

**LUCIANA RODRIGUES DE SOUZA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO PEIXE-REI  
ESTUARINO (*Atherinella brasiliensis*, Atheriniformes: Atherinopsidae)  
APÓS A EXPLOSÃO DO NAVIO VICUÑA NA BAÍA DE PARANAGUÁ,  
PARANÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Zoologia, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR)

**Curitiba  
2007**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar à minha Orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Arruda de Oliveira Freire pela sua paciência, dedicação e exemplo profissional e ético.

A toda minha família, em especial aos meus pais Jayr Rodrigues de Souza e Maria Luiza Maximiano Rodrigues de Souza por terem acreditado na minha capacidade e força de vontade. Obrigado a todos, minha família é muito importante para mim!

Um agradecimento especial, ao meu irmão Cristiano Rodrigues de Souza, que graças a Deus está conosco e por mais dificuldades que tenha enfrentado se fez vencedor e sempre esteve ao meu lado. Obrigado, muito obrigado.

Ao meu namorado, querido e dedicado Leonardo Pussieldi Bastos, “Léo”, que teve paciência para tolerar minha ausência e que participou efetivamente deste trabalho durante estes dois anos, dividindo seu conhecimento nos momentos de dúvidas: Faltam palavras para expressar o quanto eu te amo!

Aos amigos, Eliandra Zandoná, Cristiane Benincá e Alberto Katsumiti, pelos quais tenho muito carinho. Obrigado pelos momentos agradáveis que passamos juntos. Em especial a Eliandra por compartilhar seu conhecimento nas análises de GST e por ser uma excelente amiga sempre.

Desejo também expressar meus agradecimentos aos meus colegas de laboratório Denilton Vidolin, Ivonete Santos-Gouvea, Maristela Azevedo, Marcos Paulo Veiga, Clarice Foster, e também a sempre presente Katherinne Sperscoski. Agradeço em especial a Valéria Giglio Togni por ter fornecido grandes informações e sugestões ao meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Cristina Silva de Assis, por permitir a utilização de seu laboratório bem como de seus equipamentos em muitas dosagens realizadas. Muito obrigado mesmo!

Ao Laboratório de Fisiologia da Reprodução, coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Moraes, em especial a sua aluna Katherinne Sperscoski por ter disponibilizado seu tempo e conhecimento na realização das análises de cortisol.

À Pontifícia Universidade Católica em especial ao Prof<sup>o</sup> Fabiano Bendhack por ter permitido a utilização das instalações do CPPOM na coleta do ponto referência.

Ao IAP em especial ao Mauro de Moura Britto pela concessão de licença à coleta do ponto referência na Baía de Guaratuba.

Ao Professor José Eduardo Gonçalves do Simepar por comigo ter desenvolvido as modelagens da projeção do óleo, as quais foram muito importantes para a discussão deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Henry Louis Spach e a Prof<sup>a</sup> Eunice Machado do CEM por todo o apoio nas coletas dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá.

À Pós-graduação em Zoologia pela grande oportunidade e também a Secretária Vera Maria Adélio por toda sua prestatividade, paciência e dedicação nas horas em que precisei.

E finalmente a CAPES pela bolsa concedida, e aos peixes sacrificados, sem os quais este trabalho não teria acontecido.

A DEUS POR SER PRESENTE SEMPRE EM MINHA VIDA.

“Errar é um direito de quem quer aprender; ter humildade de recomeçar sempre que preciso, faz parte do ser íntegro e corajoso; ousar é também reconhecer os próprios limites e aceitá-los. Ninguém é obrigado a ser brilhante. Importante é perseguir o desejo de ser feliz e tornar-se um profissional responsável, respeitando, antes e acima de tudo a você mesmo e aos seus princípios”.

(Lucila Camargo)

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	ii
Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	26
3. Materiais e métodos .....	27
3.1 Coleta dos animais em ambiente contaminado, baía de Paranaguá e no ambiente referência, baía de Guaratuba. ....	27
3.2 Obtenção e processamento das amostras nos laboratórios de campo.....	31
3.3 Experimentos de laboratório em Curitiba .....	32
3.4 Análise das amostras .....	34
3.4.1 Dosagens Plasmáticas .....	34
3.4.2 Dosagens Enzimáticas .....	35
3.4.3 Quantificação de Proteínas Totais.....	37
3.5 Análises Estatísticas.....	38
3.6 Modelo de Dispersão de Partículas de Óleo .....	38
4. Resultados.....	41
4.1 Dosagens Plasmáticas .....	41
4.1.1 Osmolalidade.....	41
4.1.2 Cloreto .....	42
4.1.3 Magnésio .....	43
4.1.4 Cortisol.....	44
4.2 Dosagens Enzimáticas .....	45
4.2.1 Atividade da Anidrase Carbônica Branquial .....	45
4.2.2 Atividade da Anidrase Carbônica Renal .....	46
4.2.3 Atividade da Glutathione S-Transferase Branquial (GST).....	47
4.3 Animais amostrados no Ponto Referência em Comparação aos animais deste mesmo ponto Aclimatados em Laboratório .....	47
4.4 Modelo de Dispersão de Partículas de Óleo .....	48
5. Discussão .....	53
6. Considerações Finais .....	70
7. Conclusões.....	72
8. Referências Bibliográficas .....	73

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Complexo estuarino de Paranaguá, localizado no litoral do Estado do Paraná, Brasil.....	03
<b>Figura 2.</b> Baía de Guaratuba, localizada no litoral do Estado do Paraná, Brasil.....	04
<b>Figura 3.</b> Destroços do navio chileno Vicuña no momento de sua remoção da Baía de Paranaguá.....	06
<b>Figura 4.</b> Bóias de contenção espalhadas ao redor do terminal portuário onde ocorreu o acidente com o navio chileno Vicuña.....	06
<b>Figura 5.</b> Exemplar de <i>Atherinella brasiliensis</i> , espécie utilizada neste estudo.....	24
<b>Figura 6.</b> A - Localização do local do acidente (*) e dos pontos de coleta na Baía de Paranaguá (Ponto A e Ponto B).....	28
<b>Figura 7.</b> A – Mapa da localização do local de coleta do ponto referência (assinalada por um círculo) na Baía de Guaratuba, Paraná.....	31
<b>Figura 8.</b> Processamento das amostras em laboratório de campo.....	32
<b>Figura 9.</b> Disposição dos aquários estoque no laboratório.....	33
<b>Figura 10.</b> Batimetria da Baía de Paranaguá, Paraná.....	40
<b>Figura 11.</b> Osmolalidade do plasma (mOsm/kgH <sub>2</sub> O). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	41
<b>Figura 12.</b> Concentração de Cloreto do plasma ([Cl <sup>-</sup> ] mM). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	42
<b>Figura 13.</b> Concentração de Magnésio do plasma ([Mg <sup>2+</sup> ] mM). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	43
<b>Figura 14.</b> Concentração de Cortisol plasmático (ng/mL). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	44
<b>Figura 15.</b> Atividade da enzima Anidrase Carbônica Branquial (/ mg proteína). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	45
<b>Figura 16.</b> Atividade da enzima Anidrase Carbônica Renal (/mg proteína). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três	

datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	46
<b>Figura 17.</b> Atividade da enzima Glutathione S-Transferase Branquial (nmol/minuto/mg proteína). Resultados obtidos com <i>Atherinella brasiliensis</i> do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba.....	47
<b>Figura 18.</b> Modelo de dispersão de partículas de óleo algumas horas após a explosão do navio chileno Vicuña, no dia 15 de novembro de 2004 na Baía de Paranaguá.....	49
<b>Figura 19.</b> Modelo de dispersão de partículas de óleo 1 mês após a explosão do navio, no momento da primeira coleta na Baía de Paranaguá.....	50
<b>Figura 20.</b> Modelo de dispersão de partículas de óleo 4 meses após a explosão, segunda coleta dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá.....	51
<b>Figura 21.</b> Modelo de dispersão de partículas de óleo 7 meses após a explosão, terceira coleta dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá.....	52
<b>Figura 22.</b> Dinâmica das correntes marítimas da Baía de Paranaguá, tanto de maré enchente, quanto de vazante.....	66

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Dados abióticos obtidos durante os arrastos nas três coletas dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá e no ponto referência na Baía de Guaratuba.....	30
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre as dosagens plasmáticas e atividades enzimáticas de <i>Atherinella brasiliensis</i> coletados e processados no ponto referência na Baía de Guaratuba/PR em abril de 2006 e os exemplares aclimatados por 10 dias em laboratório.....	48

## Resumo

Regiões de estuários exibem constante variabilidade ambiental, gerando situações estressantes aos organismos residentes. Além disso, estas regiões são freqüentemente contaminadas por efluentes, contendo resíduos orgânicos e industriais de uma série de diferentes atividades humanas. As Baías de Paranaguá e Guaratuba são dois grandes sistemas estuarinos localizados no sul do Brasil. A Baía de Paranaguá é normalmente considerada uma região contaminada devido às intensas atividades portuárias aliadas às descargas de efluentes despejados freqüentemente nesta região. Em associação a estas condições, um grande derramamento de óleo decorrente da explosão de um navio petroleiro que carregava metanol e óleo *bunker* (óleo cru, utilizado como combustível para navios) ocorreu em 15 de Novembro de 2004 na Baía de Paranaguá agravando a situação ambiental nesta Baía. Em contraste, o estuário da Baía de Guaratuba é considerado como sendo pouco contaminado. Uma espécie de peixe residente, o peixe-rei *Atherinella brasiliensis*, muito abundante em ambos os estuários, foi escolhido como bioindicador para os efeitos crônicos do derramamento de óleo em Paranaguá. A espécie foi amostrada em Dezembro 2004 (30 dias após a explosão) e em Março (120 dias após a explosão) e Junho de 2005 (210 dias após a explosão), sempre nas duas localidades: um ponto mais próximo (A) e outro mais afastado (B) ao local da explosão. A osmolalidade, a concentração de íons (cloreto e magnésio) e de cortisol foram determinados no plasma dos peixes. Homogeneizados de brânquias e rins foram utilizados para determinar a atividade das enzimas Anidrase Carbônica (AC) e Glutathione S-Transferase (GST). Aumento da osmolalidade, cloreto, mas especialmente de magnésio

plasmático foram detectados em Março, juntamente com a inibição da atividade da enzima anidrase carbônica branquial. O cortisol plasmático aumentou em Março e mais ainda em Junho. A atividade da GST apresentou pouca alteração. O modelo de dispersão de partículas desenvolvido para o acompanhamento do acidente ao longo de 7 meses cumpriu seu papel de ferramenta integradora corroborando os resultados apresentados pelos marcadores fisiológicos e bioquímicos de que os maiores efeitos ocorreram na coleta de Março/2005, mais especificamente no ponto B localizado mais afastado do epicentro do acidente, mas mais próximo da saída da Baía de Paranaguá. Esta região possivelmente concentrou não somente os hidrocarbonetos provenientes do acidente, mas também contaminantes regularmente depositados na Baía. O peixe-rei mostrou-se como um bom bioindicador e as funções de osmorregulação, especialmente as concentrações dos íons magnésio, juntamente com as dosagens de cortisol plasmático, e a atividade da enzima anidrase carbônica branquial também se mostraram como excelentes biomarcadores dos efeitos crônicos do derramamento de óleo em áreas tropicais portuárias.



## **Abstract**

Estuarine areas display wide and fast environmental variability, posing a stressful challenge to resident organisms. Furthermore, they are frequently contaminated by effluents from a series of different human activities. The Bays of Paranaguá and Guaratuba are two large estuarine systems located in Southern Brazil. Intense harbor activities allied to agricultural and urban runoffs in Paranaguá Bay lead to frequent discharge of pollutants. A large oil spill from the explosion of an oil tanker loaded with methanol and bunker oil has occurred in November 2004 in Paranaguá Bay. In contrast, the estuaries of Guaratuba Bay can be considered as relatively uncontaminated. One resident species of fish, the brazilian silverside *Atherinella brasiliensis*, very abundant in both estuaries, has been chosen as bioindicator for the analysis of the chronic effects of the oil spill in Paranaguá. The species was sampled in December 2004 (1 month after the explosion), and again in March 2005 and June 2005, always at 2 locations: one next to the explosion site (A), and another more distantly located (B). Osmolality, ions (chloride and magnesium), and cortisol were determined in the plasma of the fishes. Gills and kidney homogenates were assayed for carbonic anhydrase (CA) and glutathione-S-transferase (GST) activities. Increases in plasma osmolality and chloride, but especially magnesium, were detected in March, along with branchial and CA inhibition. Plasma cortisol increased in March and even more in June. GST activities were unchanged. The application of the particle dispersion model developed to follow up the effects of the oil spill was successful and agreed well with the biomarker results. Effects were stronger at site B, located at the exit of the Bay. This region has probably concentrated not only the hydrocarbons derived from the

accident, but possibly also the regular contaminants found in the Bay. The brazilian silverside, an estuarine resident species, has been shown to be a good bioindicator, and the function of osmoregulation, especially plasma magnesium and cortisol, and branchial carbonic anhydrase have all been shown to be excellent biomarkers for the chronic effects of oil spills in tropical harbor areas.

## 1. Introdução

### **Estuários e suas características ambientais**

Estuários são regiões semi-fechadas de livre conexão com o mar e que sofrem constantes diluições pelas águas continentais. Podem ser considerados como regiões de transição ou ecótonos, pois muitas de suas características os tornam únicos, tais como seus atributos físicos e biológicos (ODUM, 1983; RICKLEFS, 2003; DAY JR *et al.*, 1989). Os nutrientes trazidos pelos rios em conjunto com os sedimentos e nutrientes do fluxo marinho aliados à tendência desses ambientes serem de áreas rasas, contribuem para uma elevada produtividade biológica, proporcionando dessa forma condições para o desenvolvimento e criação de diversas espécies (ODUM, 1983; RICKLEFS, 2003). A região estuarina pode ser considerada ainda como berçário, criadouro e refúgio, abrigando várias espécies de peixes em diversos períodos dos seus ciclos de vida. Beneficia peixes juvenis pela abundância de nutrientes ou ainda pela proteção contra predadores fornecida pelas plantas vasculares, as quais também participam da criação de um ambiente altamente favorável para a reprodução (VENDEL & CHAVES, 2001; e.g SPACH *et al.*, 2003).

### **Complexo Estuarino de Paranaguá e Guaratuba**

As Baías de Paranaguá e Guaratuba são dois sistemas estuarinos do litoral paranaense. O complexo estuarino de Paranaguá (entre 25°16' e 25°34' S e 48°17' e 48°42' W) (Figura 1) está interconectado ao sistema estuarino subtropical que inclui a Baía de Iguape-Cananéia no sudeste do estado de São Paulo (LANA *et al.*, 2000). Esta região pode ser bem definida como compreendendo dois corpos de água, as Baías de Paranaguá e de Antonina no

eixo leste-oeste e as Baías de Laranjeiras e de Pinheiros no eixo norte-sul. Este grande sistema conecta-se ao oceano aberto através de três canais, com o principal deles ao redor da Ilha do Mel (ANGULO, 1992). Este estuário apresenta uma superfície líquida de 612 km<sup>2</sup> (LANA *et al.*, 2000).

A circulação de água na Baía de Paranaguá é principalmente controlada pelo fluxo e refluxo das marés, a descarga de água doce é de 200 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> e a descarga de maré é de 7.862 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> (BIGARELA, 1978). A velocidade das correntes é maior no refluxo, devido ao represamento das águas fluviais, fazendo com que as cunhas de água doce e salgada interajam originando grandes contrastes de salinidade (BIGARELA, 1978). O regime de maré segue um padrão semi-diurno misto com amplitude máxima de aproximadamente 2,0m (KNOPPERS *et al.*, 1987). Os gradientes de salinidade são acentuados variando de 12-34‰, chegando aos 36‰ no setor mais externo do estuário e até 0‰ nas regiões mais internas (LANA *et al.*, 2000). A temperatura da água na região tem média de 23,0 ± 3,6 °C; as médias mais altas ocorrem tipicamente em dezembro, fevereiro e abril, com as menores médias em junho. A temperatura da água varia pouco horizontalmente, mas apresenta uma variação sazonal grande (BRANDINI *et al.*, 1988; LANA *et al.*, 2000). O pH tem média de 8,05 ± 0,32 nas regiões escolhidas para as coletas. O oxigênio dissolvido apresenta grande variação, de 25,80% a 124,22%, com média de 86,42 ± 16,42% (BRANDINI *et al.*, 1988; LANA *et al.*, 2000).

O clima da região, de acordo com Köeppen, é do tipo Cfa, sendo: “C” clima pluvial temperado, “f” sempre úmido com chuvas todos os meses e “a” com temperatura média do mês mais quente acima de 22°C (MAACK, 1968; IPARDES, 1990). O período mais chuvoso corresponde aos meses de verão e

o mais seco aos meses de inverno (ANGULO, 1992). Os ventos da região são provenientes dos quadrantes leste e sudeste com velocidade média de 4,0 e máxima de 25,0 m.s<sup>-1</sup>. A umidade relativa do ar tem média de 85%, e a temperatura média do ar é de aproximadamente 21°C (LANA *et al.*, 2000).

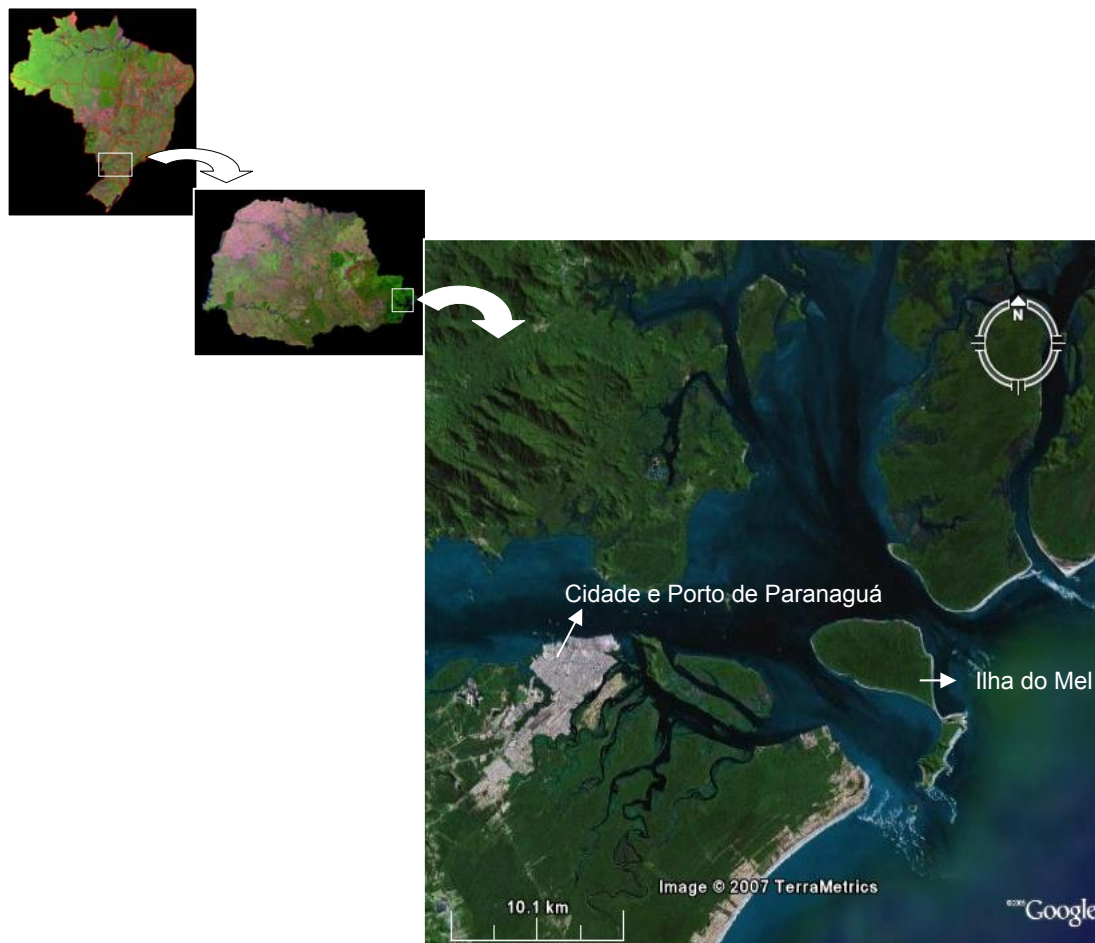


Figura 1. Complexo estuarino de Paranaguá, localizado no litoral do Estado do Paraná, Brasil. Retirado do site [www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

A Baía de Guaratuba é o segundo maior sistema estuarino localizado na região sul do litoral paranaense (25° 52' S; 48° 39' W). É um sistema considerado estuário – manguezal, com uma área de aproximadamente 48,57 km<sup>2</sup> conectada ao Oceano Atlântico através de uma abertura de mais ou menos 500 m (Figura 2). Possui cerca de 15 km de comprimento no eixo leste-oeste e largura de 5 km no eixo norte-sul. A vegetação é típica de manguezal, o fundo

praticamente todo lodoso com a lâmina d'água atingindo profundidades de até 6 m. A salinidade varia sazonalmente entre 37 e 3‰ no inverno e verão, respectivamente, e a temperatura varia entre 15 e 28°C. O clima é do tipo tropical superúmido, sem estação seca definida e isento de geadas (VENDEL & CHAVES, 1998; CHAVES & BOUCHEREAU, 1998; CHAVES & CORRÊA, 1998).

