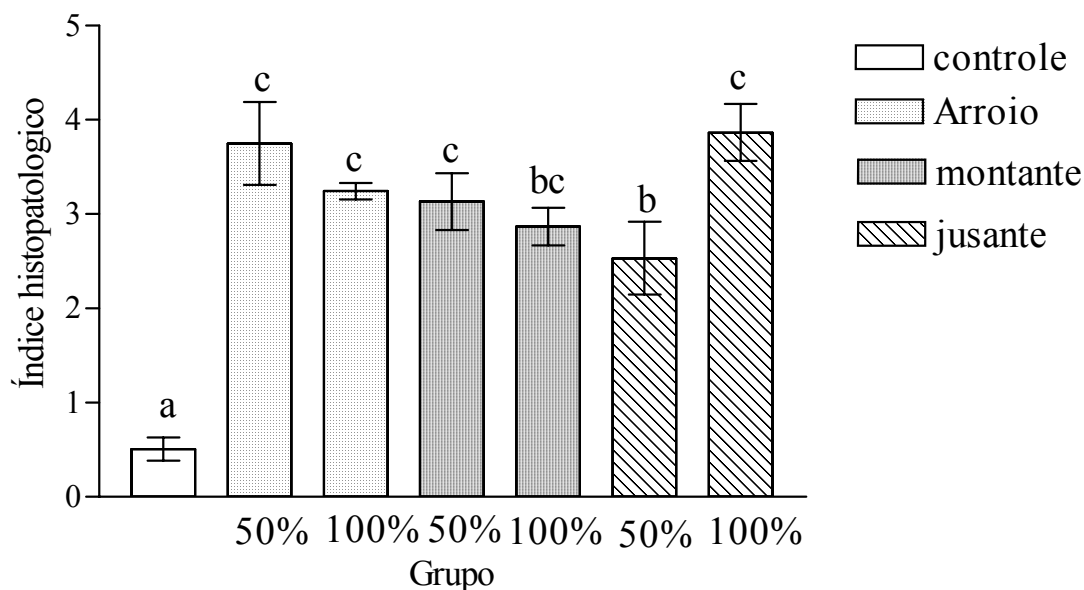


**Figura 5.** Concentração de hidroperóxidos de *Astyanax* sp. expostos às águas teste. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (teste de Tukey).  $P < 0,0001$  para os grupos avaliados por análise de variância.

Não foi observado inibição da acetilcolinesterase (AChE) em nenhum dos grupos testados em nenhuma das concentrações ( $P > 0,05$ ), supondo não haver neurotoxicidade.

#### 2.3.4 Histopatologia

Diversas alterações nas brânquias dos peixes expostos às concentrações da água teste foram observadas, obteve-se um aumento ( $P < 0,0001$ ) nos índices histopatológicos em todos os grupos experimentais (Figura 6). Entre as alterações encontradas (Tabela 3), destacam-se aneurisma, fusão lamelar e necrose para todos os grupos avaliados (Figura 7).

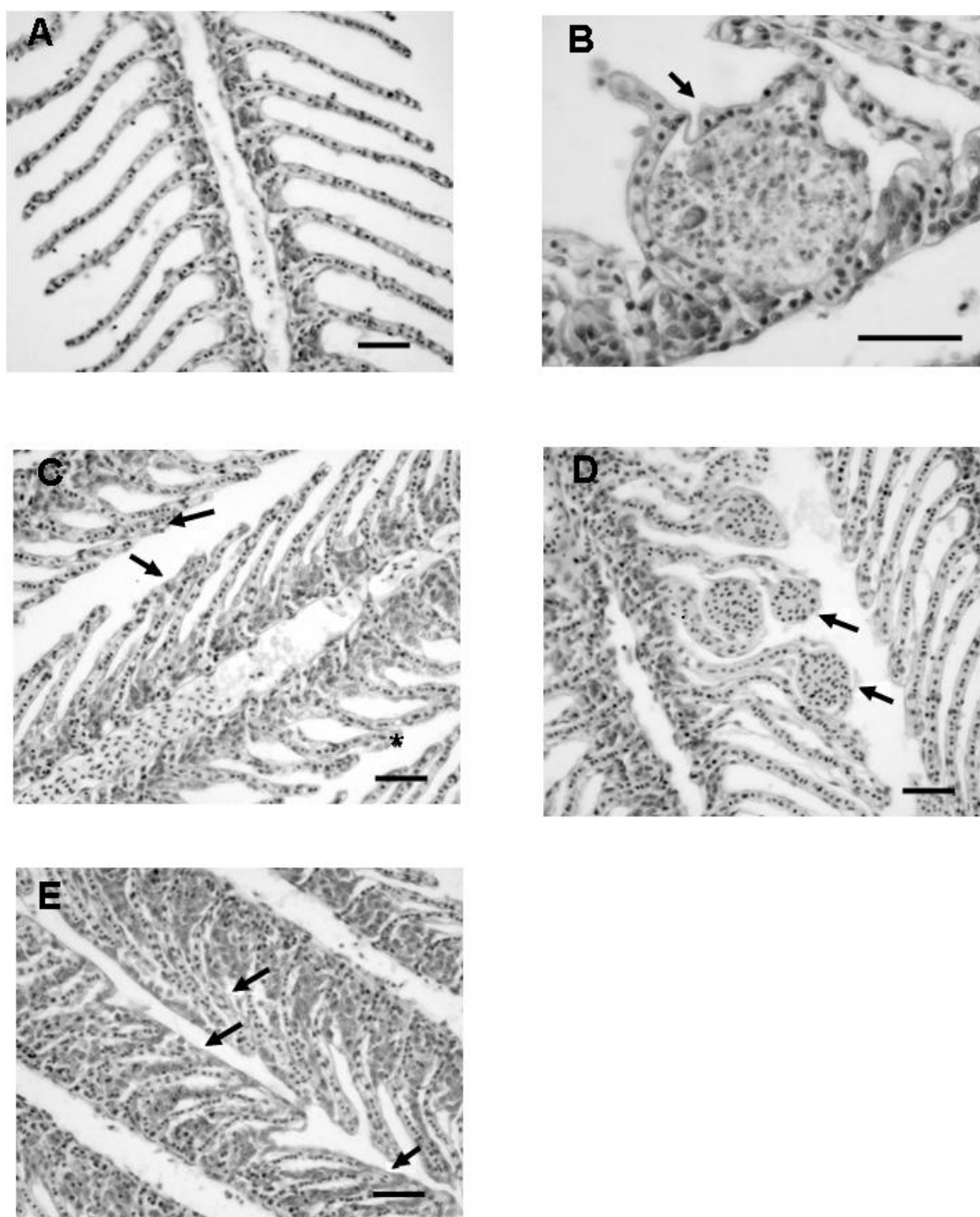


**Figura 6.** Índice de lesões branquiais encontrados em *Astyanax* sp. expostos às concentrações de 50% e 100% de águas teste e grupo controle. Resultados expressos em média ± erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (teste de Tukey).  $P < 0,0001$  para os grupos avaliados por análise de variância.

**Tabela 3.** Frequência das alterações histopatológicas observadas em brânquias e fígado de *Astyanax* sp expostos às águas teste e grupo controle.