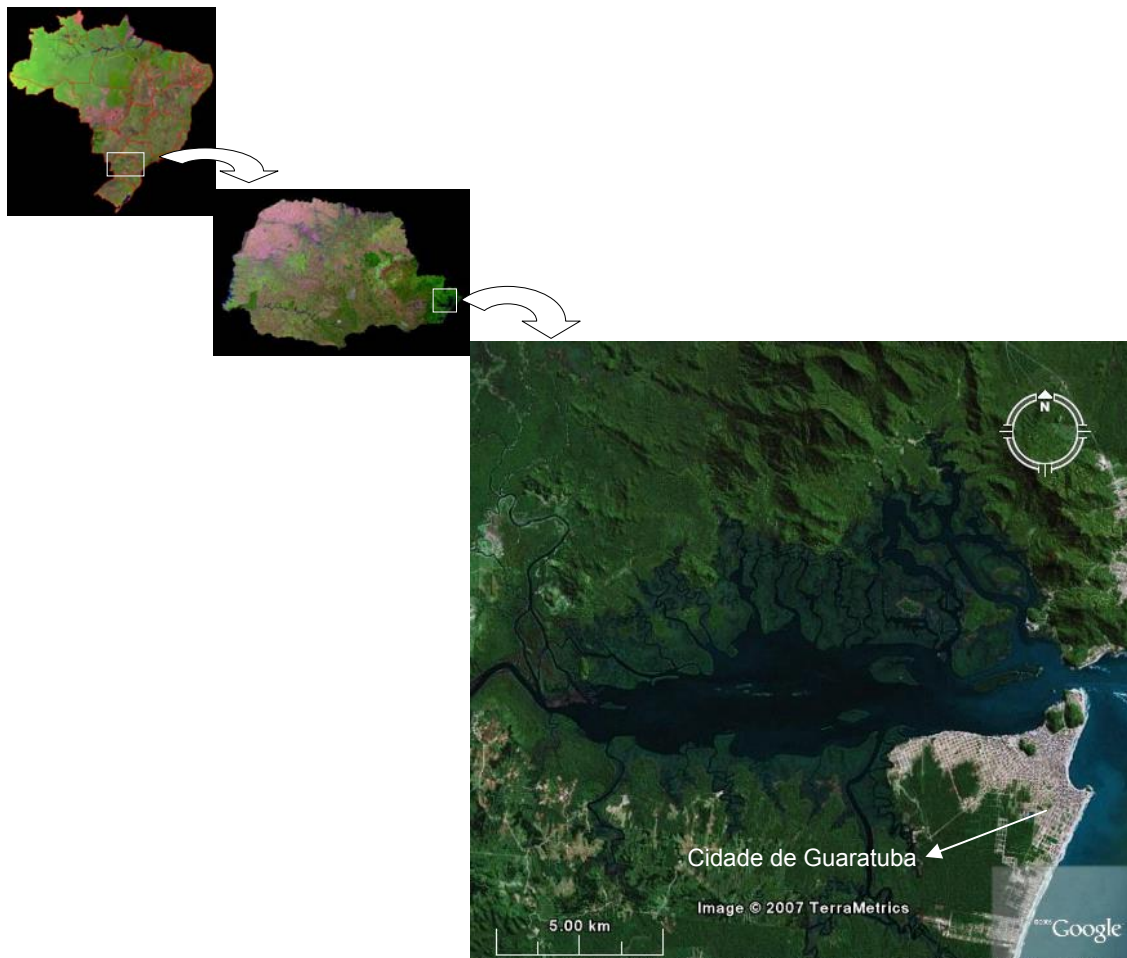


Figura 2. Baía de Guaratuba, localizada no litoral do Estado do Paraná, Brasil. Retirado do site [www.googleearth.com](http://www.googleearth.com).

### **Contaminação ambiental e acidente com o navio chileno Vicuña**

Os efeitos da contaminação sofrida pelos estuários devido à grande ocupação e inseqüente utilização dos mesmos pelo homem vêm se agravando a cada dia nas áreas litorâneas de todo o mundo. Estas regiões

acabam servindo como depósitos de efluentes urbanos e industriais, tais como esgotos, pesticidas usados na agricultura e águas de lastro provenientes de embarcações (KENNISH, 1991). A Baía de Paranaguá abriga o Porto de Paranaguá, o segundo maior porto do Brasil, usado principalmente para atividades de exportação de grãos, fertilizantes, veículos automotivos e petróleo (ROCHA & KREMER, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). Problemas ambientais nesta Baía são principalmente decorrentes das falhas nos processos de embarque e desembarque de produtos químicos nos terminais do Porto de Paranaguá.

No dia 15 de novembro de 2004, o navio petroleiro chileno Vicuña explodiu em um dos terminais deste porto (Figura 3). O navio estava carregado com 4.079,23 toneladas de metanol, 1.240 toneladas de óleo tipo *bunker* (óleo cru, utilizado como combustível para navios), 150 toneladas de óleo diesel e 29.170 litros de óleos lubrificantes. Todo o metanol foi queimado durante a explosão. O navio liberou um total de 1.416 toneladas de óleo no ambiente, sendo 87% de óleo tipo *bunker*. Bóias de contenção (Figura 4) foram, poucas horas depois, colocadas ao redor para conter o vazamento e prevenir uma maior distribuição do óleo, além de reter e remover parte do material espalhado (1,17 milhões de litros de óleo e quase 3 milhões de litros de água oleosa), mas mesmo assim houve intensa contaminação da Baía. Estima-se que aproximadamente 290 mil litros de óleo não foram removidos e conseqüentemente permaneceram no ambiente (o equivalente a 285 toneladas) (IAP – Instituto Ambiental do Paraná/IBAMA, Relatório Técnico, Maio de 2005). Esta quantidade que permaneceu no ambiente se espalhou e atingiu além da Baía de Paranaguá, as Baías de Antonina e Laranjeiras, que

compõem complexo estuarino de Paranaguá, numa extensão de cerca de 30 quilômetros. Manchas de óleo eram visíveis meses após o acidente principalmente na vegetação marginal (Luciana R. de Souza, observação pessoal). O óleo derramado pelo acidente, aliado à contaminação já existente na região, esgoto urbano e descargas de efluentes industriais e de atividade agrícola, qualifica esta região como impactada e ideal para a caracterização das alterações fisiológicas e bioquímicas de animais estuarinos associadas à contaminação ambiental.

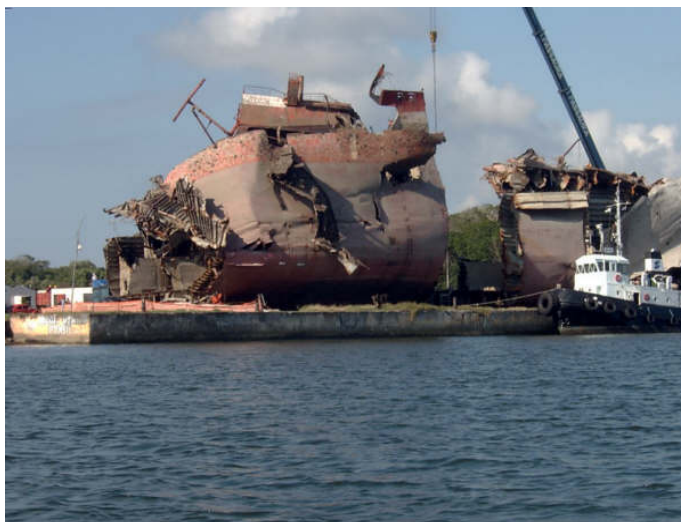


Figura 3. Destroços do navio chileno Vicuña no momento de sua remoção da Baía de Paranaguá. Fonte: [www.ecoplan.org](http://www.ecoplan.org)



Figura 4. Bóias de contenção espalhadas ao redor do terminal portuário onde ocorreu o acidente com o navio chileno Vicuña. Fonte [www.geologia.ufpr.br/cenacid/vicunha](http://www.geologia.ufpr.br/cenacid/vicunha)



A Baía de Guaratuba, o segundo maior sistema estuarino do estado do Paraná, assim como a Baía de Paranaguá, também sofre impacto ambiental pelo uso indiscriminado da região costeira adjacente, principalmente em épocas de veraneio. O despejo de esgotos urbanos das casas localizadas na orla da baía, o grande número de embarcações de pequeno porte utilizadas para passeio ou pesca, ou as de grande porte utilizadas para a travessia Guaratuba – Caiobá (“Ferry – Boat”) agravam a situação (KRUEGER, 2004). Na Baía de Guaratuba, existem focos pontuais de contaminação (KRUEGER, 2004). A região onde foi realizada a coleta não está entre estes locais e não sofre a influência de derramamentos de petróleo. A Baía de Guaratuba, uma Área de Proteção Ambiental (APA), possui uma região bem preservada, com vegetação nativa intacta, sem construções, o que caracteriza o local como relativamente livre de contaminação, podendo ser utilizada na caracterização das condições fisiológicas e bioquímicas normais associadas a um ambiente estuarino (KRUEGER, 2004).

### **Poluentes e hidrocarbonetos de petróleo como foco da pesquisa**

Biomarcadores têm sido extensivamente utilizados para a caracterização das reações de muitos organismos frente a contaminantes e poluentes ambientais. Dentre estes contaminantes podemos citar: metais pesados (e.g. Al, Cu, Pb) (e.g. REGOLI & PRINCIPATO, 1995), hidrocarbonetos derivados de petróleo (e.g. VAN DER OOST *et al.*, 2003; ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005), inseticidas e biocidas (e.g. ZANETTE *et al.*, 2006), entre outros.

Hidrocarbonetos derivados de petróleo são comuns causadores de grandes focos de contaminação em ambientes aquáticos por serem provenientes de várias atividades antrópicas, mas principalmente em consequência de acidentes com navios petroleiros. Estes compostos têm levantado interesse significativo por causarem diversos efeitos subletais ou letais em vários organismos aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005). A toxicidade aguda destes compostos pode causar danos morfológicos, histopatológicos e genéticos em diversos organismos (KENNEDY & FARRELL, 2005).

Esses poluentes inicialmente causam alteração estrutural nas biomoléculas dos organismos aquáticos, e posteriormente levam a alteração das propriedades funcionais dessas moléculas envolvidas nos processos biológicos (AMADO *et al.*, 2006b). Os componentes mais tóxicos do óleo tipo *bunker*, derivado do petróleo, são o benzeno, tolueno e xileno. Estes são os compostos mais solúveis em água (principalmente o benzeno) o que torna os organismos aquáticos mais vulneráveis (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Além disso, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são muito resistentes à degradação biológica persistindo por um longo período de tempo no ambiente (IAP – Instituto Ambiental do Paraná/IBAMA, Relatório Técnico, Maio 2005). Por estes motivos, têm sido intensificados os estudos sobre os efeitos destes compostos nos organismos aquáticos. Dentre os vários estudos realizados, as espécies de peixes têm atraído a maior atenção dos pesquisadores, principalmente pelo fato de boa parte delas servirem de alimento ao seres humanos (AMADO *et al.*, 2006a, b).

Diversas alterações biológicas têm sido relatadas para a exposição de peixes a concentrações subletais de variados contaminantes (e.g. metais pesados, inseticidas, biocidas): distúrbios osmorregulatórios (e.g. SANTOS & PACHECO, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2005; CAMARGO & MARTINEZ, 2006; KENNEDY & FARRELL, 2005), decréscimo no número de células de cloreto e na atividade das ATPases branquiais (e.g. MONTEIRO *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005), aumento na expressão de proteínas de estresse (e.g. AMADO *et al.*, 2006 a, b), liberação de cortisol (e.g. PACHECO & SANTOS, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005; CAMARGO & MARTINEZ, 2006), aumento da atividade do sistema antioxidante (e.g. RONISZ, *et al.*, 1999; AMADO *et al.*, 2006 a, b; ZANETTE *et al.*, 2006), aumento da atividade de enzimas hepáticas de detoxificação (e.g. RONISZ, *et al.*, 1999; AMADO *et al.*, 2006 a, b; CAZENAVE *et al.*, 2006), mudanças histopatológicas no epitélio branquial, (e.g. KÜLTZ, 1996; SANTOS & PACHECO, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2005), danos em biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas (e.g. REGOLI & PRINCIPATO, 1995; PACHECO & SANTOS, 2001; AMADO *et al.*, 2006 a, b; ZANETTE *et al.*, 2006).

A longo prazo, de acordo com o agente estressor e tempo de exposição, estas alterações podem gerar, por exemplo, redução na capacidade reprodutiva ou tolerância aos fatores de estresse (e.g. KENNEDY & FARRELL, 2005). A contaminação do animal ocorre através da superfície respiratória branquial, responsável pela absorção direta de substâncias presentes na água, ou através da ingestão de água e alimento contaminado, podendo comprometer assim o funcionamento de brânquias, trato gastrointestinal, fígado e rins (KENNEDY & FARRELL, 2005). Em geral, os compostos tóxicos acabam

gerando uma resposta integrada, envolvendo diversos sistemas e a liberação de várias substâncias para conter ou minimizar os efeitos tóxicos no metabolismo (KENNEDY & FARRELL, 2005).

A capacidade de adaptação fisiológica de peixes de água doce à exposição a poluentes tem sido foco freqüente de investigação (e.g. DORVAL *et al.*, 2003; ARASHISAR *et al.*, 2004; HERBERTS *et al.*, 2005). Por exemplo, foi verificado que a dinâmica do cortisol plasmático é alterada pela presença de detergentes sintéticos em *Hypostomus* sp. (HERBERTS *et al.*, 2005). Ainda assim, parâmetros indicativos de estresse, a própria secreção de cortisol e a expressão de proteínas de estresse não estão satisfatoriamente caracterizados de forma geral em peixes (BARTON, 2002; IWAMA *et al.*, 2004), em especial em regiões de estuário (YAMASHITA *et al.*, 2003). Existem alguns trabalhos com espécies transientes em estuários (LIONETTO *et al.*, 1998; PACHECO & SANTOS, 2001) e/ou peixes estuarinos (GOKSOYR *et al.*, 1996; AMADO *et al.*, 2006a, b) que enfatizam os efeitos das variáveis ambientais, características de estuários, quando associados à contaminação ambiental, sobre as respostas apresentadas pelos peixes. Além disso, a maioria dos estudos relata os efeitos de metais e pesticidas sobre as respostas de estresse destes animais. Contudo, não foram encontrados estudos com peixes relatando os efeitos dos derramamentos de petróleo sobre as respostas fisiológicas de estresse em geral, ou de fisiologia osmorregulatória em particular.

### **Biomarcadores e contaminação**

Biomarcadores são definidos como alterações biológicas, moleculares e comportamentais geradas nos tecidos ou fluidos corpóreos de organismos que

sofrem efeitos pela exposição aos fatores estressantes naturais ou por xenobióticos (DEPLEDGE *et al.*, 1995; LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Os biomarcadores podem ser divididos em três categorias: 1) biomarcadores de exposição - que refletem apenas a exposição e reações do organismo ao poluente; 2) biomarcadores de efeitos - que refletem a exposição e efeitos tóxicos dos poluentes sobre as biomoléculas do organismo, e 3) biomarcadores de susceptibilidade – que quantificam efeitos percebidos nos níveis de população, comunidade e ecossistema (LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998; VAN DER OOST *et al.*, 2003; ZANETTE, *et al.*, 2006). Estas categorias de biomarcadores são freqüentemente utilizadas na caracterização das alterações biológicas geradas pela exposição a diversos tipos de contaminação.

Os descartes de dejetos urbanos e industriais ou portuários, ou ainda da aplicação de biocidas e inseticidas, incluem várias categorias químicas de contaminantes. Dentre estes contaminantes, podemos encontrar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), compostos organoclorados, organometálicos e metais pesados (e.g. ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005). A presença de contaminantes nestes ambientes é acompanhada pelo aumento da matéria orgânica na água, pela diminuição do teor de oxigênio dissolvido, da transparência da água e ainda pelo aumento de compostos de nitrogênio e fósforo. Assim, animais que habitam estas regiões são expostos diretamente a estes fatores, em adição ao estresse natural das variações normais na salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH, características dos estuários.

Perturbações internas no organismo dos peixes, como resultado de alterações do ambiente, geram respostas compensatórias que, se não forem

suficientes podem levar à morte do animal (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002). Adicionalmente, o metabolismo de compostos tóxicos freqüentemente resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (e.g. HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002; CAZENAVE *et al.*, 2006). As formas reativas de oxigênio (ânion superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  e metais de transição) são convertidas em formas tóxicas de radicais livres, por exemplo,  $OH^\bullet$  e  $ONO_2$  (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002), altamente nocivas ao organismo. Deste modo, quando a taxa de formação de ERO é excessiva acaba superando a capacidade fisiológica dos organismos de eliminá-las ou anulá-las, criando a situação de estresse oxidativo (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002). Esse processo pode também ser definido como o reflexo do desequilíbrio existente entre a produção e a remoção destes produtos oxidantes (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002; GUERREIRO *et al.*, 2002). Quando os mecanismos de defesa do animal, responsáveis pela remoção destes compostos são inadequados ou insuficientes, aumenta o nível de estresse oxidativo de tecidos animais, com dano às suas macromoléculas, o que pode até acarretar a morte (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002).

Os radicais livres estão envolvidos com condições patológicas em animais. Eles reagem com macromoléculas orgânicas prejudicando todo o metabolismo animal. Dentre as reações geradas por estes compostos estão: inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos ao DNA e até morte celular (CAZENAVE *et al.*, 2006). Para proteger as células da toxicidade gerada por radicais livres, o organismo possui um sistema antioxidante. As formas de defesa antioxidantes contra esses radicais incluem as formas enzimáticas e não enzimáticas. As formas de defesas enzimáticas são: catalase (CAT),

glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase dependente de selênio (Se-GPX), glutathione peroxidase selênio independente (GPX), todas as isoformas de superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (HERMES-LIMA *et al.*, 1998; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002; ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005). As formas não enzimáticas de defesas antioxidante incluem: glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, vitaminas C, E,  $\beta$  - caroteno, polifenóis e bilirrubinas (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002; ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005; ZANETTE *et al.*, 2006).

Estas respostas do sistema antioxidante, aliadas às alterações fisiológicas (alterações osmóticas e iônicas, por exemplo) dos animais, são ferramentas úteis para a caracterização dos efeitos diretos e indiretos dos contaminantes, sendo essenciais para o controle e reparo de danos gerados por radicais livres, são por isso consideradas como bons biomarcadores (ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005; AMADO *et al.*, 2006a).

Neste estudo foram verificados alguns marcadores fisiológicos, (osmolalidade, íons e cortisol plasmáticos) e bioquímicos (as enzimas anidrase carbônica e glutathione S-Transferase) por estarem envolvidos no processo de biotransformação de agentes estressores e por contribuírem na identificação, bem como na inibição ou redução dos efeitos destes agentes no metabolismo animal.

### **Variações abióticas, contaminação e as respostas fisiológicas e bioquímicas de animais de estuários frente a estas variáveis.**

Além da presença de contaminantes na água, ambientes estuarinos sofrem constantemente a variação normal em seus parâmetros abióticos (turbidez, teor de oxigênio, salinidade, temperatura, pH). Estas regiões representam uma interface entre o ambiente marinho e o dulcícola. São regiões de rápidas e grandes variações devido aos movimentos de marés e conseqüente troca de substâncias entre estes dois corpos d'água. Todas essas alterações geram estresse aos animais que habitam regiões estuarinas e de entre – marés (HOFMANN, 1999; SCHILL *et al.*, 2002; TOMANEK & SOMERO, 2000, 2002). Se o organismo é exposto a um estímulo estressor tem sua homeostase desafiada. Homeostasia é o equilíbrio metabólico, ou seja, é a habilidade de manter a estabilidade do meio interno por meio de sistemas de controle fisiológicos (RANDALL *et al.*, 1999; SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

As alterações no meio interno podem ter duas origens: primeiro, as próprias atividades metabólicas através das necessidades de suprimentos constantes de energia e descarte de resíduos e segundo, as respostas às alterações no meio externo. Por exemplo, quando ocorre uma alteração na salinidade da água, os animais podem responder de duas maneiras: permitindo alterações na osmolalidade do seu líquido extracelular (LEC) de modo a manter-se isosmótico (do grego ISO = igual) em relação ao meio, em comportamento osmoconformador. Alternativamente, podem gastar energia transportando íons e regulando a osmolalidade de seu LEC mantendo-se em comportamento osmorregulador, garantindo a homeostasia (i.e., estabilidade) (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Peixes teleósteos em geral são



osmorreguladores, podendo ser hipo-osmóticos (menos concentrados que o meio) quando habitam os oceanos, mas também hiper-osmóticos (mais concentrados que o meio) quando habitam água doce. Em ambientes estuarinos, em certos momentos são hiper-osmóticos e em outros momentos são hipo-osmóticos.

A tolerância de variação de salinidade de um organismo é dependente da capacidade de regulação osmótica e iônica, ou seja, quanto maior a habilidade de manter os gradientes osmóticos e iônicos em condições favoráveis ao funcionamento metabólico normal, maior a capacidade de invadir ambientes que sofrem constantes alterações, como os estuários (GENOVESE *et al.*, 2005). A essa capacidade de tolerância e adaptação a ampla variação de salinidade dá-se o nome de eurialinidade (JOBBLING, 1995). Em especial, espécies estuarinas possuem diferentes estágios de adaptação a eurialinidade, e a maioria das espécies é capaz de se adequar da água doce à salgada (JOBBLING, 1995).

Todavia, só recentemente foram realizados trabalhos que dão ênfase ao estresse gerado pelo ambiente estuarino e os mecanismos e capacidade osmorregulatória de que os animais dispõem para lidar com esses desafios. A rápida e acentuada variação de salinidade, típica dos estuários, representa um desafio para a osmorregulação dos peixes residentes. Verificou-se que o estresse salino ativa a liberação e o aumento da expressão de marcadores como o cortisol e enzimas de proteção antioxidante em situações de mudanças de salinidade (estresse salino) (ROCHE & BOGÉ, 1996; MARTINEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002).

Além da variação na salinidade, estudos relacionados às variações cíclicas de oxigênio dissolvido também têm sido realizados (e.g. SAMPAIO & BIANCHINI, 2002; PRODOCIMO & FREIRE, 2001, 2004; LOVE & REES, 2002). O trabalho de ROSS e colaboradores (2001), por exemplo, relata a manutenção de peixes em gaiolas *in situ* por duas semanas em ambientes estuarinos rasos. Estes ambientes impõem aos animais situações constantes de variações cíclicas de oxigênio dissolvido (hipóxia, hiperóxia e anóxia). Esses autores chegaram à conclusão de que a variação de oxigênio dissolvido, apesar de normal em ambiente estuarino, aumenta a formação de ERO causando um efeito estressante aos peixes. Esta variação do oxigênio, em especial a supersaturação, leva ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes para combater a formação de ERO e ou seus efeitos no metabolismo. Este aumento na expressão de enzimas antioxidantes é apenas uma das inúmeras respostas utilizadas pelos animais em situações de estresse, principalmente se esta variação de oxigênio estiver associada a eutrofização ou poluição destes ambientes.

O aumento nas descargas de efluentes agrícolas, domésticos e industriais nas regiões estuarinas traz a necessidade da utilização de marcadores confiáveis para a caracterização da contaminação da água. Em adição, ambientes estuarinos freqüentemente incluem portos com atividades de cargas/descargas de metais, intenso tráfego de navios e riscos de derramamentos de petróleo (KENNISH, 1991). De qualquer forma, para espécies de peixes estuarinas residentes ainda existe uma lacuna. É necessário conhecer melhor as respostas destas espécies, principalmente associando os fatores de variação normal aos efeitos gerados pelos

contaminantes ambientais, para que esses dados possam servir de base para estudos subseqüentes de resposta aos poluentes nestas regiões. São raros estudos sobre a caracterização das alterações fisiológicas e bioquímicas de peixes expostos a graus elevados de contaminação (ambiente impactado), comparada às respostas fisiológicas e bioquímicas normais de peixes de um ambiente livre de contaminação (não impactado) (e.g. AMADO *et al.*, 2006 a, b) e inexistentes os estudos que comparam estes ambientes com relação a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

## **Marcadores Utilizados**

### **Osmorregulação**

Osmorregulação é a função de regulação da concentração osmótica e de íons do líquido extracelular, ou meio interno do animal. É a capacidade do organismo de manter ativamente (com gasto energia) a homeostasia osmótica do seu fluido extracelular (JOBBLING, 1995; RANDALL *et al.*, 1999; SCHMIDT-NIELSEN, 2002). É esta capacidade fisiológica que permite aos peixes estuarinos sobreviverem em ambientes mais diluídos ou mais concentrados do seu próprio meio interno, ou seja, sobreviver e manter suas funções em águas de salinidade variável. As concentrações ideais dos fluidos corpóreos dos animais muitas vezes são diferentes da concentração do meio em que vivem, principalmente para os vertebrados. Em ambientes marinhos, as concentrações externas são significativamente maiores do que as concentrações do peixe (EVANS, 1993; JOBBLING 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 2002; SKAGGS & HENRY, 2002). Teleósteos marinhos, por exemplo, possuem uma osmolalidade pouco acima de um terço da concentração do ambiente em que

vivem (EVANS, 1993; RANDALL *et al.*, 1999), em torno de 400 mOsm/kgH<sub>2</sub>O, enquanto a osmolalidade da água do mar é de ~1000 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (PROSSER, 1973; JOBLING, 1995).

A tendência em água do mar é a de o peixe perder água e ganhar íons (JOBLING, 1995). Para resistir a essa alteração os peixes ingerem água do mar em quantidades de cerca de ~ 5 a 20% do seu peso corpóreo (JOBLING, 1995; GROSELL & GENZ, 2006). A água ingerida tem suas concentrações alteradas para concentrações similares ao fluido extracelular (350mOsm/kgH<sub>2</sub>O) ao longo do trato gastrointestinal (PARMELEE & RENFRO, 1983; GROSELL & GENZ, 2006).

A osmorregulação é realizada nas brânquias, rins, trato gastrointestinal e bexiga urinária (MARTINEZ *et al.*, 2005). As brânquias e os rins dos peixes constituem os principais contatos do organismo com seu ambiente. A brânquia é um órgão excretor especializado e um importante local de transporte de íons em teleósteos. Este epitélio é composto por diferentes tipos celulares (células de cloreto, mucosas e pavimentosas) (KÜLTZ, 1996). Por serem extremamente permeáveis, uma vez que são envolvidas nas trocas de gases entre o sangue e o meio, passam também a exercer a função de transporte de sais, sendo responsáveis pela manutenção dos equilíbrios iônicos excretando sódio e cloreto (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) por transporte ativo. Além disso, as brânquias auxiliam na excreção de produtos nitrogenados e no equilíbrio ácido-base (EVANS, 1993).

Em peixes, o epitélio branquial tem o papel central nos processos de estresse osmótico (perturbação da homeostase iônica e osmótica) (RANDALL *et al.*, 1999). Em situações de estresse osmótico podem ocorrer algumas alterações morfo-fisiológicas no epitélio branquial incluindo: síntese ou

destruição de componentes moleculares do sistema de transporte, variações na morfologia e no número de células de cloreto. Para sinalizar alterações e mediar respostas de adaptação ao estresse osmótico no animal ocorre a liberação de hormônios como o cortisol, hormônio do crescimento e prolactina. Estes hormônios vão auxiliar o animal a encontrar a homeostase favorecendo a excreção de sal (RANDALL *et al.*, 1999).

O rim, órgão envolvido nos processos de regulação osmótica e iônica, é o principal responsável pelo transporte de íons divalentes (BEYENBACH *et al.*, 1993, 1997; RANDALL *et al.*, 1999). Os rins têm um importante papel na regulação iônica de teleosteos marinhos e de água doce (KATOH *et al.*, 2006). O principal íon excretado e transportado pelos rins é o magnésio ( $Mg^{2+}$ ). O equilíbrio de  $Mg^{2+}$  em peixes eurialinos é garantido pelo túbulo proximal renal destes animais. Através desta estrutura, estes animais tanto secretam quanto absorvem  $Mg^{2+}$  (BEYENBACH *et al.*, 1993, 1997; PRODOCIMO & FREIRE, 2001). Além disso, na primeira porção do túbulo proximal também são reabsorvidos compostos como cloreto de sódio, açúcares e aminoácidos (CLIFF *et al.*, 1986; JOBLING, 1995). A excreção de produtos nitrogenados e ácidos orgânicos é realizada pelos néfrons (CLIFF *et al.*, 1986; JOBLING, 1995). Deste modo, analisar possíveis disfunções osmorregulatórias decorrentes de prejuízo renal em peixes sujeitos a contaminação é de suma importância para entender os danos à homeostasia do animal.

O trato gastrointestinal, também envolvido nos processos osmorregulatórios, é responsável por manter a absorção de sais e água para garantir, em associação com os epitélios branquial e renal, o equilíbrio hídrico e osmótico (PARMELEE & RENFRO, 1983; EVANS, 1993; JOBLING, 1995;

GROSELL & GENZ, 2006). Após ser ingerida, a água do mar, necessária para o equilíbrio osmótico e iônico de teleósteos marinhos é modificada ao longo do trato gastrointestinal pela absorção de água e NaCl. Inicialmente a água ingerida é diluída pela secreção gástrica. Quando o fluido alcança o intestino, é novamente alterado por diluição, devida a secreção adicional de fluidos intestinais, ou ainda por remoção de sal, tendo desta forma suas concentrações alteradas de 1000mOsm/kgH<sub>2</sub>O para 350mOsm/kgH<sub>2</sub>O (PARMELEE & RENFRO, 1983; GROSELL & GENZ, 2006). Esse processo é mediado pela ação de várias proteínas de transporte, entre elas a bomba de prótons (H<sup>+</sup>ATPase), os trocadores de cátions (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) e de ânions (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e ainda o co-transportador Na/K/2Cl (GROSELL & GENZ, 2006).

### **Anidrase Carbônica**

A anidrase carbônica (AC) é uma enzima envolvida no processo geral de osmorregulação, e está presente tanto no epitélio branquial quanto no renal (SKAGGS & HENRY, 2002). A AC é encontrada em diferentes tecidos e organelas celulares, desde cianobactérias unicelulares até mamíferos (HENRY, 1996). Esta enzima catalisa a reação reversível de hidratação do CO<sub>2</sub> acelerando o processo de formação dos íons bicarbonato e hidrogênio (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup>) (ARASHISAR *et al.*, 2004; RANDALL & BRAUNER, 1998; VITALE *et al.*, 1999; SKAGGS & HENRY, 2002; PERRY & GILMOUR, 2006). A ação da enzima AC permite o transporte de íons que usam os produtos dessa reação (e.g. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Em invertebrados aquáticos esta enzima é essencial e decisiva para a osmorregulação (SKAGGS E HENRY, 2002).

Quatorze isoformas desta enzima (isoenzimas) foram descritas em vertebrados, participando de processos como calcificação, trocas gasosas e equilíbrio do pH fisiológico (ARASHISAR *et al.*, 2004). Nas brânquias dos peixes esta enzima participa de trocas gasosas, regulação osmótica e iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados. A distribuição da AC ao longo das brânquias depende do habitat e comportamento osmorregulatório de cada animal (ARASHISAR *et al.*, 2004), ou seja, animais de água doce e salgada vão apresentar respostas enzimáticas diferentes. Verificou-se ainda que a atividade desta enzima em peixes é maior em brânquias do que nos rins e é totalmente ausente no plasma (RANDALL & BRAUNER, 1998).

A inibição da AC pode retratar satisfatoriamente os efeitos ambientais, sendo considerado um bom marcador para detectar efeitos da exposição aos poluentes químicos em organismos aquáticos (ARASHISAR *et al.*, 2004). Foi observada inibição da AC em peixes pela ação de sulfonamidas, desinfetantes, amônia, uréia, antibióticos (ARASHISAR *et al.*, 2004), metais pesados como prata, cobre, zinco (SKAGGS & HENRY, 2002) e cádmio (LIONETTO *et al.*, 1998). Contudo, não existem trabalhos caracterizando a resposta desta enzima em peixes por ação de hidrocarbonetos de petróleo.

### **Glutationa S-transferase**

Outra enzima muito utilizada como biomarcador de contaminação ambiental é a Glutationa S-Transferase (GST). As GSTs são uma superfamília de enzimas de conjugação citosólica; suas atividades são muito importantes por prevenirem reações de eletrólises nas proteínas, DNA e RNA (RONISZ *et*

*al.*, 1999). Estão ainda envolvidas na proteção celular aos produtos metabólicos oxidativos e aos xenobióticos (ZANETTE *et al.*, 2006). Esta enzima é um dos principais biomarcadores bioquímicos utilizados em resposta a condições de estresse, inclusive em ambientes estuarinos, por agir como catalisadora de vários tipos de reações entre a glutatona e compostos xenobióticos (REGOLI & PRINCIPATO, 1995).

### **Cortisol**

Além destas enzimas, um marcador clássico utilizado para a determinação de situações de estresse em peixes é o cortisol. O cortisol é um hormônio muito importante para os vertebrados. Este hormônio está envolvido em muitas funções, como: na resposta imunológica, osmorregulação, reprodução, crescimento e respostas ao estresse tanto em peixes como em outros vertebrados (MOMMSEN *et al.*, 1999; HICKMAN *et al.*, 2004). O cortisol é um corticosteróide liberado em grandes concentrações em peixes, em situações de estresse (KENNEDY & FARRELL, 2005). Em peixes, o cortisol, em associação ao hormônio do crescimento, relaciona-se com a adaptação às mudanças de concentrações ambientais, em especial em teleósteos eurialinos e anádromos (MADSEN, 1990). Ele participa da função de manutenção da estabilidade da osmolalidade extracelular diante de estresse salino (VEILLETTE *et al.*, 1995; PACHECO & SANTOS, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005).

Dentre suas atuações na função da osmorregulação, o cortisol gera: 1) aumento na permeabilidade iônica em órgãos como o intestino e o esôfago, 2) aumento na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nas brânquias, intestino e rim,



3) estímulo da diferenciação das células de cloreto nas brânquias e ainda 4) inibição da necrose celular de modo a melhorar a capacidade hiposmorregulatória (secreção de sal) de peixes marinhos (MADSEN, 1990; VEILLETTE *et al.*, 1995; PACHECO & SANTOS, 2001; KENNEDY & FARRELL, 2005). O cortisol é assim ao mesmo tempo sinalizador de estresse, e mediador da resposta de adaptação a aumentos de salinidade, favorecendo a excreção de sal. Este hormônio é necessário em situações de desequilíbrio hidromineral, pois uma disfunção no processo osmorregulatório em peixes pode prejudicar todo o sistema fisiológico e levar a uma conseqüente mortalidade.

### **O peixe-rei estuarino, *Atherinella brasiliensis***

Os peixes distribuem-se entre os variados habitats marinhos, estuarinos e de água doce (ARAÚJO *et al.*, 2004). Nas regiões estuarinas são a maioria (99%) dentre as espécies (ARAÚJO *et al.*, 2004). Os peixes são extremamente importantes para os estudos de evolução temporal e dos fluxos energéticos em estuários, sendo determinantes em estudos ecológicos e biológicos deste ambiente (CORRÊA, 1987). Constituem fatores chaves na transformação do potencial energético dos detritos, seja consumindo-os diretamente ou indiretamente na ingestão de organismos detritívoros; trocando energia entre os ecossistemas (através do ato de migrar) ou armazenando energia quando residentes (ARAÚJO *et al.*, 2004).

A espécie utilizada neste estudo foi o peixe-rei *Atherinella brasiliensis*, QUOY & GAIMARD, 1824, (Figura 5) que, dentre os peixes das Baías de Paranaguá e Guaratuba, se destaca por sua elevada abundância. Pertence a

Superordem Acanthopterygii, Ordem Atheriniformes, Família Atherinopsidae, sendo esta composta por cerca de 46 gêneros e 200 espécies.



Figura 5. Exemplar de *Atherinella brasiliensis*, espécie utilizada neste estudo. Fonte: [www.katembe.com/peirei.htm](http://www.katembe.com/peirei.htm)

Esta espécie apresenta ampla distribuição (NELSON, 1994) na América do Sul, desde a Venezuela até o Rio Grande do Sul, aparecendo com maior frequência em águas costeiras, principalmente na desembocadura de rios, em regiões de água salobra (FIGUEIREDO & MENEZES, 1978, 2000). É considerada uma espécie estuarina residente e/ou constante em alguns estuários, como no caso da Baía de Paranaguá e Guaratuba, onde realizam todo o seu ciclo de vida (da fase ovo até adulto) (ANDREATA *et al.*, 1990; ARAÚJO *et al.*, 1997). Todos os estádios de desenvolvimento gonadal foram observados em exemplares coletados na Baía de Paranaguá, podendo ser considerada uma espécie que completa seu ciclo reprodutivo dentro do estuário (FÁVARO *et al.*, 2003). As fêmeas colocam ovos demersais presos à vegetação. Apresenta pouca migração entre os diferentes ambientes estuarinos, geralmente permanecendo nas áreas onde nasceram. A espécie fica, deste modo, sujeita a efeitos da poluição desde a fase embrionária, devido ao seu contato direto com o meio.

*A. brasiliensis* alimenta-se de zooplâncton na fase juvenil e de organismos bentônicos da infauna e epifauna na fase adulta (CARVALHO,

1953; BEMVENUTI, 1984). Seus espécimes atingem cerca de 10 a 16 cm. A espécie não é considerada de grande interesse comercial, porém a sua grande abundância faz com que seja utilizada pelas comunidades pesqueiras em determinadas épocas do ano como complemento de renda, ou mesmo diretamente como alimento (VOLCKER & ANDREATA, 1982).

Em estudos de abundância e diversidade da ictiofauna nos locais propostos para coleta, o peixe-rei *Atherinella brasiliensis* foi a espécie capturada em maior número de indivíduos, sendo encontrada em grandes números tanto no local proposto como referência (Baía de Guaratuba), quanto na região impactada (Baía de Paranaguá) (e.g. FALCÃO, 2005; VENDEL *et al.*, 2003). Os trabalhos realizados com esta espécie até este momento restringem-se a reprodução, distribuição, abundância e hábitos alimentares (PESSANHA & ARAUJO, 2001; SANTOS *et al.*, 1999; BEMVENUTI, 1987, 1990; PAIVA FILHO & GIANNINI, 1990), não havendo estudos da sua fisiologia.

## 2. Objetivos

**OBJETIVO GERAL:** Caracterizar o curso temporal das respostas fisiológicas e bioquímicas de uma espécie abundante e residente no estuário (*Atherinella brasiliensis*, peixe-rei), decorrentes do estresse de um ambiente estuarino contaminado por petróleo na Baía de Paranaguá, Paraná. Comparar a resposta à dos peixes-rei de um ambiente estuarino não contaminado, na Baía de Guaratuba, Paraná.

**OBJETIVO ESPECÍFICO:**

- Caracterizar parâmetros fisiológicos (osmolalidade, concentração de íons magnésio e cloreto e do cortisol plasmáticos) e atividade das enzimas anidrase carbônica (AC) e glutathione S-Transferase (GST) desta espécie, como diagnóstico da função branquial e função renal diante dos poluentes da Baía de Paranaguá, Paraná, em especial após o derramamento de óleo do acidente com o Navio Chileno Vicuña.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 COLETA DOS ANIMAIS EM AMBIENTE CONTAMINADO, BAÍA DE PARANAGUÁ E NO AMBIENTE REFERÊNCIA, BAÍA DE GUARATUBA.**

Os exemplares de *Atherinella brasiliensis* do local contaminado por petróleo (explosão do navio chileno Vicuña), Baía de Paranaguá (entre 25°16' e 25°34' S, 48°17' e 48°42'W), foram coletados em intervalos trimestrais, respectivamente nos meses de Dezembro 2004 (dias 16 e 17), Março 2005 (16 e 17) e Junho 2005 (16 e 17). Cada uma das coletas foi realizada ao longo de dois dias, ou seja, cada ponto foi amostrado em um dia, de modo a minimizar o estresse animal causado pela longa permanência dos mesmos em caixas de isopor no laboratório de campo. Deste modo, foi possível verificar os efeitos da contaminação do derramamento de petróleo por um período de 7 meses.

Os peixes foram sempre amostrados em dois pontos da Baía. O ponto A localizado mais próximo ao terminal portuário da empresa Catallini, onde ocorreu a explosão do navio chileno Vicuña (ponto de maior contaminação) e o ponto B o mais afastado ao epicentro do acidente (ponto de menor contaminação). A distância entre o ponto A e B é de aproximadamente 6 Km (Figura 6). Os peixes foram coletados através de redes de arrasto do tipo picaré (30 m de comprimento X 3,0 m de altura; 2,0 m de boca com malhagem de 0,5 cm entre os nós adjacentes), em uma profundidade de aproximadamente 1 – 1,5 m. Em cada um dos pontos contaminados amostrados foram coletados aproximadamente 40 exemplares de peixes-rei, *Atherinella brasiliensis*. Peixes de outras espécies eventualmente capturados foram imediatamente devolvidos ao local de coleta. Após o processamento os animais que restavam eram devolvidos a natureza.

Os exemplares de *A. brasiliensis* capturados foram mantidos vivos acondicionados em caixas de isopor de aproximadamente 100 L com água do local e aeração constante até chegarem ao laboratório do CEM (Centros de Estudos do Mar, UFPR – Pontal do Paraná), onde ocorreu o processamento das amostras. Estes peixes foram anestesiados com 10 ml de Benzocaina ( $200\text{mg.L}^{-1}$ ) e após anestesia completa ( $\Delta t = 5 \text{ min}$ ), foram pesados e medidos e tiveram suas cavidades abdominais abertas para a retirada de amostras de sangue por sucção cardíaca, brânquias e rim. A média de peso e comprimento dos peixes obtidos na Baía de Paranaguá foi respectivamente  $11,24 \pm 0,11 \text{ g}$  e  $9,76 \pm 0,27 \text{ cm}$ ,  $n=84$ .



Figura 6. A - Localização do local do acidente ocorrido no dia 15 de Novembro de 2004 (\*) e dos pontos de coleta na Baía de Paranaguá (Ponto A e Ponto B). B - Fotografia do local de coleta (Ponto A), ponto mais próximo ao local do acidente com o navio petroleiro Vicuña. C – Fotografia do local de coleta (Ponto B), ponto mais distante do local do acidente com o navio petroleiro Vicuña.