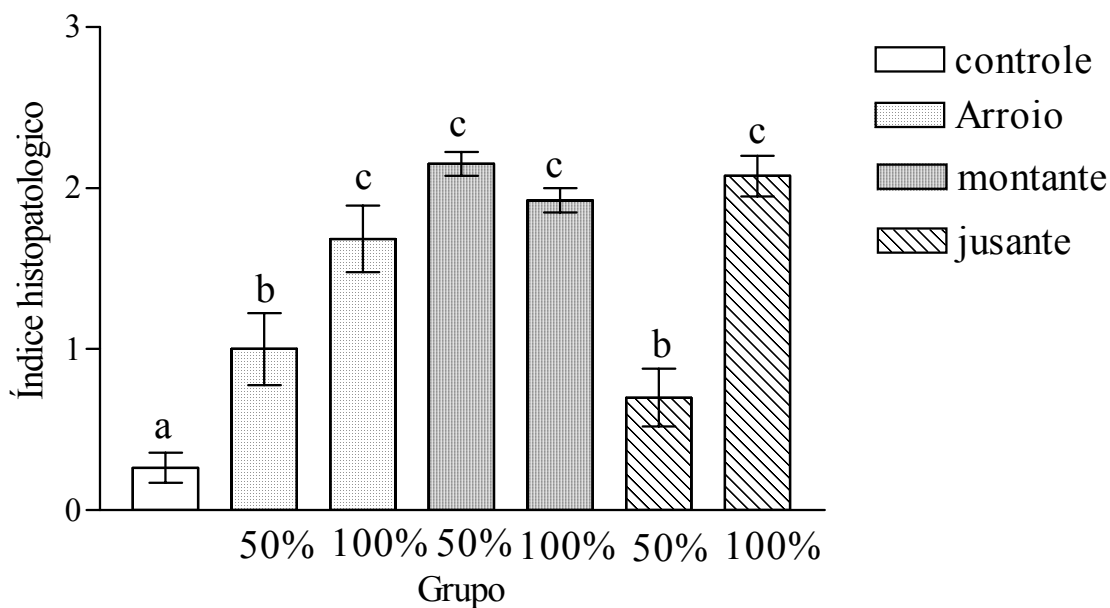
Grupos:	Controle	A. Saldanha		Montante		Jusante	
		50%	100%	50%	100%	50%	100%
<i>Lesões branquiais</i>							
Aneurisma	0 (18)	11 (16)	16 (19)	3 (20)	3 (20)	10(20)	8 (20)
Fusão apical	5 (18)	10 (16)	19 (19)	15 (20)	20 (20)	9 (20)	16 (20)
Fusão basal	10 (18)	15 (16)	19 (19)	19 (20)	20 (20)	14 (20)	20 (20)
Fusão Lamelar	6 (18)	16 (16)	19 (19)	18 (20)	17 (20)	14 (20)	19 (20)
Hipertrofia	3 (18)	13 (16)	19 (19)	18 (20)	20 (20)	12 (20)	20 (20)
Necrose	0 (18)	9 (16)	2 (19)	7 (20)	2 (20)	6 (20)	11 (20)
<i>Lesões hepáticas</i>							
Centro de melanomacrófagos	4 (18)	7 (16)	16 (19)	20 (20)	17 (20)	2 (20)	18 (20)
Melanomacrófagos livre	5 (18)	6 (16)	11 (19)	20 (20)	20 (20)	2 (20)	20 (20)
Infiltração leucocitária	0 (18)	4 (16)	4 (19)	0 (20)	1 (20)	4 (20)	1 (20)
Necrose	0 (18)	0 (16)	0 (19)	0 (20)	0 (20)	0 (20)	1 (20)

O número entre parênteses refere-se ao número de indivíduos analisados.

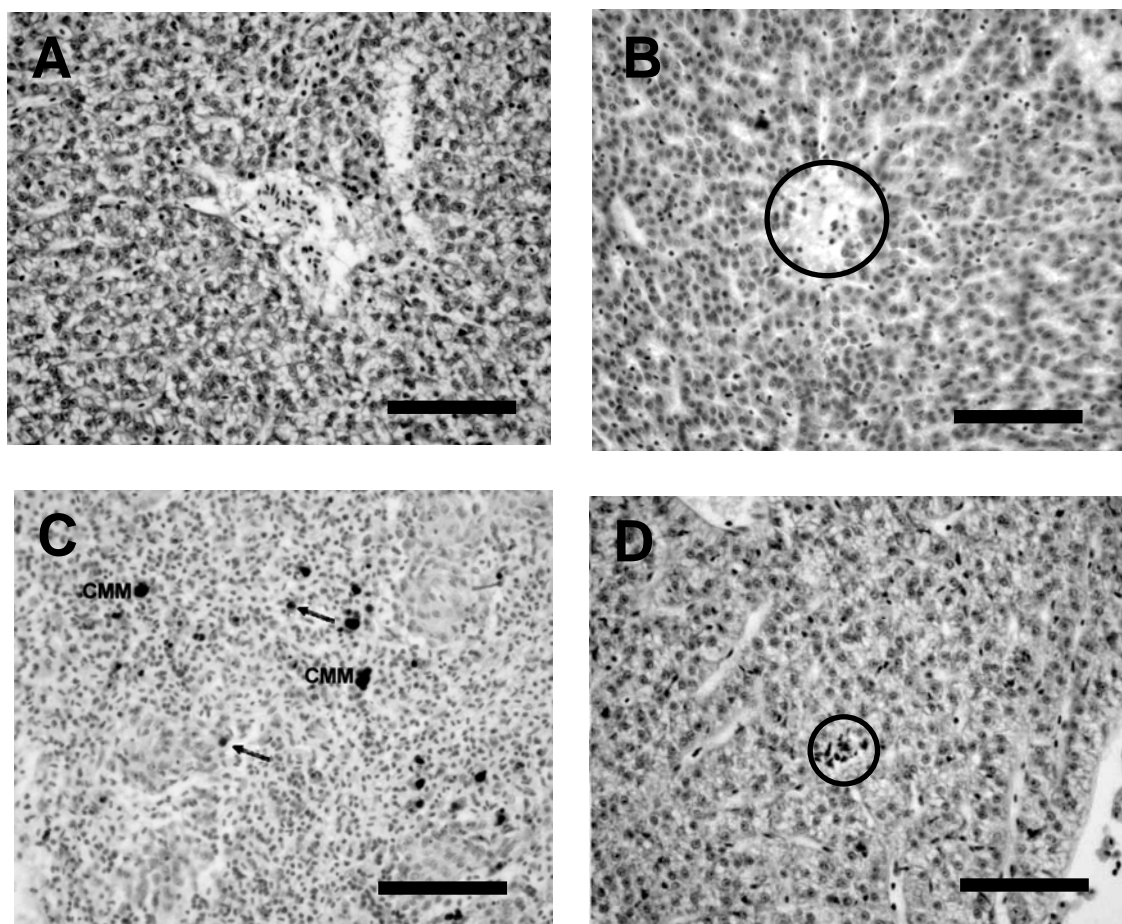


**Figura 7.** Alterações histopatológicas de brânquias de *Astyanax* sp. expostos às concentrações de 50% e 100% das águas teste. **A:** Brânquias do grupo controle sem alterações. **B:** Necrose (seta). **C:** Hipertrofia das células epiteliais(\*), fusão apical (seta). **D:** Aneurisma (seta). **E:** Fusão lamelar (seta). Barra: 50  $\mu$ m.

No fígado de *Astyanax* sp. de todos os grupos testados foram encontrados aumento ( $P < 0,0001$ ) no índice histopatológico (Figura 8) quando comparado ao grupo controle. As alterações encontradas foram necrose, centros de melanomacrófagos (CMM), melanomacrófagos livres, e infiltração leucocitária (Figura 9). A frequência das alterações encontradas no fígado são mostradas na Tabela 3.



**Figura 8.** Índice de lesões hepáticas encontrados em *Astyanax* sp. expostos às concentrações de 50% e 100% das águas teste e grupo controle. Resultados expressos em média  $\pm$  erro. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (teste de Tukey).  $P < 0,0001$  para os grupos avaliados por análise de variância.



**Figura 9.** Alterações histopatológicas em fígado encontradas em *Astyanax* sp. expostos às concentrações de 50 % e 100% das águas teste. **A:** Fígado do grupo controle sem alterações. **B:** Necrose (círculo). **C:** Centro de melanomacrófagos (CMM); melanomacrófagos livres (seta). **D:** Infiltração leucocitária (círculo). Barra: 100  $\mu$ m.

## 2.4 DISCUSSÃO

As refinarias de petróleo são fontes de hidrocarbonetos para a atmosfera e responsáveis pela concentração das mesmas a vários quilômetros de distância dependendo da direção dos ventos e, durante o refino, diversas substâncias são liberadas para o ar e água, entre elas diversos metais pesados tais como Ni, Mn, Zn e Cr (Pedrozo *et al.* 2002).

Neste presente estudo, a análise química da água do Arroio Saldanha, ponto do vazamento de petróleo, revelou a presença de criseno e fluoreno, substâncias possivelmente genotóxicas e carcinogênicas (ATSDR 1999; Pedrozo *et al.* 2002; Pereira Netto *et al.* 2004). Embora PAHs possam ser gerados pela queima de diversos produtos (Page *et al.* 1999), a análise de metais corrobora à tese de que este local, após cinco anos do acidente com o derramamento de petróleo, ainda não foi completamente remediada. O metal pesado mercúrio (Hg), por exemplo, era um dos metais existentes no óleo cru de petróleo derramado e que não foi encontrado à montante da área de estudo. A presença destes PAHs corrobora com os resultados obtidos por Katsumiti (2006) em sedimentos coletados no mesmo ponto em questão, onde mostrou estratificação de hidrocarbonetos no sedimento analisado, sendo que os PAHs se concentraram nas camadas mais superficiais. Criseno, fluoreno e outros PAHs também foram encontrados em análise das águas da costa francesa após alguns meses do derramamento de 10 mil toneladas de óleo do petroleiro maltês “Érika” (Baars 2002). Em estudo realizado por González *et al.* (2006) em águas contaminadas pelo derramamento do petroleiro Prestige ocorrido em 2002 evidenciou-se a presença de fluoreno e criseno, além de outros PAHs em diversos pontos da costa da Galícia (Espanha), indicando a solubilidade destes compostos na água. Criseno e outros PAHs, além de diversos hidrocarbonetos, foram encontrados em sedimento no estudo realizado por Medeiros e Bicego (2004) no terminal marítimo da Petrobrás no Porto de São Sebastião – Brasil, resultado de inúmeros incidentes com derramamento de petróleo naquela região. Em avaliação de sedimentos em zona petrolífera da Petrobrás na Baía de Todos os Santos (Brasil), foram encontrados diversos locais contaminados por PAHs, entre eles o criseno, benzo(k)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno, oriundos do petróleo e por queima de combustíveis fósseis, sugerindo que a extração, o transporte e o refino de petróleo são fontes de contaminação de PAHs (Martins *et al.* 2006).

No ponto de coleta da água do Arroio Saldanha é notável a presença de mata ciliar, o que dificultaria o aporte de outros materiais oriundos de áreas adjacentes e que o mesmo não recebe afluentes de outras fontes hídricas, sendo este local, o ponto zero do derramamento de petróleo. A presença dos outros poluentes, tais como os carcinogênicos benzo(k)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno à montante e à jusante do local de derramamento de petróleo se deve, provavelmente, a grande atividade industrial de diversos segmentos naquela área, como por exemplo, de refinaria de petróleo.

Vários estudos têm mostrado indução da atividade da EROD em locais contaminados por PAHs. Van der Oost *et al.* (1991) encontrou aumento da atividade em *R. rutilus* quando em exposição com PAHs e PCBs. Em 1993, estudos realizados por Curtis *et al.* (1993) em trutas (*Oncorhynchus clarkii*) e carpa (*Cyprinus carpio*) residentes nas águas do rio Willamette, Oregon (US), mostraram aumento da atividade específica da EROD, e foram encontrados PAHs no sedimento deste rio. Estudos em efluentes de indústrias químicas, contendo PAHs e PCBs, realizados no canal de Teltow, Berlin (Alemanha), em *O. mykiss* (truta arco-íris) também foi encontrado aumento da atividade específica (Pluta 1993). Bialliard *et al.* (2004) expuseram trutas juvenis à methylphenantreno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzofluoreno, benzo(b)fluoreno e fenantreno, e obtiveram indução da EROD após a exposição aos PAHs testados. Trutas expostas a óleo cru de petróleo também apresentou aumento significativo na atividade específica da EROD em bioensaio realizado por Shahunthala *et al.* 2004. Em biomonitoramento de campo realizado no Rio Douro em Portugal, rio impactado com presença de diversos poluentes, entre eles os PAHs, com a espécie *Mugil cephalus*, relatou aumento significativo na EROD e em outros biomarcadores bioquímicos, por exemplo, GST e GSH, e também foram encontrados substâncias policíclicas aromáticas na bile (Ferreira *et al.* 2006). Muitos outros estudos também encontraram aumento da atividade específica da EROD em peixes marinhos quando submetidos à exposição de compostos de petróleo (Stegeman *et al.* 1988, Spies *et al.* 1990, Van Veld *et al.* 1990, Goksøyr *et al.* 1991, Peters *et al.* 1994, Rice *et al.* 1994, Shailaja *et al.* 2006, Hansson *et al.* 2006, Pikkarainen 2006) sugerindo, desta forma, que a EROD pode ser utilizada como um biomarcador à exposição de petróleo tanto em ambiente dulcícola quanto marinho. Neste estudo, não houve aumento da atividade específica da EROD em fígado de *Astyanax* sp., isto pode ter ocorrido devido à baixa concentração das substâncias encontradas, além do mais, foram encontrados outros contaminantes que poderiam estar inibindo a atividade da CYP1A, em especial da



EROD, tais como Zn e Ni (Siroká e Drastichová 2004). Entretanto, outros estudos também não encontraram indução desta enzima. Lockhart e Metner 1992, por exemplo, não encontraram aumento na atividade da EROD em efluentes de indústria de petróleo, sugerindo que as substâncias presentes não estavam em quantidades suficientes para a indução enzimática em *Lota lota*, peixe dulcícola do rio Mackenzie (Canadá). Na avaliação feita por Regoli *et al.* (2005) do sistema antioxidante de larvas de *Pleurogramma antarcticum* expostas a benzo(a)pireno, constataram a bioacumulação desta substância nos organismos expostos, não havendo aumento da atividade da EROD. Como a desintoxicação do organismo é necessária, o autor relata que devido aos organismos estarem isolados no oceano Antártico e nunca terem tido contato com essa substância, estes podem não estar adaptados à sua biotransformação.