Os exemplares de *A. brasiliensis* do local referência, livre de contaminação por petróleo, foram amostrados na Área de Proteção Ambiental (APA) da Baía de Guaratuba (25° 52' S; 48° 39' W) (Figura 7). Este ponto foi amostrado no mês de Abril 2006 (dias 23 e 24) e serviu para a caracterização dos parâmetros osmorregulatórios e atividades enzimáticas normais desta espécie estuarina. No ponto referência, os peixes foram coletados através de tarrafas (4,0 m de diâmetro de boca com malhagem de 1,0 cm entre os nós adjacentes) lançada do barco ou da base de cultura de mariscos localizada no meio da Baía. Os 50 espécimes coletados neste ponto foram mantidos vivos acondicionados em caixas de isopor de aproximadamente 100 L com água do local onde foram capturados e com constante aeração até chegarem ao laboratório local (Baía de Guaratuba) onde ocorreu o processamento das amostras. Destes 50 peixes, 19 peixes foram anestesiados, medidos e pesados e após anestesia total, tiveram suas cavidades abdominais abertas para a retirada de sangue, brânquias e rim. A média de peso e comprimento dos peixes obtidos na Baía de Guaratuba foi respectivamente  $12,83 \pm 0,16$  g,  $14,62 \pm 0,58$  cm,  $n=19$ . Estes animais foram significativamente maiores e mais pesados que os peixes da Baía de Paranaguá ( $P < 0,0001$  para os dois parâmetros, test T de Student). Contudo, todos os peixes eram adultos e em idade reprodutiva. Os 31 peixes restantes foram levados vivos ao Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (**LFCO**) da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas em Curitiba, acondicionados em caixas de isopor com água de salinidade 30‰ (ou  $\text{g.kg}^{-1}$ ) e aeração constante. Após 2 horas de viagem, no destino final foram transferidos para 5

aquários estoque de 30 litros com salinidade de 16‰, filtro biológico e aeração constante, para aclimatação e utilização em experimentos posteriores.

Tanto os locais contaminados quanto o local referência tiveram seus parâmetros como a salinidade (salinômetro S-28 Shibuya), temperatura (termômetro Incoterm), pH (phmêtro portátil Quimis) e transparência da água (disco de secchi) medidos nos mesmos extratos da água de onde foram coletados os peixes, em todas as coletas. Foi possível assegurar a similaridade entre os locais e pontos em todas as coletas, e os peixes sempre foram coletados entre 6 e 8 horas da manhã (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados abióticos obtidos durante os arrastos nas três coletas dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá e no ponto referência na Baía de Guaratuba. Dados obtidos na camada em que foram coletados os animais tanto nos pontos contaminados quanto no ponto referência.

Coleta	Dezembro		Março		Junho		Referência
	A	B	A	B	A	B	
Ponto							
Dias após explosão	30 dias		120 dias		210 dias		
Horário	07:40	08:00	07:25	06:25	07:40	08:10	07:00
Salinidade	28‰	31‰	29‰	28‰	31‰	31‰	30‰
Temperatura	26°C	26°C	24°C	26°C	20°C	23°C	22°C
pH	8,11	8,16	8,31	8,44	7,75	8,04	8,00
Transparência	1,40m	1,30m	1,35m	1,75m	2,00m	3,00m	1,70m





Figura 7. A – Mapa da localização do local de coleta do ponto referência (assinalada por um círculo) na Baía de Guaratuba, Paraná. O quadrado ao centro da figura representa o local onde foi marcada a coordenada geográfica indicada. B - Detalhes do local e da forma de coleta no ponto referência.

### 3.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS NOS LABORATÓRIOS DE CAMPO

Os peixes trazidos da Baía de Paranaguá e da Baía de Guaratuba aos laboratórios locais foram medidos (Figura 8A), pesados e processados como já mencionado anteriormente. Amostras de sangue coletadas do coração por sucção com capilares heparinizados foram centrifugadas em 2.100xg por 5 minutos para obtenção do plasma (Figura 8B). As amostras de plasma foram

acondicionadas em gelo para serem transportadas ao laboratório em Curitiba onde foram mantidas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para dosagens posteriores. Os tecidos (4 arcos branquiais e o rim inteiro) foram retirados e acondicionados em criotubos e imediatamente eram congelados em nitrogênio líquido para serem transportadas ao laboratório em Curitiba, onde eram imediatamente transferidos para freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e mantidos até o momento dos ensaios enzimáticos.

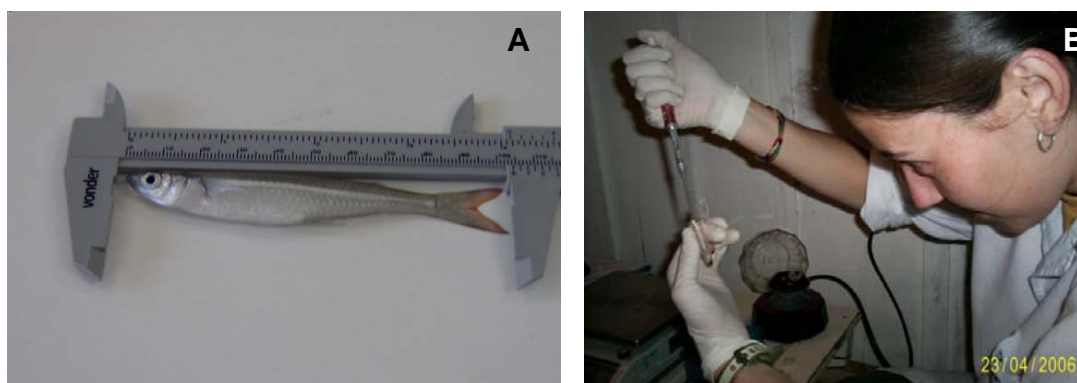


Figura 8. Processamento das amostras no laboratório de campo. A – Medida do comprimento total. B - Retirada do plasma após a centrifugação das amostras de sangue.

### 3.3 EXPERIMENTOS DE LABORATÓRIO EM CURITIBA

Os peixes coletados no ponto referência foram trazidos ao Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) da UFPR, em Curitiba. No laboratório foram mantidos em aquários estoque de 30 litros com água do local de coleta em condições estáveis de salinidade ( $16\text{‰}$ ), temperatura ( $22 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ ), pH ( $7,5 \pm 0,5$ ) e oxigênio dissolvido ( $7,17 \pm 0,06 \text{ mg/l}$ ). Em cada um dos aquários havia sete indivíduos, para evitar o estresse gerado pela alta densidade populacional. Os peixes foram alimentados diariamente (1 vez ao dia, pela manhã), com alimento comercial em flocos, Spirulina (algas) (Alcon Gold Mep 200 Complex). Os aquários eram limpos a cada dois dias para a retirada de fezes e restos de alimentos. Até o 4<sup>o</sup> dia de aclimação 25% dos

indivíduos haviam morrido. A partir do 4º dia os peixes passaram a nadar com o ventre para cima, com a respiração ofegante, abdômen inchado e alguns chegaram a eviscerar suas gônadas. Nesta ocasião foi inclusive notado um odor forte nos aquários e secreção sobre a pele dos indivíduos. No 5º dia, 48% dos indivíduos que tiveram este comportamento morreram. Após os 10 dias de aclimação, restaram apenas seis indivíduos (n=6), com aparência saudável, sem nenhuma manifestação similar aos que haviam morrido. Estes peixes foram sacrificados e processados da mesma forma que os peixes processados nos laboratórios de campo. Amostras de plasma obtidas destes peixes foram dosadas para osmolalidade e íons (cloreto e magnésio), e homogêneos de suas brânquias foram dosados para atividade das enzimas anidrase carbônica e glutatona S-Transferase e também homogêneos dos rins para a enzima anidrase carbônica.



Figura 9. Disposição dos aquários estoque no laboratório em condições constantes de temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido.

### **3.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS**

#### **3.4.1 Dosagens Plasmáticas**

##### **Osmolalidade**

A osmolalidade das amostras de plasma sanguíneo foi determinada em amostras de plasma sem diluição, através do micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor® 5520 VAPRO.

##### **Íons**

As dosagens iônicas ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) foram realizadas nas amostras de plasma diluídas apropriadamente em água ultrapura (Milli-Q). Estas dosagens foram realizadas por métodos colorimétricos com kits comerciais (Labtest®), e leitura de absorbância no espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech. Os íons  $\text{Cl}^-$  reagem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico, com leitura de absorbância a 470 nm. Os íons  $\text{Mg}^{2+}$  reagem com o magon sulfonado (cor azul) em meio alcalino, formando um complexo de cor púrpura que é proporcional a quantidade de íons magnésio da amostra, com leitura de absorbância a 505 nm. Este método mede o magnésio total presente nas amostras de plasma.

##### **Cortisol**

Os níveis de cortisol plasmático foram determinados de acordo com o método estabelecido por MUNRO & STABENFELDT (1984). O anticorpo policlonal R-4866 produzido pela Universidade Califórnia Davis foi diluído (1:8.500) em solução de cobertura pH 9,6. Adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  por poço da

microplaca NUNC Maxisorb. A placa descansou por 12 horas a 4°C, e logo após foi lavada 5 vezes com solução de lavagem para Elisa (solução salina com detergente Tween 20). As amostras de plasma foram diluídas (1:128) em solução diluidora de Elisa (tampão fosfato pH 7,0) de modo a manter a concentração dentro da faixa de leitura da curva padrão. O conjugado (cortisol HRP) foi diluído 1:20.000. A curva padrão foi preparada em triplicata, sempre com concentrações que variavam de 3,9 a 1.000 pg de cortisol/poço em ordem crescente. Adicionou-se 50 µl das amostras plasmáticas diluídas sobre o anticorpo e depois 50 µl do conjugado sobre as amostras. Incubou-se a placa por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida lavou-se a placa por 5 vezes com a mesma solução de lavagem de Elisa. Após a lavagem, adicionou-se a placa 100 µl da solução de ABTS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e solução citrato, pH 4,0) em cada um dos poços. A leitura de absorbância foi feita em 405 nm (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH)

### **3.4.2 Dosagens Enzimáticas**

#### **3.4.2.1 Anidrase Carbônica**

##### **Homogeneização dos tecidos para o ensaio da atividade da enzima Anidrase Carbônica**

As amostras de tecidos (brânquias e rins) foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 10%P/V (peso/volume) com tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 2.000xg (5 minutos em temperatura ambiente) para a precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi separado em alíquotas para a dosagem da concentração da proteína total e para a quantificação da atividade da enzima.

### **Ensaio de atividade da enzima Anidrase Carbônica**

A atividade da anidrase carbônica branquial e renal foi determinada pelo método estabelecido por VITALE *et al.* (1999). O método consiste na quantificação da atividade desta enzima através de um meio de reação com manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. A 7,5 ml desta solução foram adicionados 50 µl do sobrenadante do homogeneizado tecidual e 1 ml de água destilada saturada com CO<sub>2</sub> a aproximadamente 2,5°C. A redução do pH foi monitorada por 20 segundos através do pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®. Uma reta de regressão linear do pH em relação ao tempo foi encontrada, para que através da inclinação da reta pudesse ser determinada a taxa da reação catalizada (TC) pela enzima presente no homogeneizado tecidual. A taxa de reação não catalizada (TNC) foi medida utilizando a mesma solução de reação, porém no lugar da amostra eram adicionados 50 µl da solução tampão, a mesma utilizada na homogeneização da amostra. O cálculo da atividade da anidrase carbônica (AAC) foi realizado através da fórmula:  $AAC = [TC/(TNC - 1)]/mg$  de proteína total.

#### **3.4.2.2 Glutathione S-Transferase**

##### **Homogeneização do tecido para o ensaio da atividade da enzima Glutathione S-Transferase**

Neste ensaio somente as brânquias foram utilizadas. Os tecidos que estavam congelados em freezer -80°C foram transferidos para um isopor contendo nitrogênio líquido de modo a manter as amostras congeladas. Logo em seguida as amostras foram pesadas, descongeladas e homogeneizadas

em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,5). A diluição utilizada para esta quantificação foi de 15% P/V (15 mg/100 µl). A homogeneização foi feita em homogenizador tipo Dounce mantido no gelo. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000xg (15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi separado em alíquotas para a dosagem da concentração de proteína total e para a quantificação da atividade da enzima.

### **Ensaio da enzima Glutathione S-transferase (GST)**

A glutathione S-transferase (GST) foi quantificada pelo produto formado pela conjugação da Glutathione Reduzida (GSH) e CDNB (1-Cloro 2,4-dinitrobenzeno). Para este ensaio seguiu-se o protocolo estabelecido por KEEN *et al.* (1976). Em cada poço da placa foram adicionados 100 µl da amostra (homogeneizado tecidual) diluída e 200 µl da solução de reação. A solução de reação era preparada com CDNB 60mM, GSH 10mM e tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5, com quantidades determinadas de acordo com o número de amostras. A cinética da enzima foi determinada em microplaca, em triplicatas lidas em 340 nm (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH) durante 180 segundos, com leituras em intervalos de 15 segundos. A unidade utilizada foi nmol/minuto/mg proteína.

### **3.4.3 Quantificação de Proteínas Totais**

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais foi determinada tanto para o ensaio da enzima anidrase carbônica quanto para a glutathione S-Transferase, utilizando-se do protocolo descrito por BRADFORD (1976). Esse método baseia-se na mudança de coloração do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, que passa do vermelho ao azul ao ligar-se a

proteínas. As dosagens foram realizadas em triplicatas em microplacas utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay da Bio-Rad Laboratories® e as amostras foram lidas em 620nm (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH).

### **3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os grupos experimentais foram submetidos à análise estatística através do teste Anova de uma via seguida do teste post hoc de Tukey para localizar as diferenças. Testes T de Student foram utilizados para comparar comprimento e peso total dos peixes entre as Baías. Intervalos de confiança foram aplicados para verificar se os valores de osmolalidade, cloreto e magnésio plasmático incluíam os valores estimados para a água. Foram ainda realizados testes de correlação de Pearson para verificar possíveis interferências dos fatores abióticos nas atividades enzimáticas, e também possíveis relações entre enzimas e íons. Estes procedimentos foram realizados através do programa estatístico Prisma GraphPad 2.0, sempre com limite de significância em 0,05.

### **3.6 MODELO DE DISPERSÃO DE PARTÍCULAS DE ÓLEO**

Através do software SisBAHIA (Sistema Base de Hidrodinâmica Ambiental), versão 4.1, desenvolvido e registrado pela COPPE – UFRJ, foi desenvolvido um modelo de dispersão de partículas de óleo provenientes do acidente com o navio chileno Vicuña na Baía de Paranaguá. Este programa é capaz de desenvolver modelos advectivos-difusos, solucionando necessidades de circulação de nuvens de poluentes em corpos de água com pouca



estratificação. Como pouca estratificação é o caso de várias baías e estuários da costa brasileira, o modelo não necessita da inclusão de gradientes de densidade, apenas de valores de força de maré e da quantidade de poluente a ser monitorada. Porém, o modelo não fornece ao final da simulação nenhum valor de quantidade de material sedimentado ou decantado, o que poderá ocorrer com qualquer composto num ambiente aquático. Para uma resposta efetiva foi necessário o desenvolvimento de dois modelos complementares: o Modelo Hidrodinâmico e o Modelo de Transporte Lagrangeano Determinístico, sendo que as figuras apresentadas neste estudo foram obtidas a partir do Modelo de transporte Lagrangeano Determinístico.

**Modelo Hidrodinâmico:** É um modelo de circulação hidrodinâmica 3D ou 2DH otimizado para corpos de água naturais nos quais efeitos de densidade variável possam ser desprezados. Neste estudo os resultados foram gerados no módulo 3D. Este modelo é planejado para ótima representação de escoamentos em domínios naturais com geometria complexa. A partir do modelo hidrodinâmico, desenvolveu-se um modelo de Transporte Lagrangeano – Determinístico.

**Modelo de Transporte Lagrangeano – Determinístico:** Este é um modelo geral para a simulação de transporte advectivo-difusivo, sendo adequado para simulações de diversos problemas, como por exemplo, derramamentos de óleo, transporte de detritos flutuantes, inclusive óleos e graxas. Este modelo permite a utilização de reações de decaimento, simulando também processos de perda de massas por sedimentação. Utiliza como forçante do campo de

velocidade o sistema de maré além de uma malha de elementos finitos do domínio da modelagem. Para cada nó da grade é necessário informar o valor da batimetria (Figura 10). A batimetria utilizada na modelagem foi obtida a partir da digitalização da carta náutica da Baía de Paranaguá. Para referenciar esta batimetria ao nível médio do mar foi necessário somar 1 metro a todos os pontos do domínio do modelo (HERRLING, 2003). A batimetria digitalizada foi interpolada em uma grade regular de 100 x 100 m e acoplada à malha de elementos finitos utilizada pelo modelo SisBAHIA. Além da batimetria, também é necessário informar o valor da rugosidade do fundo em cada um dos pontos de grade. Nas simulações foi considerado um valor constante de 0,05 m para todo o domínio. O valor de 0,05 m, segundo referência técnica do manual SisBAHIA, corresponde ao leito com transporte de sedimentos.

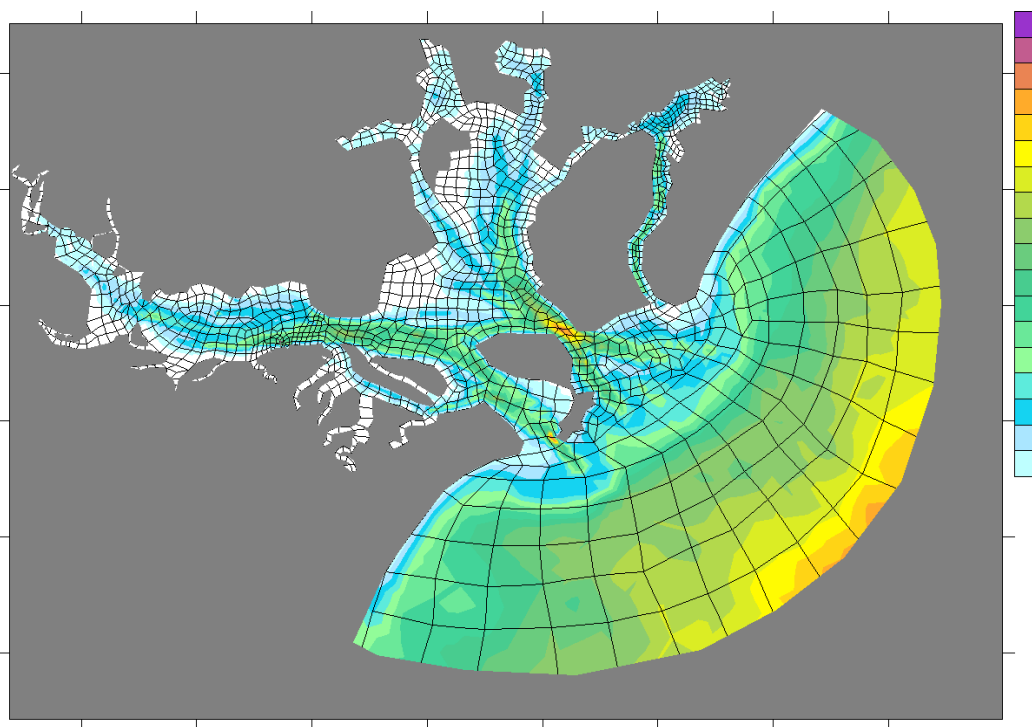


Figura 10. Batimetria da Baía de Paranaguá, Paraná, utilizada para o desenvolvimento das simulações de dispersão do óleo proveniente do acidente com o navio petroleiro Vicuña

## 4. Resultados

### 4.1 DOSAGENS PLASMÁTICAS

#### 4.1.1 Osmolalidade

A osmolalidade plasmática de *Atherinella brasiliensis* do ponto A em Dezembro foi reduzida ( $189 \pm 22,2$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O média  $\pm$  erro padrão da média; n=5) quando comparada aos valores apresentados pelos peixes do ponto referência ( $314 \pm 9,7$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O; n=19). Contudo, os valores da osmolalidade do plasma dos peixes de ambos os pontos A ( $518 \pm 19,7$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O; n=5) e B ( $532 \pm 11,4$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O; n=5) em Março e também do ponto B ( $427 \pm 21,2$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O; n=10) em Junho apresentaram aumento quando comparados a osmolalidade do plasma dos peixes do ponto referência. A osmolalidade plasmática dos peixes de todos os pontos foi menor do que a osmolalidade estimada para a água no momento das coletas (Figura 11).