No presente estudo, a presença de metais e PAHs nas águas teste, pode ter mediado à formação de EROs, com aumento da atividade específica da CAT, que foi evidenciada em todos os grupos e concentrações testadas. O aumento da atividade específica da CAT tem sido relatado como indicador de estresse oxidativo (van der Oost *et al.* 2003, Sturve *et al.* 2005, Sturve *et al.* 2006). O estresse oxidativo encontrado é resultado da tentativa da célula em eliminar radicais livres, formados na metabolização de diversos compostos químicos, através de enzimas específicas tais como a catalase e enzimas desidrogenases como as glutionas (Giulio *et al.* 1989). A indução da catalase sugere uma defesa do organismo face a agentes oxidantes, pois é uma enzima chave para remover peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e evitar a formação de radicais hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) que podem causar danos celulares (Regoli *et al.* 2000). Estudos tem sugerido a indução da CAT em resposta à exposição por PAHs. Avaliação realizada na costa nordeste da Índia, do sistema antioxidante em ostras *Saccostrea cucullata* em local contaminado por PAHs, revelou aumento da CAT, com maior atividade no verão e decréscimo no inverno. O mesmo padrão foi observado com a presença de PAHs nos tecidos das mesmas, indicando que um aumento na concentração destes hidrocarbonetos resulta no aumento da atividade da CAT, sugerindo que a CAT poderia ser utilizada como biomarcador de contaminação por PAHs (Niyogi *et al.* 2001). Exposição de bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) às águas contaminadas com derramamento de petróleo, resultou em aumento da CAT (Sturve *et al.* 2006). Também houve aumento na atividade da CAT para os mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) no Rio Siagne, Baía de Cannes (França), onde foi verificada a presença de PAHs em seus tecidos (Damiens *et al.* 2006). Avaliação no peixe marinho *Orthopristis ruber* na Baía de Guanabara

(Brasil), local exposto à PAHs e PCBs, indicou aumento nas defesas antioxidantes nestes organismos, entre elas a CAT (Ventura *et al.* 2002). Em pesquisa de campo realizado em zonas contaminadas por PAHs, organoclorados (OCs) e PCBs em mexilhão *Perna viridis* e *Ruditapes philippinarum*, em Hong Kong, mostrou aumento da atividade da CAT, GST e outras enzimas antioxidantes em todos os locais analisados para ambas as espécies (De Luca-Abott *et al.* 2005). Aumento na atividade da CAT foi evidenciada no biomonitoramento realizado em mexilhão de água doce (*Dreissena polymorpha*) no Rio Sena, e em mexilhão marinho (*Mytilus edulis*) na Baía Sena, França, em sítios contaminados por PAHs e e pelos metais Pb, Cd, Hg e Ni (Rocher *et al.* 2006). Outros estudos também têm demonstrado aumento da atividade da CAT por exposição a metais (Liu e Kueh 2005, Gravato *et al.* 2006, Hansen *et al.* 2006).

Como ocorreu a incidência de diversos tipos de substâncias na área de estudo, provavelmente em consequência de diversas indústrias que liberam ao meio ambiente vários poluentes, fica difícil estabelecer a exata causa do aumento da atividade da CAT nos organismos testados, uma vez que pode estar ocorrendo sinergismo entre estas substâncias. Porém, os organismos estão formando os radicais livres que, se forem excessivos, podem provocar danos de membrana e alterações de DNA. No Arroio Saldanha, ponto do derramamento do petróleo, também foi observado aumento da atividade da GST, sugerindo atuação desta enzima para a eliminação dos xenobióticos encontrados. Exposição à fração solúvel do óleo diesel em dourado (*Carassius auratus*), também indicou aumento na atividade da GST como resposta à biotransformação das substâncias existentes nesta fração solúvel (Zhang *et al.* 2004). Estudo realizado em mexilhões (*Bathymodiolus* sp. e *Modiolus modiolus*) provenientes de locais contaminados por PAHs no Golfo do México, oriundos de escoamento da perfuração de petróleo, indicou aumento da atividade específica da GST (Willet *et al.* 1999). Em biomonitoramento do Mar Báltico com sedimento contaminado por PAHs e metais pesados em *Platichthys flesus* indicou aumento da GST, sugerindo esta enzima como biomarcador para estudos de campo (Napierska e Podolska 2005).

No entanto, não houve aumento da GST à jusante e à montante do local de derramamento de petróleo. Nos pontos onde não houve aumento da GST ocorreu aumento da LPO, sugerindo que os poluentes ali presentes não estão sendo conjugados pelo *Astyanax* sp. Resultado semelhante ocorreu em pesquisa realizada por Regoli *et al.* (2005), já citado anteriormente, em *P. antarcticum*, onde foi evidenciado produtos da peroxidação lipídica em grupos tratados com benzo(a)pireno sem que tenha ocorrido

resposta da GST. No estudo realizado com exposição de *Oreochromis mossambicus* à PAHs, mostrou indução da atividade da GST quando submetidas à altas concentrações de PAHs, entretanto, para as baixas concentrações de PAHs parece haver uma inadequada conjugação dos metabólitos reativos, levando à danos nos tecidos (Shailaja e D'Silva 2003).

Aumento na concentração de hidroperóxidos foram observados à jusante e à montante do local de derramamento de petróleo, sugerindo que a espécie testada pode não estar adaptada a conjugar os diversos xenobióticos encontrados. Isto ficou evidenciado com o aumento da atividade da CAT e a não resposta da GST nestes organismos, levando à peroxidação lipídica. Estudo feito nesta mesma área por Katsumiti (2006), utilizando o peixe residente *Hyphessobrycon reticulatus* como bioindicador, também revelou aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Exposição a PAHs tem aumentado os níveis de peroxidação lipídica nos organismos aquáticos. Aumento nestes níveis foi observado por Shi *et al.* (2005), em *Carassius auratus* quando expostos a naftaleno. Aumento nos níveis de LPO também foram encontrados em *Chlamys ferrari* quando submetidos à concentrações de benzo(a)pireno e benzo(k)fluoranteno, indicando neste estudo, ser um bom biomarcador à exposição por PAHs (Pan *et al* 2006). Resultado semelhante foi observado por Avci *et al.* (2005), em análise de *Silurus glanis* em rio contaminado pelo efluente de indústria de refinaria de petróleo, onde observou-se altos níveis de LPO nos organismos testados. Avaliação de estresse oxidativo em ostras em zonas contaminadas por PAHs também indicou aumento da LPO (Niyogi *et al.* 2001).

Embora os mecanismos de inibição dos PAHs sobre a AChE ainda sejam desconhecidos, diversos trabalhos têm sido realizados utilizando-a como biomarcador de exposição. Em bioensaio realizado com efluentes de refinaria de petróleo por Martizez-Tabche *et al.* (1998), em crustáceo dulcícola *Moina macrocopa*, indicou inibição da AChE em poucos dias de exposição. Uma inibição semelhante da AChE foi encontrada em músculo de trutas (*Salmo truta*) em biomonitoramento de rios urbanos, contaminados por diversos tipos de poluentes, por Payne *et al.* (1996). Avaliação da fração solúvel de petróleo realizada por Akaishi *et al.* (2004), em músculo de *Astyanax* sp., mostrou diminuição da atividade da AChE.

Neste estudo, embora tenha sido constatada a presença de PAHs, metais e surfactantes em todos os pontos estudados, não houve inibição da atividade da AChE em *Astyanax* sp., isto se deve provavelmente, a baixas concentrações dos poluentes

encontrados. Os poluentes não enzima-específicos precisam estar em concentrações mais altas para inibir a AChE (Sturm *et al.* 1999).

Substâncias reativas, tais como as EROs, podem causar danos aos tecidos (Sakai *et al.* 1998, Oliveira 1999, Shailaja e D'Silva 2003, Barreiros *et al.* 2006). Neste trabalho, foram evidenciadas alterações características de exposição aguda no epitélio das lamelas secundárias das brânquias como fusão lamelar, aneurismas, necrose e hipertrofia das células epiteliais em todas as concentrações e grupos testados, sugerindo que os indivíduos expostos a essas águas estariam sofrendo a ação de agentes estressores. As brânquias desempenham papel fundamental às trocas gasosas e regulação osmo-iônica, essas alterações podem vir a comprometer os mecanismos de respiração e osmorregulação (Verbost *et al.* 1994). A alteração do tipo aneurisma, que se traduz em acúmulo de sangue nas lamelas secundárias, pode levar ao rompimento do epitélio, causando hemorragia. Alterações semelhantes nas brânquias foram encontradas por Akaishi *et al.* (2004) em bioensaio realizado por exposição aguda de *Astyanax* sp. a diferentes concentrações de fração solúvel de petróleo. Outro estudo realizado em *Astyanax* sp. através de biomonitoramento em rios contaminados por metais pesados no Brasil, revelou alterações branquiais nos indivíduos coletados, tais como aneurismas e hipertrofia de células epiteliais (Winkaler *et al.* 2001). Em exposição de *Perca flavescens* e *Carassius auratus* a locais com águas contaminadas por PAHs e metais pesados, verificou-se necrose, fusão lamelar e proliferação celular entre as lamelas secundárias, além de outras alterações nas duas espécies estudadas (Nero *et al.* 2006). Os resultados obtidos neste trabalho em relação às alterações em brânquias, corroboram com os estudos de campo realizado por Katsumiti (2006), em *Hyphessobrycon reticulatus* no Arroio Saldanha, que encontrou, entre outras alterações, aneurismas, fusões lamelares basais e apicais. Alterações em brânquias tipo aneurismas, proliferação celular e fusão lamelar têm sido relacionadas à exposição a diversos produtos oriundos do petróleo (Burton *et al.* 1984, Spitsbergen e Peterson 1988, Spies *et al.* 1996, Van den Heuvel *et al.* 2000). Segundo Machado (1999), necrose tem sido uma das alterações mais observadas em brânquias de peixes expostos a metais pesados, o que corrobora com as alterações encontradas neste presente estudo, onde metais pesados como o Hg, além de PAHs, foram evidenciados na análise química da água, além disso, metais pesados por competir com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  comprometem a osmorregulação (Verbost *et al.* 1989, Cooper *et al.* 2006).

Lesões como necrose, infiltração leucocitária, centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres foram observadas no fígado de *Astyanax* sp. em todos os grupos e concentrações testadas. Tais alterações também foram encontradas em outros estudos com hidrocarbonetos oriundos de petróleo (Myers *et al.* 1998, Akaishi *et al.* 2004, Katsumiti 2006, Nero *et al. in press*). Mesenguer *et al.* (1994), sugere que os melanomacrófagos estão envolvidos na degradação de cabólitos, células e material exógeno, sendo que os mesmos são caracterizados pela presença de vesículas pigmentadas próximas uma das outras e células fagocíticas, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Lyons *et al. (in press)*, encontrou centro de melanomacrófagos em *Limanda limanda* e tumores no fígado destes animais. Isto sugere, que os centros de melanomacrófagos podem ser utilizados como biomarcadores de poluição aquática, uma vez que tem como função remover partículas estranhas oriundas da degradação celular (Ravaglia e Maggese 1995). A necrose é uma consequência de um conjunto de distúrbios causados por substâncias tóxicas como inibição enzimática, alteração na membrana celular, distúrbios na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos (Mela 2004, Oliveira Ribeiro *et al.* 2006). As alterações encontradas no fígado podem comprometer o funcionamento deste órgão, e prejudicar a biotransformação de xenobióticos.

O Sistema imunológico dos peixes parece responder quando em exposição à xenobióticos (Van den Heuvel *et al.* 2000). Neste estudo, foram encontrados infiltração leucocitária no fígado e centros de melanomacrófagos, o que corrobora com os resultados obtidos por Nero *et al.* 2006 em fígado de *Perca flavescens* oriundas de locais contaminados por ácidos naftênicos (NAs), metais e PAHs provenientes da extração de betume, onde encontrou-se entre outras alterações, centros de melanomacrófagos e inflamações severas. A observação da presença de infiltrações leucocitárias ou inflamações podem ser ferramentas importantes para se avaliar a qualidade dos recursos hídricos, tais como os contaminados por derramamento de petróleo.

Os biomarcadores bioquímicos e morfológicos aliados às análises químicas da água sugerem que a qualidade da água dos pontos de estudo está comprometida e, que o acidente com derramamento de petróleo ocorrido no Arroio Saldanha ainda pode afetar a comunidade aquática deste recurso hídrico. A legislação brasileira tem evoluído no sentido de utilizar os estudos ecotoxicológicos como ferramenta à avaliação da qualidade da água, uma vez que estes estudos dão uma visão do ecossistema como um

todo, não se limitando somente à análise química da água à avaliação dos recursos hídricos.

## 2.5 AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) pelas análises químicas da água.

### 3. CONCLUSÃO

- A avaliação dos resultados obtidos da análise química da água juntamente com os biomarcadores bioquímicos e morfológicos utilizados neste estudo, sugere que os pontos avaliados estão impactados por atividade antrópica e, que o Arroio Saldanha, ponto zero do acidente com derramamento de petróleo, ainda não foi totalmente biorremediado.
- O não aumento da atividade específica da EROD em *Astyanax* sp. quando comparado ao grupo controle, se deve provavelmente, às baixas concentrações dos PAHs encontrados.
- O aumento da CAT em todos os grupos e concentrações testadas, sugere que *Astyanax* sp. quando expostos às águas-teste, estiveram sob estresse oxidativo, o que pode ter levado aos danos encontrados nas brânquias e fígado.
- Nos grupos onde a GST não aumentou, ocorreu aumento da concentração de hidroperóxidos, sugerindo que *Astyanax* sp. pode não estar conjugando adequadamente os xenobióticos encontrados.
- O aumento da LPO sugere deficiência no sistema antioxidante de *Astyanax* sp. quando submetida aos multixenobióticos existentes na água teste.
- A AChE não foi inibida, provavelmente, porque as substâncias não enzima-específicas encontradas nas águas teste estavam em baixas concentrações.

#### 4. REFERÊNCIAS

Adams HR (1992) Drogas que atuam sobre os sistemas nervosos somático e autonômico. In: Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Booth NH, McDonald LE (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Meth Enzymol. 105: 121–126.

Akaishi FM, Silva de Assis H C, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. Arch Environ Contam Toxicol 46: 244–253.

Amorim LCA (2003) Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Rev Bras Epidemiol 6: 1-13.

Anderson T, Förlin L (1992) Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquat Toxicol 24: 1-13.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Total petroleum hydrocarbons (1999). Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>. Acesso em: 27 de jul. 2006.

Avci A, Kamaz M, Duraka I (2005) Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. Ecotoxicol Environ Saf 60:01-105.

Baars BJ (2002) The wreckage of the oil tanker “Erika”: human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. Toxicol Letters 128: 55-68.