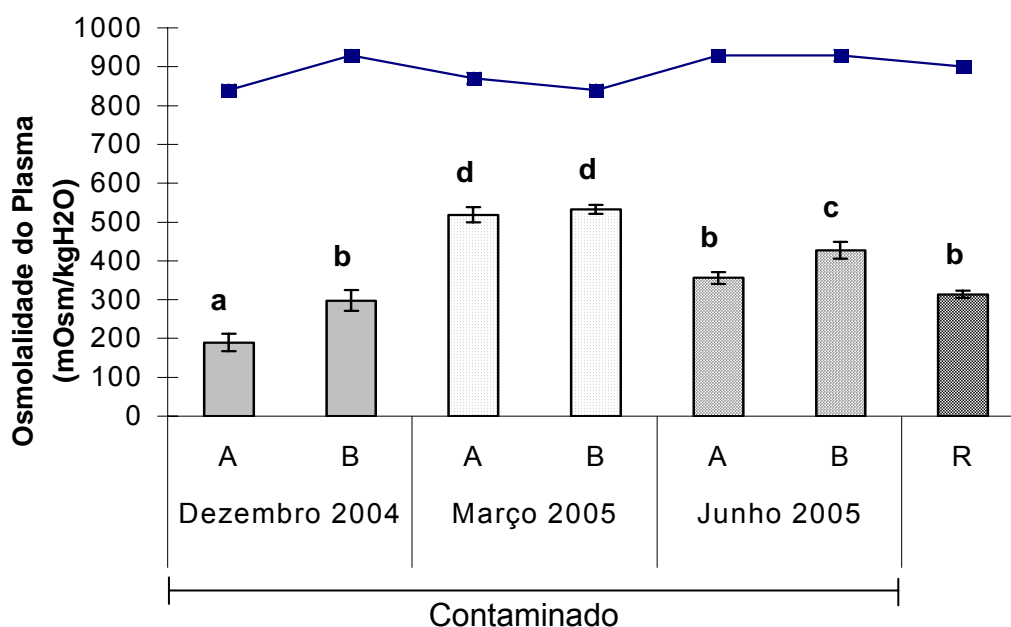


Figura 11. Osmolalidade do plasma (mOsm/kgH<sub>2</sub>O). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Os dados apresentados através de quadrados unidos por linhas na parte superior do

gráfico representam a osmolalidade estimada para a água segundo PROSSER (1973). Todos os valores de osmolalidade plasmático foram menores que os valores da água. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.1.2 Cloreto

A concentração de cloreto do plasma de *A. brasiliensis* coletados no ponto A ( $83 \pm 9,0$  mM; n=4) em Dezembro foi menor do que o valor dos peixes coletados no ponto referência ( $142 \pm 4,7$  mM; n=19). O cloreto plasmático dos peixes dos pontos B em Março ( $214 \pm 18,0$  mM; n=5) e A em Junho ( $186 \pm 15,0$  mM; n=8) foi superior do que os níveis de cloreto medidos nos peixes do ponto referência. A concentração de cloreto plasmática dos peixes de todos os pontos foi menor do que a concentração de cloreto estimada para a água no momento das coletas (Figura 12).

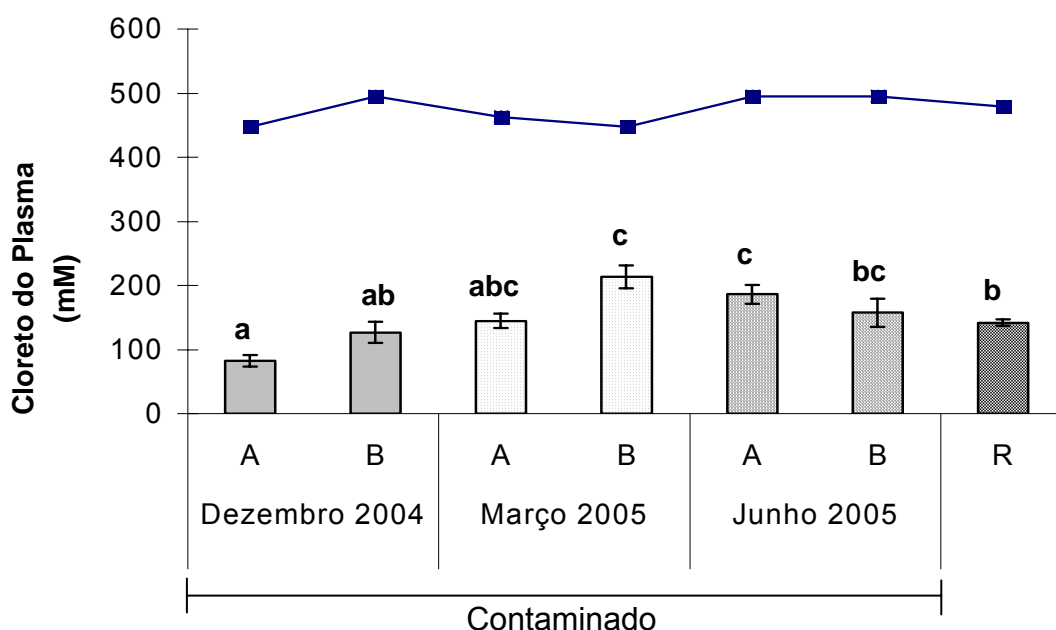


Figura 12. Concentração de Cloreto do plasma ([Cl] mM). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Os dados apresentados através de quadrados unidos por linhas na parte superior do gráfico representam a concentração de cloreto estimada para a água segundo PROSSER (1973). Todos os valores de cloreto plasmático foram menores que os valores da água. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

### 4.1.3 Magnésio

As concentrações de  $Mg^{2+}$  total do plasma foram fortemente alteradas nos peixes obtidos na coleta de Março do ponto contaminado. Os valores foram muito mais altos (ponto A=  $53 \pm 9,7$  mM; n=5 e ponto B=  $78 \pm 9,0$  mM; n=5) do que todos os outros valores medidos (Figura 13). Valores baixos foram encontrados nos plasmas dos peixes obtidos em Dezembro (ponto A=  $1,22 \pm 0,3$  mM; n=4 e ponto B =  $1,32 \pm 0,3$  mM; n=5) e nos peixes do ponto referência ( $5,3 \pm 0,5$  mM; n=8). Em Junho os valores também foram altos (ponto A=  $10,5 \pm 1,2$  mM; n=9 e ponto B=  $15,4 \pm 2,4$  mM; n=8), mas foram menores do que os valores encontrados em Março. Em Março os valores medidos foram tão altos, que foram iguais ao valor estimado para a água no ponto A e superiores ao valor estimado para a água no ponto B (Figura 13).

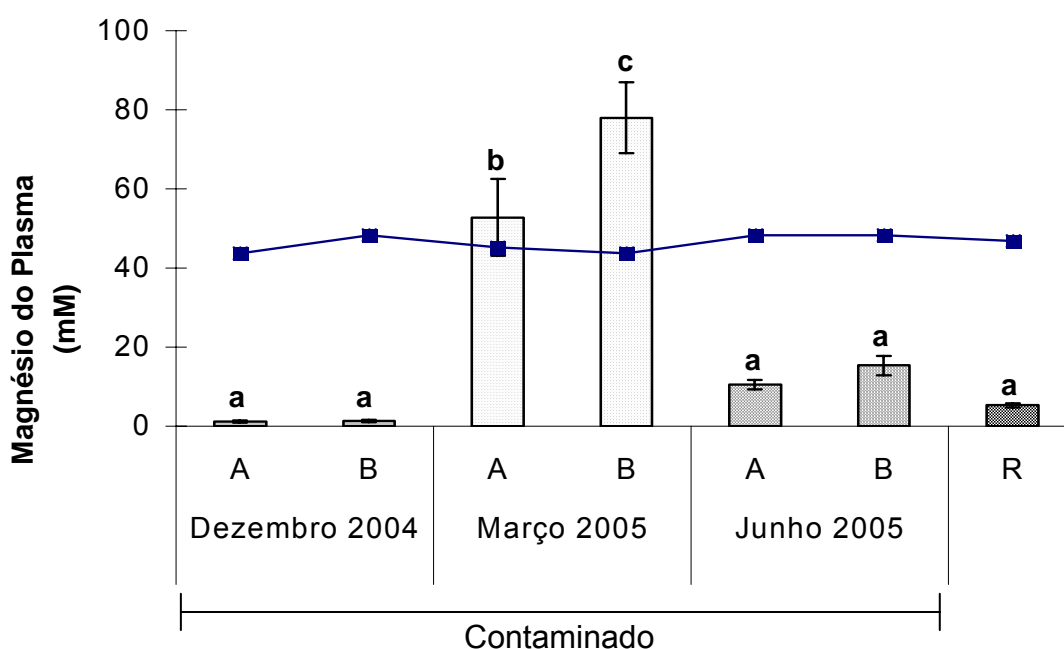


Figura 13. Concentração de Magnésio do plasma ( $[Mg^{2+}]$  mM). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Os dados apresentados através de quadrados unidos por linhas na parte superior do gráfico representam a concentração de magnésio estimada para a água segundo PROSSER (1973). Todos os valores de magnésio plasmático foram menores que os valores estimados para a água, exceto

no ponto A da segunda coleta onde não houve diferença em relação aos valores de água e no ponto B desta mesma coleta quando os valores foram maiores que os valores da água. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.1.4 Cortisol

Os valores de cortisol plasmático dos peixes-rei aumentaram progressivamente a partir do ponto B da coleta de Março ( $560 \pm 31,9$  ng/mL;  $n=5$ ) atingindo um pico em Junho em ambos os pontos A ( $789 \pm 111$  ng/mL;  $n=5$ ) e B ( $804 \pm 106$  ng/mL;  $n=4$ ). Estes valores foram maiores do que os níveis de cortisol no plasma dos peixes-rei do ponto referência ( $247 \pm 18,7$  ng/mL;  $n=7$ ) (Figura 14).

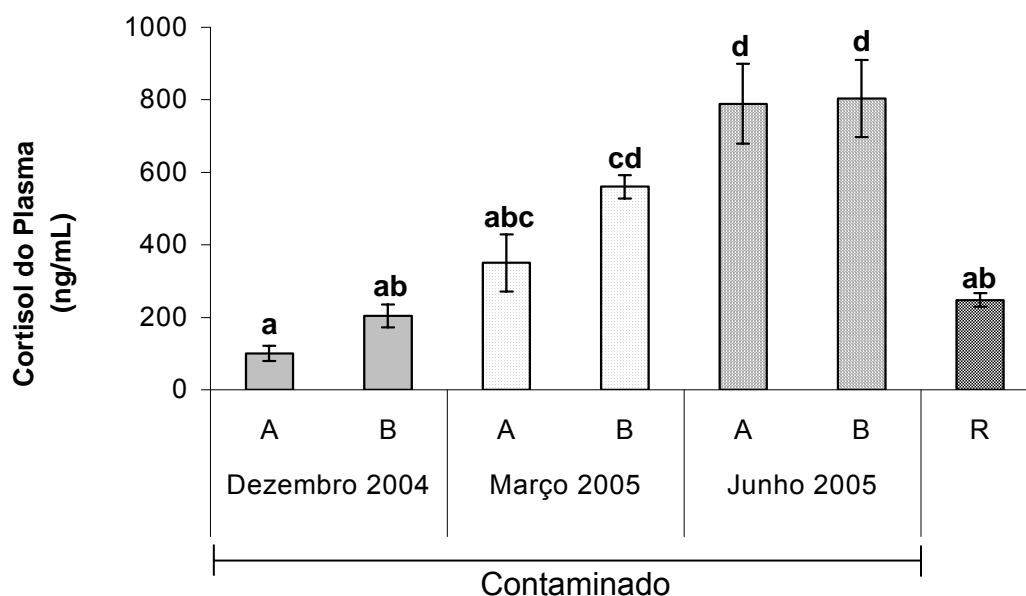


Figura 14. Concentração de Cortisol plasmático (ng/mL). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

## 4.2 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

### 4.2.1 Atividade da Anidrase Carbônica Branquial

A atividade da anidrase carbônica (AC) branquial dos peixes obtidos no ponto B em Dezembro ( $0,99 \pm 0,13$  /mg proteína;  $n=12$ ) e aqueles obtidos nos pontos A e B em Março ( $0,71 \pm 0,12$  /mg proteína;  $n=10$ ;  $0,94 \pm 0,11$  /mg proteína;  $n=10$ , respectivamente) foram inibidas quando comparados aos peixes obtidos no ponto referência. AC branquial dos peixes do ponto A em Março foi também inibida quando comparada a atividade medida nos peixes obtidos no mesmo ponto em Dezembro ( $1,30 \pm 0,10$  /mg proteína;  $n=11$ ) (Figura 15).

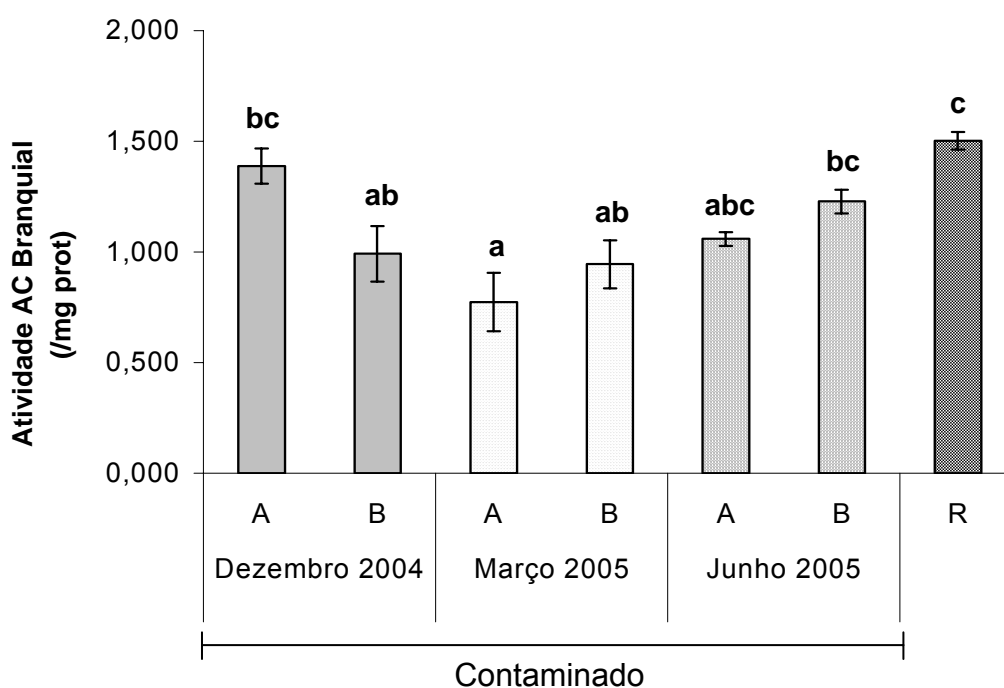


Figura 15. Atividade da enzima Anidrase Carbônica Branquial (/ mg proteína). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.2.2 Atividade da Anidrase Carbônica Renal

A atividade específica da AC renal foi maior nos peixes obtidos no ponto B ( $1,25 \pm 0,06$  /mg proteína; n=6) em Dezembro e ponto A ( $0,95 \pm 0,07$  /mg proteína; n=14) em Junho, quando comparados às atividades medidas nos peixes coletados no ponto referência ( $0,45 \pm 0,07$  /mg proteína; n=10). A AC renal medida nos peixes do ponto B de Dezembro foi também maior do que a atividade medida nos peixes do ponto A em Dezembro ( $0,57 \pm 0,08$  /mg proteína; n=7), ponto A ( $0,64 \pm 0,15$  /mg proteína; n=6) e B ( $0,33 \pm 0,11$  /mg proteína; n=6) em Março e ponto B em Junho ( $0,70 \pm 0,08$  /mg proteína; n=14). Os peixes do ponto A de Junho apresentaram maior atividade específica da AC renal quando comparados com os peixes do ponto referência e do ponto B de Março (Figura 16).

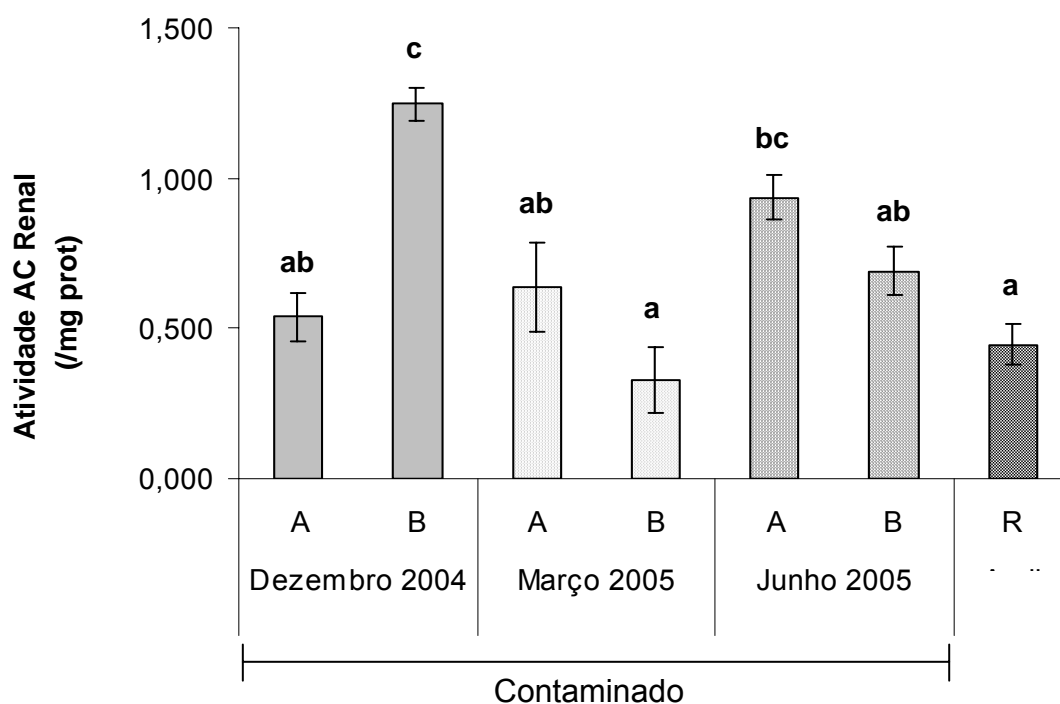


Figura 16. Atividade da enzima Anidrase Carbônica Renal (/mg proteína). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.



### 4.2.3 Atividade da Glutathiona S-Transferase Branquial (GST)

A atividade da GST branquial medida nos peixes obtidos no ponto B em Dezembro ( $0,46 \pm 0,04$  nmol/min<sup>-1</sup>/mg prot<sup>-1</sup>; n=10) foi inibida quando comparada com a atividade medida nos peixes do ponto referência ( $0,70 \pm 0,03$  nmol/min<sup>-1</sup>/mg prot<sup>-1</sup>; n=15) e nos peixes obtidos no ponto A ( $0,80 \pm 0,05$  nmol/min<sup>-1</sup>/mg prot<sup>-1</sup>; n=12) e B ( $0,60 \pm 0,04$  nmol/min<sup>-1</sup>/mg prot<sup>-1</sup>; n=12) em Junho (Figura 17).

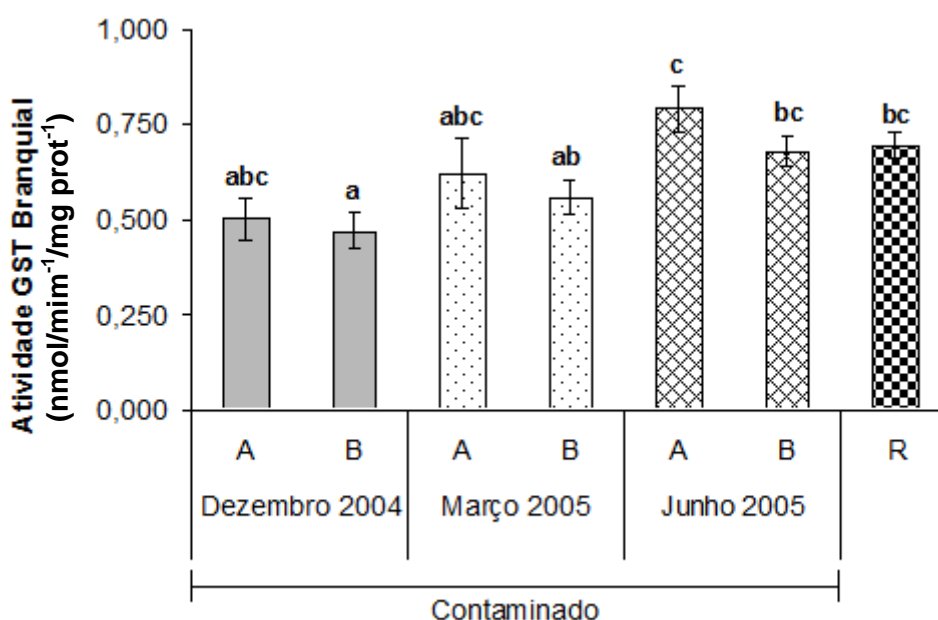


Figura 17. Atividade da enzima Glutathiona S-Transferase Branquial (nmol/min<sup>-1</sup>/mg prot<sup>-1</sup>). Resultados obtidos com *Atherinella brasiliensis* do local contaminado Baía de Paranaguá nas três datas após o acidente com o navio Vicuña, e do ponto referência (R) na Baía de Guaratuba. O Ponto A é o local mais próximo do acidente. O ponto B é o local mais afastado. Grupos com alguma letra em comum não são estatisticamente diferentes. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média.