Barddal ML, Roderjan CV, Galvão F, Curcio GR (2004) Caracterização florística e fitossociológica de um trecho sazonalmente inundável de floresta aluvial, em Araucária, PR. Ciênc Flor, 14: 37-50.



Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29: 113-123.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22: 25-34.

Beyers DW, Sikoski PJ (1994). Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to cararyl and malathion. *Environ Toxicol Chem* 13:935-939.

Billiard SM, Bols NC, Hodson PV (2004) In vitro and in vivo comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 59: 292-299.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

Brauner CJ, Ballantyne CJ, Vijayan MM, Val AL (1999) Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparat Biochem Physiol Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123: 127 – 134.

Bucheli TD, Fent K (1995) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Environ Sci Technol* 25: 201-268.

Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. *D Met Dispos* 2: 583-588.

Burton D, Burton MP, Idler DR (1984) Epidermal conditions in post spawned winter founder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), maintained in the laboratory and after exposure to crude petroleum. *J Fish Biol* 25: 593-606.

Cooper C A, Handy RD, Bury NR (2006) The effects of dietary iron concentration on gastrointestinal and branchial assimilation of both iron and cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 79: 167–175.

Courtenay S, Grunwald C, Kreamer GL, Alexander R, Wirgin I (1993). Induction and clearance of cytochrome P450 1A mRNA in atlantic tomcod caged in bleached kraft mill effluent in the Miramichi River. *Aquat Toxicol* 27: 225-235.

Curtis LR, Carpenter HM, Donohoe RM, Williams DE, Hedstrom OR, Deinzer ML, Beilstein MA, Foster E, Gates R (1993) Sensitivity of cytochrome P450 1A1 induction in fish as a biomarker for distribution of TCDD and TCDF in the Willamette River, Oregon. *Environ Sci Technol* 27: 2149-2161.

Damiens G, Gnassia-Barelli M, Loque's F, Rome M, Salbert V (2006) Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* in press.

De Luca-Abbott S B, Richardson B J, McClellan K E, Zheng GJ, Martin M, Lam PKS (2005) Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar Poll Bull* 51: 694–707.

Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP (1993) Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat Toxicol* 26: 1-22.

Dixon DP; Laphorn A (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3: 1-10.

Ellmann G L, Courtney KD, Andreas VJ, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88.

Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA (2006) The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Mar Environ Res* 61: 326–338.

Galgani F, Bocquené G, Cadiou Y (1992) Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91: 72-82.

Gerry J (1977) *Characides of the world*. TFH Publications, USA.

George SG (1993) Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. In *Aquatic Toxicology*. Malins CD, Ostrander GR (eds) Boca Ranton, London.

Giulio RTD, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 9: 1103-1123.

Godoy MP (1975) *Peixes do Brasil. Subordem Characidae*. Ed. Franciscana, São Paulo.

Goksøyr A, Husoy AM, Larsen HE, Klungsoyr J, Wilhelmsen S, Maage A, Brevik EM, Andersson T, Celander M, Pesonen M, Förlin L (1991) Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway. *Arch Environ Contam Toxicol* 21: 486-494.

González JJ, Viñas L, Franco MA, Fumega J, Soriano JA, Grueiro G, Muniategui S, López-Mahí P, Prada D, Bayona JM, Alzaga R, Albaigés J (2006) Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Mar Poll Bull* 53: 250-259.

Goodman A, Gilman P (1996). *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. Santadaert DG, Young AB. (eds). 9 ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, pp. 373-374.

Gravato C, Teles M, Oliveir, M, Santos MA (2006) Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla L.* – the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. Chemospher in press.

Habig C, Di Giulio RT (1991) Biochemical characteristics of cholinesterase in aquatic organisms. In: Mineau P (ed), Cholinesterase inhibition insecticides: their impact on wildlife in the environment. Elsevier, New York, pp 19–33.

Halliwell B, Gutteridge JC (2000) Free radicals in biology and medicine. 3ed. Oxford, New York.

Hansen BH, Romma S, Garmo OA, Olsvik PA, Andersen RA (2006) Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol 143: 263-274.

Hansson T, Lindesj E, Forlin L, Balk L, Bignert A, Larsson A (2006) Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. Aquat Toxicol in press.

Henriques JAP (2004) Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Ulbra. Canoas, Rio Grande do Sul.

Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Functional metabolism: Regulation and adaptation. Storey, KB (ed). Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp 319-368.

Hinton DE, Baumann PC, Gardner GR, Hawkins WE, Hendricks JD, Murchelan RA, Okihiro MS (1992) Histopathology biomarkers. In Biomarkers Biochemical Physiological and histological markers of antropogenic stress. Hugget RJ, Kimerley RA, Mehrle PM, Bergman HL (eds). Lewis Publishers, London. pp. 155-208.

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM (1992) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Bergman HL (ed). Boca Raton, FL, USA.

Instituto Ambiental do Paraná – IAPa (2004). Procedimento técnico: Determinação de Al, Ba, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Zn e Ag em águas – PT 100. DAA, Curitiba.

Instituto Ambiental do Paraná – IAPb (2004). Procedimento técnico: Determinação de mercúrio total pelo método da espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor a frio – PT 097. DAA, Curitiba.

Instituto Ambiental do Paraná – IAPc (2004). Procedimento técnico: Determinação de compostos orgânicos semivoláteis – PT 331. DAA, Curitiba..

Instituto Ambiental do Paraná – IAPd (2004). Procedimento técnico: Determinação de surfactantes – PT 061. DAA, Curitiba.

Instituto Ambiental do Paraná – IAPe (2004). Manual para coleta e preservação de amostras de água, solo, efluentes e animais. Curitiba.

Jiang ZY, Hunt JV, Wolf SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analyt Biochem* 202: 384-389.

Katsumiti AKF (2006). Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba.

Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 251: 6183-6188.

Klemz C (2002). Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo). Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba.

Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental risk assessment. Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3: 193-208.

Lionel G, Marta A (2003) Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment. *Electron Biot.* 6: 168-173.

Lin JH, Lu AYH (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 35: 361-390.

Liu JH, Kueh CSW (2005) Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar Pollut Bull* 51: 857–875.

Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Tech Biotechnol* 57: 95-105.

Lockhart WL, Metner DA (1992) Applications of hepatic mixed function oxidase enzyme activities to northern freshwater fish, I. Burdot, *Lota lota*. *Mar Environ Res* 34: 175-183.

Lyons BP, Stentiford GD, Bignell J, Goodsir F, Sivyer DB, Devlin MJ, Lowe D, Beesley A, Pascoe CK, Moore MN, Garnacho E (2006) A Biological effects monitoring survey of Cardigan bay using flatfish Histopathology, Cellular biomarkers and Sediment bioassays: findings of the prince madog prize. *Mar Environ Res* in press.

Machado M. R (1999). Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Ciênc Biol Saúde* 1: 63-76.

Machella N, Regoli F, Cambria A, Santella RM (2004) Application of an immunoperoxidase staining method for detection of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine as a biomarker of chemical-induced oxidative stress in marine organisms. *Aquat Toxicol* 67: 23-32.

Mallick N, Rai LC (1999) Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing *Cyanobacterium anabaena dociolum* to copper. *J Plant physiol* 155: 30-34.

McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in pos-ischemia tissue injury. *N. Engl. J Med* 312: 159-63.

Marionnet D, Deschaux P, Reynaud S (2006). Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol* 21: 80-91.

Martinez-Tabche L, Ramírez BM, Germán-Faz C, Diaz-Pardo E (1998) Acetylcholinesterase activity of the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa*, used as an in vitro screening tool for water quality. *Aquat Ecos Health Managem* 1: 317-322.

Martinez-Tabche L, Ramírez BM, Germán-Faz C, Galar CI, Madrigal OM, Ulloa GV, Orozco FM (1997) Toxic effect of sodium dodecylbenzenesulphonate, lead, petroleum and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. *Environ Toxicol Water Qual* 12: 1-5.

Martins LKP, Nascimento IA, Fillmann G, King R, Evangelista AJA, Readmand JW, Depledge MH (2006) Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environ Res* in press.

Meagher EA, Fitzgerald GA (2000). Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. *Free Rad Biol Med* 26: 202-226.

Medeiros PM, Bicego MC (2004) Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP – Brazil. *Mar Poll Bull* 49: 892-899.

Mela M (2004) Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba.

Meniconi MFG, Gabardo IT, Carneiro MER, Barbanti SM, Silva GC, Massone CG (2002) Brazilian oil spills chemical characterization - case studies. *Environ For* 3: 303-321.

Meseguer J, López-Ruiz A, Esteban MA (1994). Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell Tis Res* 277: 1-10.

Myers MS, Johnson LL, Horn T, Collier TK, Stein JE, Varanasi U (1998) Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: Relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Mar Environ Res* 45: 47–67.

Napierska D, Podolska M (2005) Biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Mar Poll Bull* 50: 758-767.

Nebert D W (1991) Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res* 247: 267-281.

Neff HM (1978) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd, UK.

Nero V, Farwell A, Leeb LEJ, Van Meerc T, MacKinnond MD, Dixon DG The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology. *Ecotoxicol Environ Saf* in press.

Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee LEJ, Van Meerd T, MacKinnone, MD, Dixona DG (2006) Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca*



*flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ Saf* 63: 365–377.

Nicareta L (2004) Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Nikunen E (1985). Toxic impact of effluents from petrochemical industry. *Ecotoxicol Environ Saf* 9: 84–91.

Niyogi S, Biswasa S, Sarkerb AG (2001) Datta Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary India: seasonality and its consequences. *Sci Tot Environ* 281: 237-246.

Oliveira CPMS (1999). Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Oliveira Ribeiro CA, Filipak Neto F, Mela M, Silva PH, Randi MAF, Rabitto IS, Alves Costa JRM, Pelletier E (2006) Hematological findings in neotropical fish *Hoplias Malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environ Res* 101: 74–80.

Page DS, Boehm PD, Douglas GS, Bence AE, Burns WA, Mankiewicz PJ (1999) Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska. *Mar Poll Bull* 38: 247–260.

Pan LQ, Ren J, Liu J (2006) Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo(a)pyrene and benzo(k)fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*. *Environ Poll* 141: 443-451.

Park S, Nam H, Chung N, Park JD, Lim Y (2006) The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. *Toxicol in Vitro* 20: 851-857.

Payne JF, Fancey L, Rahimtula A, Porter E (1987) Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp Biochem Physiol* 86: 233-240.

Payne JF, Penrose WR (1975) Induction of aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull Environ Contamin Toxicol* 14: 112-120.

Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 32: 225–231.

Pedrozo MFM, Barbosa EM, Corseuil HX, Scheneider MR, Linhares MM (2002) *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental v.12. Salvador, Brasil.*

Pereira Netto AD, Cunha IF, Muniz FC, Rego ECP (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons in street dust of Niterói city, RJ, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 829-835.

Peters LD, Porte C, Albaigés J, Livingstone DR (1994) 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Mar Poll Bull* 28: 299-304.

Pikkarainen A (2006) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC *Chemosphere* in press.

Pluta HJ (1993) Investigation on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In: *Fish: Toxicology and Ecophysiology*, Brunbeck T, Hanke W, Segner H (eds). Weinhein Publishers, Germany, pp 170-190.

Range HP, Dale MM (2000) *Farmacologia. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.*

Ravaglia MA, Maggese MC (1995) Melano-macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae): histological and histochemical characterization. *J Fish Dis* 18: 117- 125.

Regoli F, Nigro M, Benedetti M, Fattorini D, Gorbi S (2005) Antioxidant efficiency in early life stages of the antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquat Toxicol* 75: 43-52.

Regoli F, Nigro M, Bompadre S, Winston GW (2000) Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquat Toxicol* 49: 13-25.

Rice DW, Seltenrich CP, Keller ML, Spies R, Felton, JS (1994) Mixed-function oxidase specific activity in wild and caged speckled sanddabs *Citharichthys stigmaeus* in Elkhorn Slough, Moss Landing Harbor and neashore Monterey Bay, California. *Environ Pollut* 84: 179-185.

Riol MJM, Valiñas MCN, Fernández MAG, López MP (2000). Glutathione S-transferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparat Biochem Phyliol* 1: 227-235.

Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, Andre V, Pikkarainen A (2006) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC. *Chemosphere* in press.

Saeed T, Mutairi MA (1999) Chemical composition of the water soluble fraction of leaded gasoline in seawater. *Environ Internat* 25: 117-129.

Sakai T, Murata H, Endo M, Shimomura T, Yamauchi K, Ito T, Yamaguchi T, Nakajima H, Fukudome M (1998) Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 160: 205-214.

Schmidt GH, Ibrahim NM (1994). Heavy metal content ( $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotox Environ Saf* 29: 148–164.

Shahunthala D, Hodson P V, Khan CW, Leeb K (2004) Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotox Environ Saf* 59: 300–308.

Shailaja MS, D'Silva C (2003) Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus*. *Chemosphere* 53: 835-841.

Shailaja MS, Rajamanickam R, Wahidulla S (2006) Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite. *Environ Pollut* 143: 174-177.

Shi H, Sui Wang X, Luo Y, Ji L (2005) Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparat Biochem Physiol* 140: 115-121.

Silva de Assis HC (1998). Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Tese de doutorado. Universidade Técnica de Berlin. Alemanha.

Siroká Z, Drastichová J (2004) Biochemical markers of aquatic environment contamination: Cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet Brno* 73: 123-132.

Spies RB, Stegeman JJ, Hinton DE, Woodin B, Smolowitz R, Okihiro M, Shea D (1996) Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid shes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. *Aquat Toxicol* 34: 195-219.

Spies RB, Stegeman JJ, Rice DW, Woodin B, Thomas P, Hose JE, Cross JN, Prieto M (1990) Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction, *In: Biomarkers of Environmental Contamination*, McCarthy JF, Shugart LE (ed). Boca Ranton, Lewis Publishers, New York.

Spitsbergen JM, Kleeman JM, Peterson RE (1988) 2,3,7,8 - Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in yellow perch *Perca - avescens*. Toxicol Environ Health 23: 359- 383.

Srivastava A, Harish SR, Shivanandappa T (2006) Antioxidant activity of the roots of *Decalepis Hamiltonii* (Wight & Arn.). *LWT - Food Sci Technol* 39: 1059-1065.

Stegeman JJ, Hann ME (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species, *In: Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, Ostrander GK Malins D (ed). Boca Ranton, Lewis Publisher, New York.

Stegeman JJ, Lech JJ (1991) Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect* 9: 90-101.

Stegeman J J, Woodin BR, Goksoyr A (1988) Apparent cytochrome P450 induction as and indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus*. *Mar Ecol Prog Ser* 46: 55-60.

Stenesh, J. (1998). *Biochemistry*. Plenum. New York, EUA. p 596.