### 4.3 ANIMAIS AMOSTRADOS NO PONTO REFERÊNCIA EM COMPARAÇÃO AOS ANIMAIS DESTE MESMO PONTO ACLIMATADOS EM LABORATÓRIO

Não houve diferenças significativas na osmolalidade, dosagens iônicas (cloreto e magnésio) e análises de anidrase carbônica (renal e branquial), entre

os animais do ponto referência quando comparados aos animais deste mesmo ponto mantidos por 10 dias em laboratório. Somente na dosagem de GST foi observado aumento na atividade branquial desta enzima nos peixes do ponto referência aclimatado ( $1,14 \pm 0,05 \text{ nmol/min}^{-1}/\text{mg prot}^{-1}$ ), quando comparada a atividade enzimática dos peixes do ponto referência sem aclimação ( $0,70 \pm 0,03 \text{ nmol/min}^{-1}/\text{mg prot}^{-1}$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre as dosagens plasmáticas e atividades enzimáticas de *Atherinella brasiliensis* coletados e processados no ponto referência na Baía de Guaratuba/PR em abril de 2006 e os exemplares aclimatados por 10 dias em laboratório. Dados apresentados através da média das concentrações e atividades enzimáticas  $\pm$  erro padrão das médias, n= número de indivíduos aclimatados, \* indicação de diferença significativa.

Parâmetros	Processados em campo	Aclimatados em laboratório
[Osm] do plasma (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	314 $\pm$ 9,7 (n=19)	348 $\pm$ 14,0 (n=6)
[Cl <sup>-</sup> ] do plasma (mM)	142 $\pm$ 4,7 (n=19)	153 $\pm$ 6,3 (n=6)
[Mg <sup>2+</sup> ] do plasma (mM)	5,3 $\pm$ 0,5 (n=8)	5,1 $\pm$ 0,7 (n=6)
Atividade AC Branquial (/mg proteína)	1,50 $\pm$ 0,04 (n=10)	1,57 $\pm$ 0,14 (n=6)
Atividade AC Renal (/mg proteína)	0,45 $\pm$ 0,07 (n=10)	0,45 $\pm$ 0,12 (n=6)
Atividade GST Branquial (nmol/min <sup>-1</sup> /mg prot <sup>-1</sup> )	0,70 $\pm$ 0,03 (n=15)	1,14 $\pm$ 0,05 (n=6)*

#### 4.4 MODELO DE DISPERSÃO DE PARTÍCULAS DE ÓLEO

Através dos modelos aqui apresentados é possível verificar que algumas horas após o derramamento, o óleo começa a se espalhar e cobrir uma grande área da superfície da água (Figura 18). A partir deste momento, mesmo com bóias de contenção, o óleo se dispersou e atingiu uma extensão de cerca de 30 km<sup>2</sup>. Essa dispersão pode não ter resultado em diluições das concentrações

iniciais dos contaminantes, porém, mesmo frações menores ou aquelas mais solúveis atingiram e impactaram uma grande área da Baía de Paranaguá.

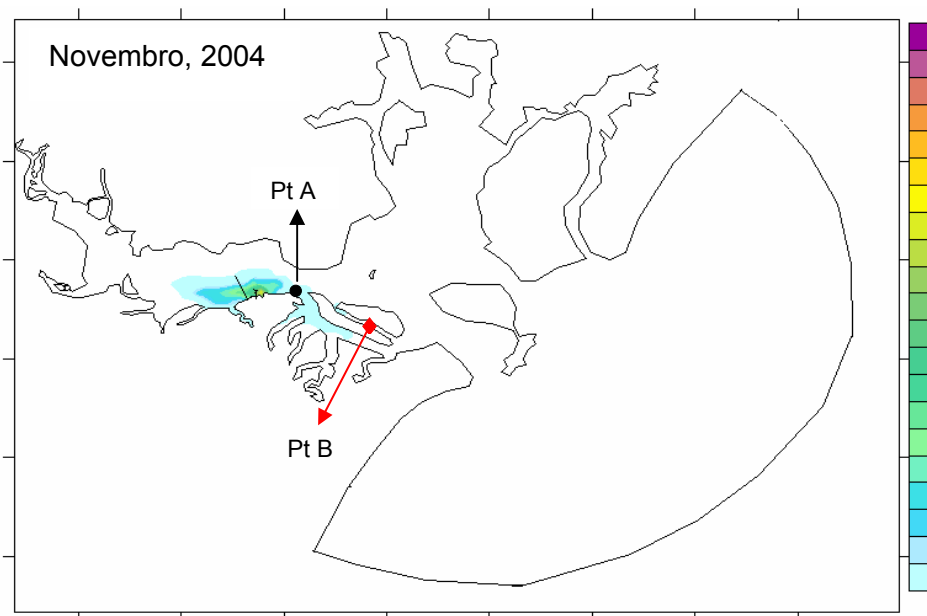


Figura 18. Modelo de dispersão de partículas de óleo algumas horas após a explosão do navio chileno Vicuña, no dia 15 de novembro de 2004 na Baía de Paranaguá. As cores representam a concentração de partículas presentes na região. A coloração da escala varia da maior concentração (cor roxa) para a menor concentração (cor azul claro). O traço preto indica o local da explosão. O círculo preto (●) indica a localização do ponto A. O símbolo em vermelho (♦) indica a localização do ponto B.

No mês de Dezembro, 30 dias após a explosão (Figura 19), período referente a primeira coleta do ponto contaminado, pode-se verificar ainda uma maior concentração de óleo representado pela cor verde sobre a região onde foi realizada a coleta do ponto mais próximo ao acidente (ponto A). Na região onde foi realizada a coleta do ponto mais afastado ao acidente (ponto B) a cor azul representa uma menor concentração de partículas de óleo bruto na superfície, porém não menor contaminação.

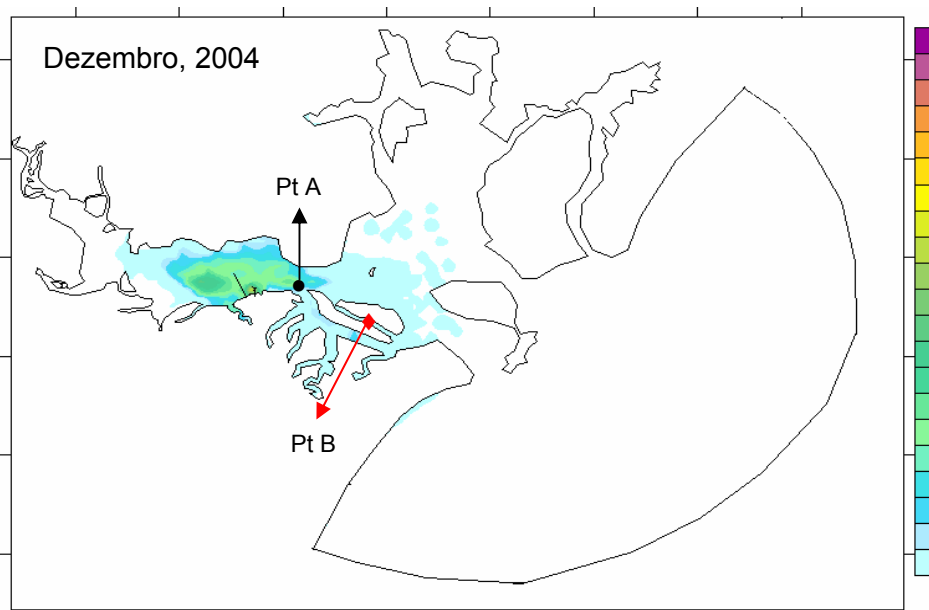


Figura 19. Modelo de dispersão de partículas de óleo 1 mês após a explosão do navio (Dezembro 2004), no momento da primeira coleta na Baía de Paranaguá. A cor verde na região mais próxima ao local do acidente representa uma maior concentração de partículas na superfície. A cor mais clara no restante da região não indica menor contaminação, mas sim menor concentração de partículas de óleo bruto na superfície. O traço preto indica o local da explosão. O círculo preto (●) indica a localização do ponto A. O símbolo em vermelho (♦) indica a localização do ponto B.

A figura dos 120 dias após a explosão, no momento da segunda coleta (Março 2005) dos peixes-rei na Baía de Paranaguá (Figura 20), apresenta ainda uma maior concentração de partículas na região mais próxima ao acidente (cor verde), porém frações mais solúveis teriam se espalhado e atingindo outras regiões da Baía (cor azul claro). Esta tendência de uma maior concentração de partículas de óleo próximo ao foco da contaminação mantém-se durante as próximas coletas devido a viscosidade e lento decaimento do óleo tipo *bunker*.

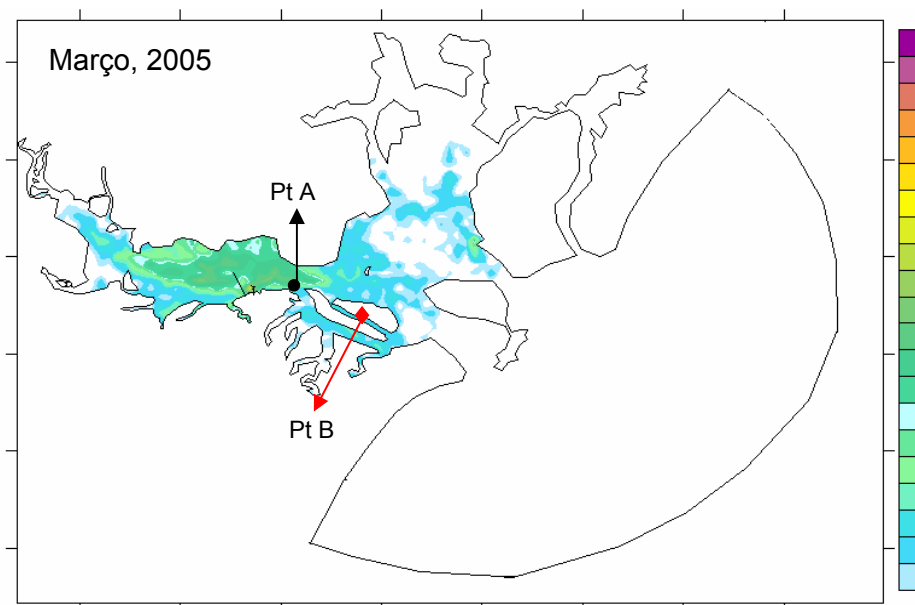


Figura 20. Modelo de dispersão de partículas de óleo 4 meses após a explosão (Março 2005), segunda coleta dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá. A cor azul representa a menor concentração de partículas na superfície, porém grande parte dos contaminante já pode ter decantado no sedimento. O traço preto indica o local da explosão. O círculo preto (●) indica a localização do ponto A. O símbolo em vermelho (♦) indica a localização do ponto B.

Em Junho de 2005, no momento da terceira coleta dos pontos contaminados (210 dias após a explosão) (Figura 21), verifica-se visualmente que a intensidade da contaminação na Baía como um todo é maior, apesar de uma coloração bem menos intensa nas regiões mais afastadas do acidente. Esta coloração menos intensa indica uma provável sedimentação das partículas. Com a sedimentação das partículas mais afastadas do foco da contaminação, manchas são previstas com menor massa, por isso aparece com colorações indicativas de menor concentração (azul claro) ou até desaparecerem completamente (Figura 21).

É válido ressaltar que este modelo fornece previsões baseadas na condição hidrodinâmica da região e no “comportamento” das partículas de óleo em corpos d’água, não fornecendo medidas (valores) para as concentrações sedimentadas ou ainda espalhadas pela superfície.

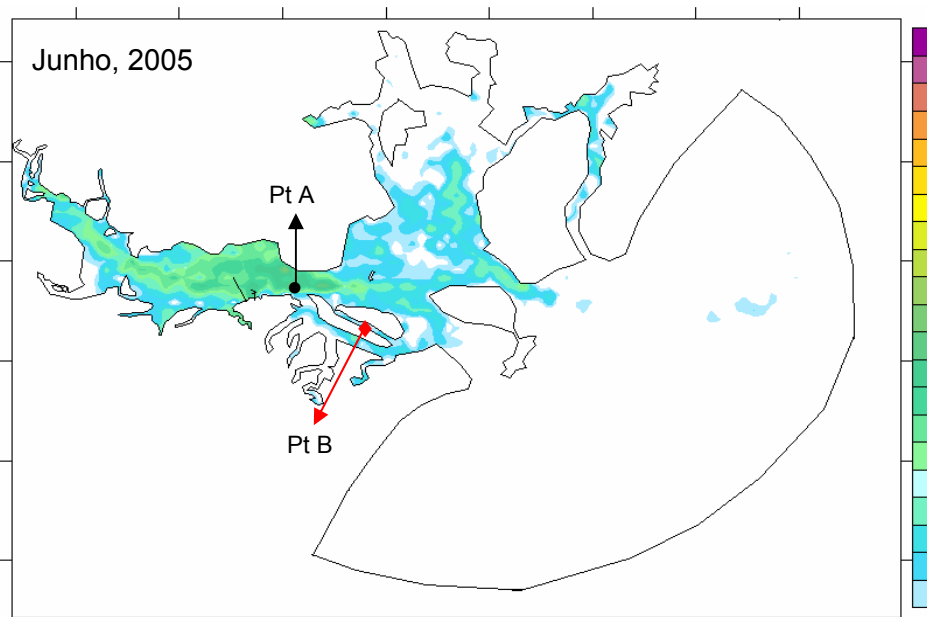


Figura 21. Modelo de dispersão de partículas de óleo 7 meses após a explosão (Junho 2005), terceira coleta dos pontos contaminados na Baía de Paranaguá. A cor verde representa a maior concentração de partículas na superfície e a azul a menor concentração. O traço preto indica o local da explosão. O círculo preto (●) indica a localização do ponto A. O símbolo em vermelho (♦) indica a localização do ponto B.

## 5. Discussão

### Osmolalidade e cloreto plasmático

Neste presente trabalho, a diferença encontrada entre a osmolalidade do plasma dos peixes das três coletas do local contaminado comparadas às concentrações dos peixes do ponto referência indicam provável efeito da contaminação, podendo-se dizer que os animais apresentaram uma resposta bifásica. A primeira fase foi marcada por uma aparente ativação da capacidade de secreção de sal dos peixes do local contaminado resultando em uma redução da osmolalidade e da concentração de cloreto plasmática um mês após a explosão (Dezembro 2004). A segunda fase apresentou um pico em Março de 2005 caracterizando uma grande dificuldade na capacidade hipo – osmorregulatória dos peixes e um conseqüente aumento das concentrações plasmáticas.

Muitas substâncias tóxicas, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, causam distúrbios osmorregulatórios em teleósteos (GOKSOYR *et al.*, 1996; LIONETTO *et al.*, 1998; PACHECO & SANTOS, 2001; ARASHISAR *et al.*, 2004; KENNEDY & FARRELL, 2005). A presença de compostos químicos seja proveniente do acidente petrolífero, ou da contaminação já existente na região, pode ter afetado o tecido branquial prejudicando sua função de transporte de sal. Proteínas transportadoras e enzimas como a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , o co-transportador  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  e a anidrase carbônica são freqüentemente afetados (KENNEDY & FARRELL, 2005). Frações de hidrocarbonetos lipossolúveis podem afetar diretamente a permeabilidade das membranas, particularmente das brânquias, também interferindo sobre o transporte de sal (KENNEDY & FARRELL, 2005). O transporte de sal também pode ter sido afetado por

alterações morfológicas no epitélio branquial como hiperplasia ou fusão de suas lamelas (dados histológicos não verificados neste estudo), processos comumente gerados por contaminantes (PACHECO & SANTOS, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005).

O padrão de resposta observado para a osmolalidade plasmática foi corroborado pelo cloreto, como seria esperado (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; RANDALL *et al.*, 1999). Os nítidos efeitos sobre a homeostase de cloreto e osmolalidade do plasma dos peixes da Baía de Paranaguá são devidos não somente a esses prováveis efeitos sobre o epitélio branquial, diretamente exposto aos contaminantes, mas também sobre os outros tecidos envolvidos com a osmorregulação nos peixes.

Os teleósteos marinhos ingerem água do mar e com ela os contaminantes. As funções osmorregulatórias do epitélio gastrointestinal e renal são assim prejudicados, afetando o transporte de sal e água (GROSELL & GENZ, 2006). O processo de absorção de água pelo trato gastrointestinal leva ao aumento na carga de sal que deve ser eliminada pela brânquia, o que talvez não tenha ocorrido na proporção correta, prejudicando de forma conjunta a homeostase osmótica e iônica dos peixes.

### **Magnésio plasmático**

O rim é o local de transporte e regulação de íons magnésio e esta atividade ocorre mais especificamente no túbulo proximal (BEYENBACH *et al.*, 1993, 1997; PRODOCIMO & FREIRE, 2001). Através deste epitélio, os peixes de água doce reabsorvem magnésio, enquanto os peixes marinhos secretam este íon. Deste modo, no caso dos peixes eurialinos, como



*Atherinella brasiliensis*, é esperado que eles possam tanto reabsorver como secretar íons magnésio através deste epitélio (BEYENBACH *et al.* 1993, 1997; FREIRE *et al.*, 1996; ROMÃO *et al.*, 2001).

Peixes de ambientes marinhos habitam água com ~ 54 mM de  $Mg^{2+}$ . Nesta situação, estes animais hipo - regulam suas concentrações, mantendo as concentrações de magnésio plasmático em torno de 1 a 2 mM (BEYENBACH *et al.*, 1993). Neste estudo, o peixe-rei apresentou concentrações de magnésio plasmático maiores do que o normal, mesmo no ponto referência (~ 5 mM), provavelmente por causa do método colorimétrico utilizado, que mede o magnésio total do plasma. Surpreendentemente as concentrações de magnésio plasmático medidas nos peixes coletados em Março na Baía de Paranaguá foram quase iguais (53 mM) ou até mesmo superiores (78 mM) às concentrações de magnésio estimadas para a água com salinidades de 28 - 29‰, nos pontos A e B, respectivamente.

Estas determinações de magnésio foram repetidas exaustivamente utilizando-se diferentes diluições do kit de ensaio e materiais livres de qualquer contaminação que pudesse causar interferência, confirmando que os valores encontrados eram mesmo reais. Estes valores apontaram para sério comprometimento da função renal (capacidade secretora de magnésio) nestes peixes, resultando em prejuízo na homeostase total. Um estado menos severo de dano na homeostase de magnésio foi notado nos peixes obtidos em Junho. Ao beberem água salgada para manter o equilíbrio hídrico e osmótico, os peixes acabam ingerindo uma carga de magnésio. Mesmo não tendo grande absorção intestinal (PARMELEE & RENFRO, 1983), quando não excretada pelos rins, esta quantidade de magnésio absorvido aumenta as concentrações

no fluido extracelular podendo atingir concentrações letais (BEYENBACH *et al.*, 1995).

Este comprometimento renal caracteriza sintomas de intoxicação, visto que segundo BEYENBACH *et al.* (1993; 1997) em concentrações plasmáticas a partir de 5 mM o animal já não executa suas funções osmorregulatórias de maneira satisfatória podendo ter suas funções vitais comprometidas, incluindo seus processos respiratórios, e assim culminando na morte do peixe. Surpreendentemente, apesar das altíssimas concentrações apresentadas pelos animais obtidos em Março, eles apresentavam-se aparentemente saudáveis. Porém, fica claro a partir destes resultados, que os animais nitidamente não estavam conseguindo excretar os íons excedentes e manterem-se em homeostase, enfatizando os efeitos nocivos da presença de hidrocarbonetos de petróleo na água do local contaminado em adição à contaminação normal existente na baía.

### **Cortisol**

O cortisol é um hormônio muito importante para os vertebrados. Este hormônio está envolvido em muitas funções que incluem: metabolismo alimentar, respostas do sistema imunológico, osmorregulação, reprodução, crescimento e respostas ao estresse tanto em peixes como em outros vertebrados (MOMMSEN *et al.*, 1999; HICKMAN *et al.*, 2004). Em peixes, este hormônio é principalmente conhecido como o hormônio de adaptação às mudanças de concentrações salinas em muitos teleósteos eurialinos e anádromos (MADSEN, 1990; VEILLETTE *et al.*, 1995; PACHECO & SANTOS, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2005; KENNEDY & FARRELL, 2005).

O cortisol é sintetizado e secretado pelas células inter-renais, localizadas no rim anterior de teleósteos, devido estímulo da glândula pituitária sobre o córtex adrenal (e.g. PACHECO & SANTOS, 2001; CAMARGO & MARTINEZ, 2006). Alterações das funções inter-renais levam ao aumento das concentrações deste hormônio no plasma. São vários os mecanismos estressantes que podem alterar as funções inter-renais e conseqüentemente estimular ou inibir a liberação de cortisol. Dentre estas situações estão: alterações abióticas (salinidade, temperatura, oxigênio) (e.g. MADSEN, 1990; MARTINEZ *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002), exposição a metais pesados (e.g. MONTEIRO *et al.*, 2005), compostos provenientes de efluentes e hidrocarbonetos de petróleo (e.g. SANTOS & PACHECO, 1996; PACHECO & SANTOS, 2001; KENNEDY & FARRELL, 2005), estresse de captura e manuseio (e.g. CAMARGO & MARTINEZ, 2006).

O tipo de contaminante e a duração da exposição podem ser fatores importantes dentro do processo da liberação do cortisol (MOMMSEN *et al.*, 1999). Cortisol em níveis elevados no sangue é considerado como uma resposta primária ao estresse (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002), porém, neste estudo, houve um aumento nos níveis de cortisol no plasma dos peixes no ponto B da coleta de Março e de ambos os pontos da coleta de Junho, indicando forte efeito do estresse químico sobre a secreção de cortisol nos peixes-rei.