Stephensen E, Adolfsson-Erici M, Celander M, Hulander M, Parkkonen J, Hegelund T, Sturve J, Hasselberg L, Bengtsson M, Förlin L (2003) Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. *Environ Toxicol Chem* 22: 2926-2931.

Sturm A, Silva de Assis HC, Hansen PD (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar Environ Res* 47: 389-398.

Sturve J, Hasselberg L, Falth H, Celander M, Förlin L (2006) Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat Toxicol* 78: 73-78.

Sturve J, Stephensen E, Förlin L (2005) Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Hepatol* 4: 4-10.

Thiyagarajah A, Hartley WR, Major SE, Broxson, MW (1996) Gill histopathology of two species of buffalo fish from a contaminated swamp. *Mar Environl Res* 42: 261-266.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1995) Office of compliance. Office of enforcement and compliance assurance. Profile of the petroleum refining industry. Washington, DC.

Van den Heuvel MR, Power M, Richards J, MacKinnon M, Dixon DG (2000) Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 46: 334-341.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.

Van der Oost R, Heida H, Opperhuizen A, Vermeulen NPE (1991) Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs) and MFO-induction in fish. *Comp Biochem Physiol* 100: 43-54.

Van der Widen MEJ, Tibosch HJH, Bleumink R, Sinnige TL, Van de Guchte C, Seinem W (1993) Cytochrome P450 1A induction in the common carp (*Cyprinus carpio*) following exposure to contaminated sediments with halogenated polyaromatics. *Chemosphere* 27: 1297-1303.

Van Veld PA, Westbrook DJ, Woodin BR, Hale RC, Smith CL, Huggett RJ, Stegeman JJ (1990). Induced cytochrome P450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquat Toxicol* 17: 119-127.

Ventura EC, Gaelzer LR, Zanette J, Marquesa MRF, Bainya ACD (2002) Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Mar Environ Res* 54: 775-779.

Verbost PM, Schoenmakers TJM, Flik G, Bonga SEW (1994) Kinetics of ATP and Na<sup>+</sup> gradient driven Ca<sup>+2</sup> transport in basolateral membranes from gills of freshwater and seawater adapted tilapia. *J Exp Biol* 186: 95-108.

Verbost PM, Vanrooij J, Flik G, Lock RAC, Bonga SEW (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interface with calcium transport. *J Exp Biol* 145: 185–197.

Walker C H, Hopkin SP, Sibly RM, Peakal DB (1996) Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis. London.

Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2001) Principles of Ecotoxicology. 2<sup>nd</sup> Edition. Taylor and Francis. London.

Willett KL, Wilson C, Thomsen J, Porter W (1999). Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hydrocarbon and 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dioxin binding proteins in the marine mussels, *Bathymodiolus* and *Modiolus modiolus*. *Aquat Toxicol* 48: 51- 64.

Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR (2001) Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scient* 23: 507-514.

Yu BP (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-62.

Zhang JF, Wang XR, Guo HY, Wu JC, Xue YQ (2004). Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 58: 110-116.

**ANEXO**



NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA ARCHIVES OF  
ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY<sup>1</sup>

1. Manuscript. The manuscript should be written in clear, concise English. It should be typed in double-space, on a single side of blank white paper, with at least 2.5 cm margins, in 10 characters per inch (12 point) font. The title page must contain all contact information for the corresponding author, in English, including mailing address (street address), telephone number, FAX number, and E-Mail address .

Authors should retain a complete copy of their manuscripts, identical in every respect to the material submitted. Authors will be notified immediately upon receipt of new submissions and revised manuscripts.

Manuscripts must be no greater than 25 typewritten pages in length, including reference section and tables. All the pages should be numbered consecutively in Arabic numerals. Footnotes should be numbered consecutively in the text using Arabic numerals.

Tables should be typed in double-space and each should appear on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals, and kept at a minimum. Each table should bear a title, including the table number and a brief description. Footnotes in tables should be designated consecutively by the lower-case alphabet. Tables should be placed immediately after the Reference section.

Figures (including graphs, line drawings and photographs) should be numbered consecutively in Arabic numerals, and kept at a minimum. Each figure should appear on a separate page and labeled with the figure number. If stand-alone photographs are used, each must be mounted to a separate page. Color photographs can only be accepted if the author agrees to bear the additional costs of reproduction.

A single page, preceding the figures should be entitled "Figure Captions" and contain a list of captions for all the figures. Each caption should include the figure number, title, and a brief description that is comprehensible without reference to the text

2. Submission. One hard copy should be mailed to the Editor (address below) with no signature required for delivery. An electronic version of the manuscript, identical to the hard copy, should be included with all text, figures, tables and references, combined into one single file. Please include a list of three to five qualified reviewers not

---

<sup>1</sup> <http://www.environmental-expert.com/magazine/springer/00244/index.asp>

associated with your institution, including address, telephone number, FAX number, and E-Mail address for each.

3. Copyright. Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out; that, if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher; that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders; that written permission of the copyright holder is obtained by the authors for material used from other copyrighted sources; and that any costs associated with obtaining this permission are the authors' responsibility.

4. Summary or Abstract. A concise but informative summary or abstract should follow the heading on the first page of the manuscript. It should be as brief as possible commensurate with the significant content and major findings presented in the manuscript.

5. References. All papers cited in the text should be given in parentheses (Child 1941, Godwin and Cohen 1969, MacWilliams et al. 1970), except when the author is mentioned, as for example, "and the study of Hillman and Tasca (1977)."

References to unpublished works should be kept to a minimum and mentioned only in the text itself in parentheses. References to published works are given at the end of the text in alphabetical order under the first author's name, citing all authors (surnames followed by initials throughout; do not use "and") according to the following rules and examples:

Periodicals: Name(s), initials, year of publication in parentheses, full article title, journal title as abbreviated in Chemical Abstracts' "List of Periodicals Abstracted", volume number followed by colon, first and last page numbers. Example:

Garcia-Bellido A, Merriam JR (1969) Cell lineage of the imaginal disc in *Drosophila gynandromorphs*. *J Exp Zool* 170:61-76

Books: Name(s), initials, year of publication in parentheses, full title, edition, volume

number, name of publisher, place(s) of publication. Example:

Meltzer YL (1971) Hormonal and attractant pesticide technology. Noyes Data, Park Ridge, New Jersey.

Multi-author books: Name(s), initials, year of publication in parentheses, full title.

In: name(s) and initial(s), of editor(s), the abbreviation ed(s) in parentheses, name of publisher, place(s) of publication, first and last page numbers. Example:

Pittendrigh CS (1965) On the mechanism of entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: Aschoff J (ed) Circadian clocks. North-Holland, Amsterdam, p 276 .

References by the same author(s) are arranged chronologically. If more than one reference by the same author(s) published in the same year is cited, use a, b, and c after the year of publication in both text and list.

6. Nomenclature. All pesticides should be identified according to Chemical Abstracts, with the full chemical name in text in parentheses or brackets, the first time a common or trade name is used.

7. Abbreviations. Units of measurement are abbreviated in accordance with the last edition of the "Handbook for Authors of Papers," as used in the journals of the American Chemical Society, latest edition; all others are written out the first time used, giving the abbreviation in parentheses.

8. Symbols. Special symbols (e.g., Greek letters) are identified in the margin. The symbols used should conform with those given in the ACS Handbook for Authors.

9. Reprints. Reprints may be ordered from the publisher at the time the author returns the page proofs. Free reprints are not offered.