De modo geral, compostos provenientes do petróleo e metais pesados induzem enzimas de biotransformação, (GST, GR, G6PDH, CYP1A, P450) como uma resposta inicial e aguda ao estressor, gerando uma redução na capacidade de resposta do cortisol cujo aumento poderia estar relacionado a

uma resposta mais crônica ao fator estressante (PACHECO & SANTOS, 2001; KENNEDY & FARRELL, 2005). A resposta modesta do cortisol nos peixes obtidos em Dezembro, quando comparada às respostas apresentadas pelos animais do ponto B da coleta de Março e de ambos os pontos da coleta de Junho, podem retratar uma disfunção endócrina que pode ter sido induzida pelos componentes tóxicos cronicamente presentes na água. Porém, os valores apresentados pelos animais em ambos os pontos de Dezembro, bem como pelos peixes do ponto referência são maiores que os valores basais normais (~ 50 ng/mL) (CAMARGO & MARTINEZ, 2006) e já indicam uma situação de estresse, provavelmente causada pelo manuseio ou ainda pela influência da contaminação nas respostas osmóticas e iônicas.

As respostas apresentadas pelos peixes a partir da coleta de Março, retratam claramente que a capacidade osmorregulatória e função renal dos peixes foram mais afetadas neste período levando a um aumento das concentrações deste hormônio como uma tentativa de reverter o estresse causado por estas situações. (HONTELA *et al.*, 1992; HONTELA, 1997; PACHECO & SANTOS, 2001). Conseqüentes danos resultantes desta incapacidade osmorregulatória e da função renal são corroborados pelo padrão inverso apresentado por *A. brasiliensis* entre os distúrbios osmorregulatórios (mais intensos em Março e menos intensos em Junho) e as respostas do cortisol (menos intensas em Março e mais intensas em Junho). Esta relação inversa é totalmente compatível com o papel do cortisol na hipo-regulação do plasma em teleósteos marinhos.

### **Atividade Anidrase Carbônica Branquial**

Diferentemente das outras proteínas de transporte que se mostram tecido ou espécie específica, a anidrase carbônica (AC) tem sido encontrada em quantidades em todos os tecidos envolvidos no transporte de íons (HENRY *et al.*, 2003). Esta enzima tem sido mais satisfatoriamente caracterizada em brânquias de crustáceos onde, em associação com a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , se apresenta como um dos componentes centrais nos mecanismos de troca de íons e osmorregulação para estes animais (HENRY *et al.*, 2003). Em peixes esta enzima mostrou-se muito mais efetiva na excreção de gás carbônico e regulação ácido-base (ARASHISAR *et al.*, 2004; LIONETTO *et al.*, 1998).

Metais pesados são considerados fortes inibidores da atividade desta enzima. A união de metais pesados com esta proteína pode alterar sua função catalítica levando a falhas de suas funções fisiológicas, e conseqüentemente alterando todo seu sistema metabólico específico (VITALE *et al.*, 1999). Em peixes a dosagem desta enzima é ainda muito pouco explorada como um biomarcador de poluição (LIONETTO *et al.*, 1998; ARASHISAR *et al.*, 2004; GEORGALIS *et al.*, 2006). Nas brânquias do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis*, anidrase carbônica (AC) foi claramente inibida nos peixes coletados no ponto B em Dezembro e em ambos os pontos em Março, quando comparada à atividade enzimática apresentada pelos peixes do ponto referência.

Este estudo é o primeiro a relacionar a atividade desta enzima em peixes submetidos a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Acredita-se que as ações destes compostos sejam similares às exercidas pelos metais pesados na atividade desta enzima. Os dados encontrados neste estudo corroboram a hipótese desta enzima ser inibida pela presença de

contaminantes químicos, como já verificado em alguns estudos encontrados na literatura, tanto em vertebrados quanto em invertebrados (SKAGGS & HENRY, 2002; VITALE *et al.*, 1999; ARASHISAR *et al.*, 2004; LIONETTO *et al.*, 1998).

A inibição da atividade da AC branquial deteriora a capacidade osmorregulatória e o balanço ácido – base, podendo causar acidose respiratória (ARASHISAR *et al.*, 2004). No epitélio branquial a AC é responsável por manter  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  em equilíbrio, deste modo, facilitando o processo de excreção de  $\text{CO}_2$  (LIONETTO *et al.*, 1998; GENOVESE *et al.*, 2005). Em peixes, existe uma relação íntima entre a regulação iônica e ácido-base.

A brânquia é considerada um importante local de compensação metabólica, pois em associação com as proteínas íon específicas e com a AC, participa da regulação do pH fisiológico (GEORGALIS *et al.*, 2006). Em peixes de água doce a AC branquial tem um importante papel por controlar a excreção ácida através das taxas de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  trocadas por  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  respectivamente. A excreção de  $\text{CO}_2$  em trutas e em outros teleósteos depende exclusivamente da AC citosólica (GEORGALIS *et al.*, 2006). A inibição desta enzima notada em Março, coincide com os distúrbios osmorregulatórios apresentados pelos peixes. Neste estudo, a variação da salinidade foi muito pequena (28 - 31‰) e deste modo não há correlação entre a atividade desta enzima nas brânquias e a salinidade ( $R=0,1423$ ;  $P= 0,75$ ). Sendo assim, fica descartada a relação entre a redução da atividade desta enzima e a salinidade da água dos locais de coleta (LOPEZ MAÑANES *et al.*, 2000 e HENRY *et al.*, 2003), sendo razoável assumir que os efeitos observados são decorrentes da ação dos poluentes presentes na Baía, principalmente em Março. Essa inibição da AC branquial

por hidrocarbonetos de petróleo poderia estar relacionada aos prejuízos da osmorregulação, em especial da excreção de cloreto, porém a verificação da análise de correlação realizada entre a atividade da AC branquial e os valores de cloreto mostrou-se inexistente ( $R=0,33$ ;  $P = 0,47$ ).

Pode-se a partir destes resultados sugerir que nas brânquias de *Atherinella brasiliensis* a AC está mais relacionada à excreção de gás carbônico e balanço ácido-base do que com osmorregulação. Resultados similares já haviam sido encontrados em outros trabalhos com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e enguias (*Anguilla anguilla*) (ARASHISAR *et al.*, 2004; LIONETTO *et al.*, 1998, respectivamente), e também por GENOVESE *et al.* (2005) em estudo com caranguejos eurialinos (*Chasmagnathus granulatus*).

### **Atividade da Anidrase Carbônica Renal**

A inibição da AC no rim pode levar a acidose metabólica em peixes, pois prejudica a capacidade de reabsorver bicarbonato (ARASHISAR *et al.*, 2004). Neste estudo, aparentemente a atividade da AC renal exibiu uma menor sensibilidade aos contaminantes presentes na água do que a AC das brânquias. Existem vários relatos de inibição da AC em brânquias (LIONETTO *et al.*, 1998; VITALE *et al.*, 1999; SKAGGS & HENRY, 2002; ARASHISAR *et al.*, 2004) e intestino (LIONETTO *et al.*, 1998) de organismos aquáticos submetidos a contaminantes químicos, porém nenhum estudo havia verificado a resposta renal a estes compostos. A atividade da AC nos rins dos peixes foi aparentemente ativada em alguns dos locais contaminados, podendo simplesmente estar relacionada à compensação dos distúrbios iônicos e

osmorregulatórios e possivelmente a homeostase ácido-base (LIONETTO *et al.*, 1998).

Como o rim é o órgão responsável pelo transporte de íons divalentes, principalmente  $Mg^{2+}$  (BEYENBACH *et al.*, 1993, 1997; RANDALL *et al.*, 1999), a ativação da AC neste órgão poderia estar relacionada com a busca da homeostase das concentrações de magnésio plasmático, principal íon excretado e transportado pelos rins. Contudo, não houve relação entre a ativação da enzima nos rins e a manutenção do equilíbrio de  $Mg^{2+}$  ( $R = 0,53$ ;  $P = 0,22$ ).

#### **Atividade Glutathione S-Transferase – GST Branquial**

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) têm sido comumente encontrados em ambientes marinhos e cada vez mais suas propriedades têm sido investigadas no sistema biológico. A Glutathione S-Transferase (GST) é um dos biomarcadores de transformação xenobiótica mais utilizados no levantamento do impacto causado por estes compostos (ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005). Esta enzima tem sido considerada o biomarcador mais sensível às alterações geradas pelas atividades de biotransformação de xenobióticos (CAZENAVE *et al.*, 2006).

A atividade da GST foi analisada no epitélio branquial de *Atherinella brasiliensis*, diferentemente da maioria dos estudos encontrados na literatura, os quais em geral utilizam tecidos como fígado ou glândulas digestivas (ZACCARON DA SILVA *et al.*, 2005; AMADO *et al.*, 2006a,b). Neste estudo a atividade da enzima GST foi inibida apenas no ponto B da coleta de Dezembro. Esta inibição sugere a ação dos contaminantes químicos na atividade da GST.



Estes contaminantes químicos podem afetar a atividade da GST de três maneiras: alterando a conformação da enzima, inibindo o substrato da enzima (glutathiona reduzida, GSH) ou ainda inibindo a síntese de GST em níveis moleculares (CAZENAVE *et al.*, 2006). Muito provavelmente, o que ocorreu neste estudo foi a depleção do substrato da enzima (GSH) nas células branquiais dos peixes coletados no ponto B em Dezembro, o que pode ter sido causado pela ação da contaminação sobre o metabolismo do animal, corroborando a ação de contaminantes químicos na atividade desta enzima. Quando comparamos a atividade enzimática dos animais deste ponto aos outros pontos e coletas percebemos uma atividade enzimática alta, o que pode caracterizar as respostas enzimáticas normais desta espécie no tecido branquial (REGOLI & PRINCIPATO, 1995). Estes resultados podem ainda sugerir alta biotransformação dos compostos para reduzir o estresse oxidativo ou uma maior disponibilidade de GSH (não medida neste estudo) assim como já havia sido verificado por ZACCARON DA SILVA *et al.* (2005) em seu estudo com glândulas digestivas de bivalves expostos a óleo diesel. As análises de atividade da enzima GST realizadas em tecido hepático dos mesmos indivíduos de *Atherinella brasiliensis* por ZANDONÁ *et al.* (dados não publicados) não revelaram diferenças significativas em nenhuma das coletas realizadas em Paranaguá.

Foram realizadas análises de correlação entre a atividade enzimática e os parâmetros abióticos. Uma correlação negativa significativa foi encontrada entre a temperatura e a atividade da GST ( $R=0,9443$ ,  $P= 0,0014$ ), contrastando com a maioria dos estudos em que ocorre um aumento da atividade da GST com o aumento da temperatura (RONISZ *et al.*, 1999; AMADO *et al.*, 2006a).

De modo geral, em altas temperaturas ocorre um aumento na atividade metabólica e no consumo de oxigênio, conseqüentemente, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumenta a atividade enzimática para evitar o estresse oxidativo.

Medir uma única enzima ou forma de defesa antioxidante pode não ser o suficiente para definir uma resposta exata de defesa em condições experimentais ou naturais (ZANETTE *et al.*, 2006), porém mesmo sendo o marcador mais utilizado em respostas a situações de estresse, em brânquias de *Atherinella brasiliensis* a GST não apresentou resultados significativos.

### **Comportamento e Mortalidade de indivíduos aclimatados em laboratório**

Com relação ao comportamento de nadar com o ventre para cima, eviscerando as gônadas, seguido da incidência de morte apresentada pelos peixes trazidos do ponto referência (Baia de Guaratuba) e aclimatados no LFCO, podem-se considerar duas hipóteses: comportamento de desova ou simplesmente estresse de transporte e da aclimação. Em princípio, a hipótese levantada era de comportamento reprodutivo (desova), pois todos os indivíduos que apresentaram este comportamento eram fêmeas. De fato, a maturação das fêmeas ocorre durante todo o ano e a desova destes animais é do tipo parcelada; mas o desenvolvimento gonadal ocorre somente a partir do mês de junho com um maior desenvolvimento em outubro (FAVARO *et al.*, 2003). Além disso, não há relatos na literatura de comportamento reprodutivo caracterizado pelo nado em posição invertida (ventre para cima) para *Atherinella brasiliensis*. Portanto, atribui-se o comportamento incomum apresentado pelos peixes, seguido de morte, ao estresse do transporte de duas

horas de viagem entre Guaratuba e Curitiba, juntamente com o estresse da aclimação em aquários de pequeno porte.

Apesar disso, como verificado na Tabela 2, a única diferença encontrada entre os indivíduos do ponto referência processados em campo e os indivíduos aclimatados em laboratório foi a atividade da GST branquial. Sugere-se que a ativação da enzima apresentada pelos peixes aclimatados seja uma resposta ao estresse do transporte e aclimação em pequenos aquários, visto que esta espécie é habituada a viver em cardumes e aparentemente não tolera viver em um pequeno espaço. Esta resposta enzimática aliada à ausência de efeitos nos outros parâmetros analisados nestes peixes do ponto referência reforça a conclusão de que os efeitos observados em campo indicam efetivamente o estresse químico ambiental na Baía de Paranaguá.

### **Modelo de Dispersão de Partículas de óleo**

A partir do modelo de dispersão do óleo desenvolvido por GONÇALVES & SOUZA (dados não publicados), é possível fazer uma melhor avaliação das respostas apresentadas pelos exemplares de *Atherinella brasiliensis* nos pontos contaminados amostrados na Baía de Paranaguá. Este modelo de dispersão aliado aos resultados obtidos, tanto fisiológicos quanto bioquímicos, é compatível com a observação do efeito mais expressivo (crônico) dos contaminantes químicos a partir da segunda coleta, Março 2005. É válido lembrar que os modelos aqui apresentados são apenas ferramentas integradoras. Contudo, sem estas ferramentas dificilmente se conseguiria ter uma visão dinâmica dos processos em locais como os sistemas ambientais. A dinâmica espacial da dispersão de um contaminante é difícil de ser obtida

através de medições pontuais, mas é facilmente obtida através de modelos e por isso eles são utilizados.

A circulação hidrodinâmica em estuários é dominada principalmente pelas marés que forçam a elevação da superfície livre de água. O efeito das marés trabalha associado à ação do vento e da descarga dos rios, que acabam alterando a circulação da água devido a sua velocidade e às diferenças de densidade em relação à água salgada (REKSIDLER, 2004). O padrão de distribuição do óleo seguiu o regime de maré, em que a velocidade das correntes é maior no refluxo, devido ao represamento das águas fluviais (BIGARELA, 1978), com um padrão semi-diurno misto de amplitude máxima de aproximadamente 2,0 m (KNOPPERS *et al.*, 1987) (Figura 22).

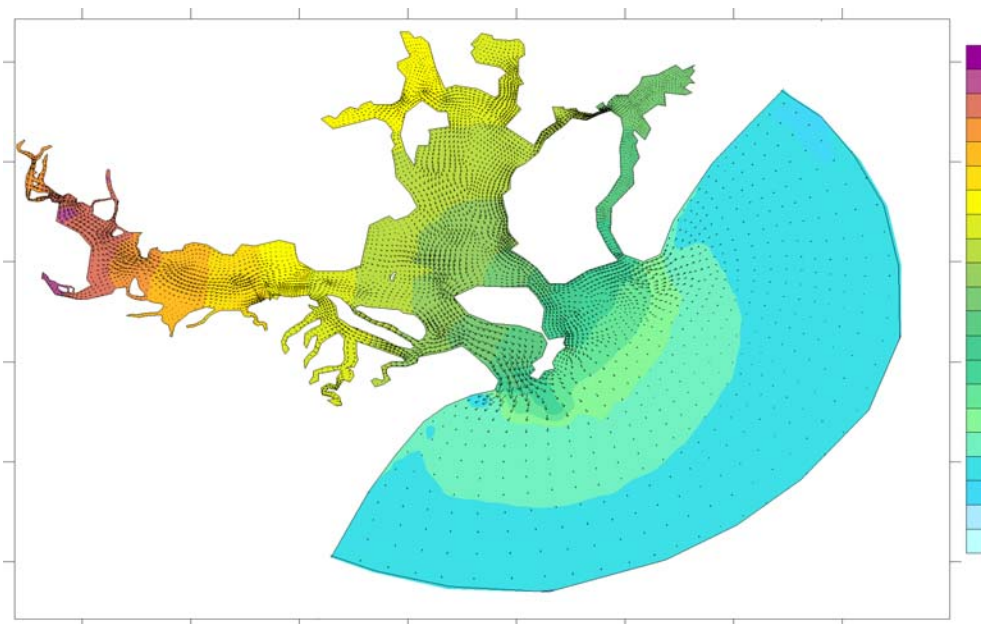


Figura 22. Dinâmica das correntes marítimas da Baía de Paranaguá, tanto de maré enchente, quanto de vazante. A intensidade das correntes está representada pelas diferentes colorações, variando de mais fortes na região mais próxima às encostas e principalmente próximas ao acidente (cor laranja) para mais fracas (cor azul claro) em mar aberto.

Com base nestas informações físicas e nos modelos gerados pode-se sugerir que apesar das correntes marítimas movimentarem os contaminantes por toda a Baía, a maior parte do óleo ficou retido na região mais próxima ao acidente, próximo ao porto de Paranaguá. Em virtude desta situação, os peixes que não morreram teriam se refugiado em outras regiões, e aos poucos com o espalhamento do óleo e uma menor concentração na superfície do mesmo eles foram retornando a seus locais de origem. Esta hipótese é compatível com a constatação da dificuldade de captura dos peixes-rei na ocasião da primeira coleta (Dezembro, 2004). Frações mais solúveis teriam obviamente se espalhado por uma área maior atingindo tanto regiões de mangue quanto de mar aberto (Figura 20 e 21). São as marés que determinam a extensão da mancha e as possíveis áreas que serão contaminadas, mas é preciso levar em conta processos como dissolução, evaporação, foto-oxidação e biodegradação. A aparente eliminação da contaminação visualizada a partir da segunda coleta, não deve ser vista com otimismo; muitas das frações destes hidrocarbonetos podem ter evaporado bem como decantado e sedimentado no ambiente. São justamente estas frações solúveis que prejudicam mais profundamente os órgãos vitais ou processos fisiológicos e bioquímicos dos animais (IAP – Instituto Ambiental do Paraná/IBAMA, Relatório Técnico, Maio de 2005).

Através destas informações e do modelo de dispersão do óleo da explosão do navio Vicuña, propõe-se que a partir de Março de 2005 (segunda coleta, 120 dias após a explosão) os efeitos tenham sido crônicos, e por isso tenham sido percebidos nas dosagens enzimáticas e plasmáticas de osmolalidade, íons e cortisol. Os efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo são

muito variados podendo ser, inclusive, necrosantes (KENNEDY & FARRELL, 2005). Esses poluentes inicialmente causam uma alteração na estrutura e posteriormente nas propriedades funcionais das moléculas envolvidas nos processos biológicos (AMADO *et al.*, 2006b). Os componentes mais tóxicos do óleo tipo *bunker*, derivado do petróleo, são o benzeno, o tolueno e o xileno. Estes inclusive são os compostos mais solúveis em água (principalmente o benzeno). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são muito resistentes à degradação biológica e persistem por um longo período de tempo no ambiente. Nesta segunda coleta, parte dos compostos pode ter sedimentado e decantado no ambiente, o que não os impede de continuar agindo no metabolismo dos animais.

Quando expostos a contaminantes dotados de grande capacidade de dissociação na água, os peixes podem sofrer inúmeros danos. Através da superfície respiratória (brânquias), responsável pela absorção direta destes compostos, ou através da ingestão de água, sofrem comprometimento de diversos órgãos e tecidos (KENNEDY & FARRELL, 2005). Neste estudo, os efeitos da contaminação crônica podem ser facilmente percebidos nas dosagens plasmáticas, em especial na dosagem de magnésio da segunda coleta, em que houve um aumento significativo deste íon no plasma dos animais. Este resultado é corroborado não só pelo modelo de dispersão de partículas de óleo que evidenciou uma maior concentração de contaminação por petróleo nos pontos A e B neste mesmo período, mas também por um problema osmorregulatório evidenciado pelas dosagens de osmolalidade e cloreto.

Geralmente em peixes, compostos tóxicos acabam gerando uma resposta integrada envolvendo vários sistemas e a ativação de vários mecanismos para conter ou minimizar os efeitos tóxicos no metabolismo (KENNEDY & FARRELL, 2005). A longo prazo, estes compostos podem gerar efeitos como por exemplo, a redução na capacidade reprodutiva, danos genéticos e morfológicos (KENNEDY & FARRELL, 2005).

O maior impacto sofrido pelos peixes coletados no ponto B (mais afastado do local do acidente) em relação aos peixes coletados no ponto A (mais próximo ao local do acidente) pode reforçar a hipótese de que frações solúveis são mais tóxicas ao metabolismo de animais aquáticos, como também pode ser um reflexo da dificuldade de obtenção de exemplares no ponto A como evidenciado pela equipe nos momentos de coleta. Além disso, este maior impacto pode retratar não só a contaminação por petróleo proveniente do acidente, mas também um efeito da associação destes contaminantes aos que regularmente são despejados na região. Deste modo, a resposta mais evidente no ponto B pode estar relacionada com sua localização mais próxima à saída da Baía, ficando exposto a todo os efluentes despejados na região. A dificuldade na obtenção de dados das análises de água da época do acidente, bem como a inexistência de um monitoramento dos parâmetros físico-químicos e ecotoxicológicos da água do local nos impede de afirmar que estes resultados fisiológicos e bioquímicos apresentados pelos exemplares de *A. brasiliensis* sejam principalmente causados pelo óleo proveniente do acidente com o navio Vicuña.

## 6. Considerações Finais

*Atherinella brasiliensis* mostrou-se um bom bioindicador de contaminação ambiental. Trata-se de uma espécie estuarina residente, com todos os estádios de desenvolvimento no estuário. Deste modo, as alterações fisiológicas e bioquímicas apresentadas por esta espécie demonstram os efeitos da poluição nestes ambientes devido a seu contato direto e constante com o meio. Analisar as funções osmorregulatórias de espécies de estuário é muito relevante, principalmente pela importância econômica destas regiões, hoje tão susceptíveis à contaminação antropogênica. Alguns inconvenientes desta espécie são: 1) o fato de não suportar o estresse do transporte, o que impossibilitou a utilização dos mesmos em estudos laboratoriais complementares; 2) seu tamanho reduzido que dificultou a retirada de sangue.

A enzima anidrase carbônica branquial e renal mostrou-se um bom biomarcador e deveria ser utilizada com mais frequência para indicar alterações geradas por contaminação ambiental. Glutathione S-Transferase apesar de ser um biomarcador de contaminação mais tradicional, não apresentou variações significativas neste estudo. Apesar de não serem utilizados com frequência, os marcadores fisiológicos como as dosagens de osmolalidade e íons (cloreto e magnésio) indicam importantes alterações fisiológicas geradas pela contaminação. Deste modo, estes marcadores deveriam ser sempre monitorados principalmente pelo seu baixo custo e simplicidade e pela função central na osmorregulação/homeostasia do LEC, processo diretamente relacionado aos epitélios branquial e renal. A dosagem de cortisol plasmático corroborou a utilização deste hormônio de estresse como biomarcador.



A utilização do modelo de dispersão dos contaminantes pela Baía foi indispensável para corroborar evidências obtidas pelos biomarcadores utilizados, de que o efeito crônico tenha se iniciado a partir da segunda coleta (120 dias após a explosão, Março 2005). Através do modelo foi possível visualizar o fluxo temporal da contaminação e associar estes dados aos resultados fisiológicos e bioquímicos analisados ao longo de 7 meses.

## 7. Conclusões

- Este trabalho foi realizado com uma espécie residente em estuário e através dele foi possível identificar biomarcadores fisiológicos e bioquímicos úteis para o diagnóstico de regiões impactadas por acidentes com petróleo;
- A espécie *Atherinella brasiliensis* mostrou-se um indicador adequado de contaminação ambiental estuarina;
- A enzima anidrase carbônica branquial e renal mostrou-se um bom biomarcador;
- A enzima GST branquial não apresentou efeitos significativos;
- Os marcadores fisiológicos mostraram-se efetivos na determinação dos efeitos iniciais da contaminação;
- A utilização do cortisol corroborou efetiva participação deste hormônio nas respostas ao estresse osmorregulatório;
- O modelo de dispersão foi indispensável para a discussão deste trabalho. Através deste modelo, o efeito crônico da contaminação sobre os exemplares de *A. brasiliensis* fica evidente, ao longo de 7 meses de monitoramento da região.

## 8. Referências Bibliográficas

AMADO, L.L., ROSA, C.E., LEITE, A.M., MORAES, L., PIRES, W.V., PINHO, G.L.L., MARTINS, C.M.G., ROBALDO, R.B., NERY, L.E.M., MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A. (2006)a. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Scianidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. Mar. Poll. Bull. 52: 199-206.

AMADO, L.L., ROBALDO, R.B., GERACITANO, L., MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A. (2006)b. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). Mar. Poll. Bull. 52: 207-213.

ANDREATA, J.B., BARBIERI, L.R.R., SEBILIA, A.S.C., SILVA, M.H.C. (1990). Relação dos peixes da Lagoa de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. Atlântica 12:5-17.

ANGULO, R.J. (1992). Geologia da planície costeira do estado do Paraná. São Paulo. Tese (doutorado), USP, São Paulo. pp.334.

ARASHISAR, S., HISAR, O., YANIK, T., ARAS, S.M. (2004). Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout. Environ. Toxicol. Pharmacol. 17: 125-128.

ARAÚJO, F.G., CRUZ-FILHO, A.G., AZEVEDO, M.C.C., SANTOS, A.C.A., FERNANDEZ, L.A.M (1997). Variações espaciais e sazonais da comunidade de peixes jovens da margem continental da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. Acta Biol. Leopold. 19:61-83.

ARAÚJO, M.E., TEIXEIRA, J.M.C., OLIVEIRA, A.M.E. (2004). Peixes estuarinos marinhos do Nordeste Brasileiro: guia ilustrado, edições UFC, Fortaleza.

BARTON, B.A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42: 517-525.

BEMVENUTI, M.A. (1984). Abundância, distribuição, reprodução e hábitos alimentares de peixes-rei na região estuarial da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade do Rio Grande. Rio Grande. 93p.

BEMVENUTI, M. A (1987). Abundância, distribuição e reprodução de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica*, Rio Grande, 9 (1): 5-32 pp.

BEMVENUTI, M.A (1990). Hábitos alimentares de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica*, Rio Grande, 12(1): 79-102.

BEYENBACH, K.W. (1995). Secretory electrolyte transport in renal proximal tubules of fish. In *Cellular and Molecular Approaches to fish ionic regulation*. Academic Press, San Diego. Vol. 14 in the *Fish Physiol. Ser.*

BEYENBACH, K.W., FREIRE, C.A., KINNE, R.K.H., KINNE-SAFFRAN, E. (1993). Epithelial transport of magnesium in the kidney of fish. *Miner. Electrolyte Metab.* 19: 241-249.

BEYENBACH, K.W., FREIRE, C.A., KINNE-SAFFRAN, E., KINNE R.K.H. (1997). Transport of magnesium across renal membrane vesicles evidence for a channel? *Advances in Magnesium Research* 67: 443-450.

BIGARELA, J.J. (1978). A Serra do Mar e a porção oriental do estado do Paraná um problema de segurança ambiental e nacional. Secretaria de Estado do Planejamento do Paraná e Associação de Defesa e Educação ambiental. Curitiba. 248p.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

BRANDINI, F.P., THAMM, C.A.; VENTURA, I. (1988). Ecological studies in the Bay of Paranaguá. III Seasonal and spatial variations of nutrients and chlrophyll - a. *Neritica*, v.3, n.1, p.1-30

CAMARGO, M.M.P., MARTINEZ, C.B.R. (2006). Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol, Pharmacol.* 21: 61-69.

CARVALHO, J.P. (1953). Alimentação de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Pisces Mugiloidei – Atherinidae). *Bolm.Inst. Oceanogr.* 4(1/2): 127-144

CAZENAVE, J., BISTONI, M.L.A., PESCE, S.F., WUNDERLIN, D.A. (2006). Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76: 1-12.

CHAVES, P., BOUCHEREAU, J.L (1998). Biodiversité et dynamique des peuplements ichtyiques de la mangrove de Guaratuba, Brésil. *Oceanologica Acta – Vol 22* (3).

CHAVES, P.T.C., CORRÊA, M.F.M (1998). Composição ictiofaunística da área de manguezal da Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 15 (1): 195-202.

CLIFF, W.H., SAWYER, D.B., BEYNBACH, K.W. (1986). Renal proximal tubule of flounder II. Transepithelial Mg secretion. *Am. J. Physiol.* 250: R616-R624.

CORRÊA, M.F.M (1987). Ictiofauna da Baía de Paranaguá e adjacências (Litoral do Estado do Paraná – Brasil) levantamento e produtividade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

DAY. JR. JW., HALL. CAS., KEMP. WM., YANES-ARANCIBA. A. (1989). Estuarine Ecology, Wiley, New York, 558 p.p.

DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A., GYÖRKÖS, P. (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Mar. Poll. Bull. 31: 19-27.

DORVAL, J., LEBLOND, U.S., HONTELA, A., (2003). Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochloride pesticide. Aquat. Toxicol. 63, 229 – 241.

EVANS, D.H. (1993). The physiology of fishes. Marine Science Series. 592 p.p.

FALCÃO, M. (2005). A ictiofauna em planícies de maré nas Baías de Laranjeiras e Paranaguá, Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

FÁVARO, LF.; LOPES, S.C.G; SPACH. HL.; (2003). Reprodução do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae), em uma planície de maré adjacente a gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Revta. Bras. Zool. 20: 501-506 p.p.

FREIRE, C.A., KINNE, R.K.H., KINNE-SAFFRAN, E., BEYENBACH, K.W. (1996). Electrodiffusive transport of Mg across renal membrane vesicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol 270: F739-F748.

FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. (1978). Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. I. Teleostei. Vol 1. Museu de Zoologia, USP, São Paulo, 110 p.p.

FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. (2000). Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleósteos. Vol. 5. Museu de Zoologia, USP, São Paulo, 116p.p.

GENOVESE, G.; ORTIZ, N.; URCOLA, M.R.; LUQUET, C.M. (2005). Possible role of carbonic anhydrase,  $V - H^+$  - ATPase, and  $Cl^-/HCO_3^-$  exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. Comp. Biochem. Physiol. 142: 362-369

GEORGALIS, T., GILMOUR, K.M., YORSTON, J., PERRY, S.F. (2006). Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 291: F407-F421.

GOKSOYR, A., BEYER, J., EGAAS, E., GROSVIK, B.E., HYLLAND, K., SANDVIK, M., SKAARE, J.U. (1996). Biomarker responses in Flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. Mar. Poll. Bull. 33, 36-45.

GROSELL, M., GENZ, J. (2006). Ouabain-sensitive bicarbonate secretion and acid absorption by the marine teleost fish intestine play a role in osmoregulation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol 291: R1145-R1156.

GUERREIRO, G.; DI FINIZIO, A.; CIARCIA, G. (2002). Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Comp. Biochem. Physiol. 132: 205-211.

HENRY, R.P. (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. Annu. Rev. Physiol. 58: 523-538.

HENRY, R.P., GEHRICH, S., WEIHRAUCH, D., TOWLE, D.W. (2003). Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. 136A: 243-258.

HERBERTS, M., CRESPO, M.M.L.; MIMURA, O.M. (2005). Ação de detergentes aniônicos nas concentrações iônicas sanguíneas de *Hypostomus* sp. Livro de resumos do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia. João Pessoa, Paraíba. Sessão 02, R: 090.

HERMES-LIMA, M. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B: 437-448.

HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVÍN, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 537-556.

HERRLING, G. Development of a numerical model for the Paranaguá Bay in Brazil. M.Sc. Thesis – Coastal Research Laboratory, Institute of Geosciences, Christian Albrechts University, Kiel-Germany, 2003. NÃO PUBLICADO.

HICKMAN, C.P., ROBERTS, L.R., LARSON, A. (2004). *Princípios Integrados de Zoologia*. 11ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ.

HOFMANN, G.E. (1999). Ecologically relevant variation in induction and function of heat shock proteins in marine organisms. *Am. Zool.* 39(6):889-900.

HONTELA, A. (1997) Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticoid hormones. *Rev. Toxicol.* 1: 1–46.

HONTELA, A., RASMUSSEN, J.B., AUDET, C., CHEVALIER, G. (1992). Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 278–283.

IPARDES (1990). *Macrozoneamento da APA de Guaraqueçaba*, Curitiba, 2v.



IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. (2004). Are hsp's suitable for indicating stressed state in fish? J. Exp. Biol, 207: 15-19.

JOBLING, M. (1995). Osmotic and ionic regulation – water e salt balance. Environmental Biology of Fishes. Chapman & Hall, London. Fish and Fisheries, series 16.

KATOH, F., TRESGUERRES, M., LEE, M.K., KANEKO, T., AIDA, K., GOSS, G.G. (2006). Cloning of rainbow trout SLC26A1: involvement in renal sulfate secretion. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol 290: R1468 – R1478.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. (1976). Mechanism for several activities for the Glutathione S-Transferase. J. Biol. Chem. 251: 6183 – 6188.

KENNEDY, C.J., FARRELL, A.P. (2005). Ion homeostasis and interregional stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323: 43-56.

KENNISH, M.J. (1991). Anthropogenic Impacts on Estuaries. Em: KENNISH, M.J. (ed). Ecology of Estuaries. Vol. 2. Biological Aspects CRC Press, Boca Raton: 1-8.

KNOPPERS, B.A.; BRANDINI, F.P.; THAMN, C.A. (1987). Ecological studies in the Bay of Paranaguá: Some physical and chemical characteristics. Neritica. Curitiba. 2 (1): 1 – 36.

KRUEGER, G.G (2004). Avaliação das fontes poluentes pontuais da Baía de Guaratuba, Paraná. Trabalho de Conclusão de curso de engenharia ambiental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. NÃO PUBLICADO.

KÜLTZ, D. (1996). Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells. Am. J. Physiol. 271 (Cell Physiol.40): C1181 – C1193.

LANA, P.C.; MARONE, E.; LOPES, R.M.; MACHADO, E.C. (2000). The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brasil. Em: Ecological studies, Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 144: 131-145.

LIONETTO, M.G.; MAFFIA, M.; CAPELLO, M.S.; GIORDANO, M.E.; STORELLI, C.; SCHETTINO, T. (1998). Effects of cadmium on carbonic anhydrase and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  in ell, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. Comp. Biochem. Physiol. 120 A: 89-91.

LÓPEZ-BAREA, J. , PUEYO, C. (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. Mutat. Res. 399: 3-15.

LÓPEZ MAÑANES, A.A., MAGNONI, L.J., GOLDEMBERG, A.L. (2000). Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 127 B: 85-95.

LOVE, J. W.; REES, B.B. (2002). Seasonal differences in hypoxia tolerance in gulf killifish, *Fundulus grandis* (Fundulidae). Environ. Biol. Fishes 63:103-115.

MAACK, R. (1968). Geografia física do estado do Paraná. BADEP. UFPR. IBPT. Curitiba, Paraná, 350p.

MADSEN, S.S. (1990). The role os cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). Gen. Comp. Endocrinol. 79: 1-11.

MARTINEZ-ÁLVAREZ, R.M.; HIDALGO, M.C.; DOMEZAIN, A.; MORALES, A.E.; GARCIA- GALLEGO, M.; SANZ, A. (2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. J. Exp. Biol, 205: 3699-3706.

MARTINEZ, A.S; CUTLER, C.P.; WILSON, G.D.; PHILLIPS, C.; HANZON, N.; CRAMB, G. (2005). Regulation of expression of two aquaporin homologs in the intestine of the European eel: effects of seawater acclimation and cortisol treatment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1733-R1743.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211–268.

MONTEIRO, S.M., MANCERA, J.M., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., SOUSA, M. (2005). Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 141C: 375-383.

MUNRO, C.J. STABENFELDT, G.S. (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.* 101: 41-49.

NELSON, J.S. (1994). *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, New York, p.600.

ODUM, E.P. (1983). *Ecologia*. Interamericana. 1ª. Edição. Rio de Janeiro.

PACHECO, M., SANTOS, M.A. (2001). Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. Petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 64-75.

PAIVA FILHO, A. M, GIANNINI, R; (1990). Contribuição ao conhecimento da biologia do peixe-rei, *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Atherinidae), no Complexo Baía-estuário de Santos e São Vicente, Brasil. *Bolm. Inst. Oceanogr, São Paulo*, 38 (1): 1-9.

PARMELEE, J.T., RENFRO, J.L. (1983). Esophageal desalination of seawater in flounder: role of active sodium transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 245: R888 – R893.

PESSANHA, A.L.M.; ARAUJO, F.G (2001). Recrutamento do peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae) na margem continental da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 18 (4): 1265-1274.

PERRY, S.F.; GILMOUR, K.M. (2006). Acid base balance and  $\text{CO}_2$  excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Resp. Physiol. Neurobiol.* ARTICLE IN PRESS.

PRODOCIMO, V., FREIRE, C.A. (2001). Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine puffer fishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262: 243-253.

PRODOCIMO, V., FREIRE, C.A. (2004). Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 37: 1-5.

PROSSER, C.L. (1973). *Comparative Animal Physiology*. 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

RANDALL, D.J.; BRAUNER, C. (1998). Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A:3-8.

RANDALL, D.J.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. (1999). *Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações*. 4<sup>a</sup> Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 729 p.p.

REGOLI, F., PRINCIPATO, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31: 143-164.

REKSIDLER, R. (2004). Dimensionamento de um sistema de tratamento de esgoto sanitário para o município de Paranaguá. Relatório Final de Engenharia

Ambiental II. Curso de Engenharia de Universidade Federal do Paraná. NÃO PUBLICADO.

RELATÓRIO TÉCNICO IAP/IBAMA (2005). Relatório técnico sobre o acidente ambiental do Navio Vicuña ocorrido na Baía de Paranaguá em 15/11/2004. NÃO PUBLICADO.

RICKLEFS, R.E. (2003). A Economia da Natureza, Guanabara Koogan, 5ª Edição, Rio de Janeiro.

ROCHA, R.M., KREMER, L.P. (2005). Introduced ascidians in Paranaguá Bay, Paraná, Southern Brazil. *Revta. Bras. Zool.* 22, 1170-1184.

ROCHE, H., BOGÉ, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.* 41: 27-43.

RONISZ, D.; LARSSON, J.D.G.; FÖRLIN, L. (1999). Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 124C: 271-279.

ROMÃO, S., FREIRE, C.A., FANTA, E. (2001). Ionic regulation and Na,K-ATPase activity in gills and kidney of an antarctic agglomerular cod icefish (*Notothenia neglecta*) exposed to dilute sea water. *J. Fish Biol.* 59, 463-468.

ROSS, S.W.; DALTON, D.A.; KRAMER, S.; CHRISTENSEN, B.L. (2001). Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.* 130C: 289-303.

SAMPAIO, L.A., BIANCHINI, A. (2002). Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 187-196.

SANTOS, M.A., PACHECO, M. (1996). *Anguilla anguilla* L. Stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 35: 96-100.

SANTOS, A.C.A., CASTELLUCCI, F.R.C.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTOS, E.P.; SENA, M.P. (1999). Distribuição e recrutamento do peixe-rei *Xenomelaniris brasiliensis* (Osteichthyes, Atherinidae) na margem continental oeste da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Acta Biol. Leopold.* 21: 107-118.

SANTOS, D.M., BOSSINI, A.T., PREUSSLER, K.H., VASCONSELOS, E.C., CARVALHO-NETO, F.S., CARVALHO-FILHO, M.A.S. (2006). Avaliação de Metais Pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob influência das atividades antrópicas. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1, 157-160.

SCHILL, R.O.; GAYLE, P.M.H.; KOHLER, H.R. (2002). Daily stress proteins (hsp70) cycle in chitons (*Acanthopleura granulata* Gmelin, 1791) which inhabit the rocky intertidal shoreline in a tropical ecosystem. *Comp. Biochem. Physiol.* 131(3): 253-258.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (2002). Fisiologia animal – Adaptações e Meio Ambiente. Editora e Livraria Santos. 5ª edição. São Paulo, SP. Capítulos 8: 301-350 e 9: 355-388.

SKAGGS, H.S., HENRY, R.P. (2002). Inhibition of carbonic anhydrase in the of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133: 605-612.

SPACH, H.L., SANTOS, C.; GODEFROID, R.S. (2003). Padrões temporais na assembléia de peixes na gamboa do Sucuriú, Baía de Paranaguá, Brasil, *Revta. Bras. Zool.* 20: 591-600.

TIBURTIUS, E.R.L., PERALTA-ZAMORÁ, P., LEAL, E.S. (2004). Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim. Nova.* 27, 441-446.

TOMANEK, L.; SOMERO, G.N (2000). Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 249-256.

TOMANEK, L.; SOMERO, G.N (2002). Interspecific and acclimation – induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat – shock transcription factor – 1 (HSF1) in congeneric marine snail (genus *Tegula*) implications for regulation of hsp gene expression. *J. Exp. Biol.* 205: 677-685.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.

VEILLETTE, P.A., SUNDELL, K., SPECKER, J.L. (1995). Cortisol mediates the increase in intestinal fluid absorption in Atlantic Salmon during Parr-Smolt Transformation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 250-258.

VENDEL, A.L., CHAVES, P.T.C (1998). Alimentação de *Bairdiella ronchus* (Cuvier) (Perciformes, Scianidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. – *Revta. Bras. Zool.* 15(2): 297-305.

VENDEL, A.L., CHAVES, P.T.C. (2001). Baía de Guaratuba, Paraná: Um estudo de caso sobre ictiofauna em estuários. In VENDEL, A.L.; CHAVES, P.T.C. Reunião Técnica sobre ictiologia em estuários, Curitiba, 109p.

VENDEL, A.L., LOPES, S.G., SANTOS, C., SPACH, H.L. (2003). Fish assemblages in tidal flat. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 233-242.

VITALE, A.M., MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation

of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C: 121-129.

VOLCKER, C.M., ANDREATA, J.V. (1982). Levantamento taxonômico preliminar da ictiofauna da Laguna da Tijuca, Rio de Janeiro, *Rev. Nordest. Biol.* 5:197-257.

YAMASHITA, Y.; TOMINAGA, O.; TAKAMI, H.; YAMADA, H. (2003). Comparison of growth, feeding and cortisol level in *Platichthys bicoloratus* juveniles between estuarine and nearshore nursery grounds. *J. Fish. Biol.* 63: 617-630.

ZACCARON DA SILVA, A.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F; BAINY, A.C.D (2005). Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62: 376-382.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. (2006). Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comp. Biochem. Physiol.* 143: 187-195.